

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 692**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/US2013/034543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13149111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13715871 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2831117**

54 Título: **Anticuerpos anti-TLR4 y sus usos**

30 Prioridad:

**29.03.2012 US 201261617164 P**

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

**29.01.2018**

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE SA (100.0%)  
14 ch. des Aulx 1228 Plan-Les-Ouates  
Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**ROUSSEAU, FRANCOIS;  
LOYAU, JÉRÉMY;  
FISCHER, NICOLAS;  
ELSON, GREG y  
KOSCO-VILBOIS, MARIE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 651 692 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-TLR4 y sus usos

Campo técnico de la invención

5 Esta invención se refiere generalmente a anticuerpos que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR-4), y al uso de anticuerpos anti-TLR4 como agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores Toll, descubiertos primero en *Drosophila*, son proteína transmembrana tipo I que tiene repeticiones ricas en leucina (LRR) en la porción extracelular de la proteína, y uno o dos dominios ricos en cisteína. Los homólogos en mamíferos de los receptores Toll de *Drosophila* son conocidos como "receptores tipo Toll" (TLR). Los TLR desempeñan un papel en la inmunidad innata mediante el reconocimiento de partículas microbianas y activación de células inmunes contra la fuente de estas partículas microbianas.

15 En seres humanos, se han identificado once receptores tipo Toll, TLR 1-11, y se caracterizan por la homología de sus dominios intracelulares con aquellos del receptor de IL-1 y por la presencia de repeticiones extracelulares ricas en leucina. Los diferentes tipos de TLR se activan por diferentes tipos de partículas microbianas. Por ejemplo, TLR4 se activa principalmente por lipopolisacárido (LPS), mientras que TLR2 se activa por ácido lipoteicoico (LTA), lipoarabinomano (LAM); lipoproteína (BLP) y peptidoglicanos (PGN). También se han identificado homólogos del receptor Toll, tales como RP105.

20 Se ha demostrado que TLR4 se asocia con una proteína accesoria, proteína 2 de diferenciación mieloide (MD-2). Se ha encontrado que esta proteína interactúa directamente con TLR4, y MD-2 tiene la capacidad de permitir modificaciones postraduccionales de TLR4, así como también facilita su transporte a la superficie celular. TLR4 y MD-2 forman un complejo en la superficie de la célula.

El lipopolisacárido (LPS), un componente de bacterias Gram negativas, es una partícula microbiana capaz de activar fuertemente el sistema inmune innato. LPS suministra señales a las células inmunes a través de su receptor multcadena, que comprende el complejo TLR4/MD-2 como el principal componente de señalización.

25 De acuerdo con esto, existe la necesidad de métodos y composiciones que se unan a TLR4 y modulen la señalización que es mediada por el complejo TLR4/MD-2.

Resumen de la invención

30 La descripción proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen el receptor TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus expresado en la superficie celular. Los anticuerpos son capaces de bloquear, por ejemplo, neutralizar, la activación del receptor y la posterior señalización intracelular inducida por ligandos de TLR4, por ejemplo, LPS. Los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos que se unen al complejo receptor TLR4/MD-2 de humano y mono cynomolgus y también se unen a TLR4 independientemente de la presencia de MD-2.

35 La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al receptor TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus expresado en la superficie celular y capaz de bloquear la activación del receptor y la señalización intracelular subsiguiente inducida por LPS. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales incluyen: 1E11.C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6, 1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4, 1E11.E5, 1E11.C2E1, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5.

También se proporcionan en un aspecto de esta descripción anticuerpos monoclonales: 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1E11 N103D, 1G12.

40 Estos anticuerpos tienen especificidades distintas. Algunos anticuerpos muestran especificidad para tanto para el TLR4 humano y mono cynomolgus y/o para el complejo receptor TLR4/MD-2 humano y de mono cynomolgus, y se ha demostrado que inhiben la activación del receptor y la señalización intracelular subsiguiente a través de LPS. Por ejemplo, 1C12, 1E11, 1E11 N103D, 1E11.C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6, 1E11.C2E1, 1E11.C2E2, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5 se unen tanto a TLR4 de humano como de mono cynomolgus independientemente de la presencia de MD-2 de humano o de mono cynomolgus. 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1D10 y 1G12 solo se unen a TLR4 de mono cynomolgus independientemente de la presencia de MD-2 de mono cynomolgus. 1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5 se unen únicamente a TLR4 humano independientemente de la presencia de MD-2 de humano. Estos anticuerpos se denominan respectivamente aquí anticuerpos TLR4.

45

Los anticuerpos humanizados de la invención contienen una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 67, 69, 71, 73, 75, 77, 89, 93, 97 o 101. Los anticuerpos humanizados de la invención contiene una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4, 91, 95, 99 o 103.

5 También se proporcionan en un aspecto de esta descripción anticuerpos humanizados que contienen una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22. y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 79, 81, 83, 85 o 87.

10 De acuerdo con la descripción, las tres CDR de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDR1 de VH, también denominada aquí CDRH1) seleccionada del grupo que consiste en G(F/Y)PI(R/G/W)(Y/F/G)GYS (SEQ ID NO: 110), GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); GFPIRYGYS (SEQ ID NO: 55); GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56); GYPIRHGYS (SEQ ID NO: 57); GFPIGQGY (SEQ ID NO: 58); GYPIWGGYS (SEQ ID NO: 59) y GYPIGGGYS (SEQ ID NO: 60), una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDR2 de VH, también denominada en este documento CDRH2), de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada variable (VH CDR3, también denominada en este documento CDRH3) seleccionada del grupo que consiste en ARKDSG(N/Q/D/E)X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>PY (SEQ ID NO: 111) donde X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cada uno independientemente cualquier aminoácido hidrófobo, ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27); ARKDSGRLLPY (SEQ ID NO: 28); ARKDSGKWLPLY (SEQ ID NO: 29); ARKDSGHLMPY (SEQ ID NO: 30); ARKDSGHNYPY (SEQ ID NO: 31); ARKDSGKNFPY (SEQ ID NO: 32); ARKDSGQLFPY (SEQ ID NO: 33); ARKDSGHNLPY (SEQ ID NO: 34); ARKDSGDYFPY (SEQ ID NO: 35) y ARKDSGRYWPLY (SEQ ID NO: 36). Los tres CDR de cadena ligera incluyen una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDR1 de VL, también denominada en este documento CDRL1 ) de QSISDH (SEQ ID NO: 37); una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDR2 de VL, también denominada en este documento CDRL2) de YAS (SEQ ID NO: 38); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 que determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDR3 de VL, también denominada en este documento CDRL3) seleccionada del grupo que consiste en QQG(Y/N)(D/E)(F/A)PXT (SEQ ID NO : 112) en donde X es cualquier aminoácido hidrófobo, QQGHSPFLT (SEQ ID NO: 39); QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61); QQGYDEPFT (SEQ ID NO: 62); QQGYDFPFT (SEQ ID NO: 63); QQGYDYPFT (SEQ ID NO: 64) y QQGYEFPFT (SEQ ID NO: 65). Los anticuerpos se unen al complejo TLR4/MD-2 humano y de mono cynomolgus, a TLR4 de humano y mono cynomolgus cuando no forman complejos con MD-2 de humano y mono cynomolgus, al complejo TLR4/MD-2, a TLR4 de humano cuando no forma complejo con MD-2 humano, al complejo de TLR4/MD-2 humano y de mono cynomolgus o TLR4 de mono cynomolgus cuando no forma complejo con MD-2 de mono cynomolgus.

40 Los anticuerpos anti-TLR4 de la divulgación también incluyen anticuerpos que incluyen una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada que es al menos 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 89, 93, 97 o 101, y/o una secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera que es al menos 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4, 79, 81, 83, 85 o 87.

45 Los anticuerpos de la invención y la divulgación se unen específicamente a TLR4 de humano y/o de mono cynomolgus y/o a los complejos TLR4/MD-2 de humano y/o de mono cynomolgus, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos en TLR4 de humano y/o mono cynomolgus entre los residuos 289 y 375 de la SEQ ID NO: 23 (TLR4 humano) y/o la SEQ ID NO: 24 (TLR4 de mono cynomolgus). Por ejemplo, los anticuerpos de TLR4 se unen específicamente a un epítipo que incluye el residuo 349 de la SEQ ID NO: 23 (humano) y/o la SEQ ID NO: 24 (mono cynomolgus). En algunas realizaciones, el epítipo también incluye residuos adicionales, por ejemplo, residuos seleccionados del grupo que consiste en al menos los residuos 328 y 329 de la SEQ ID NO: 23 (humano) y/o SEQ ID NO: 24 (mono cynomolgus); al menos el residuo 351 de la SEQ ID NO: 23 (humano) y/o SEQ ID NO: 24 (cynomolgus); y al menos los residuos 369 a 371 de la SEQ ID NO: 23 (humano) y/o la SEQ ID NO: 24 (mono cynomolgus), y cualquier combinación de los mismos.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado descrito se une específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4), donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 23 y un epítipo que incluye al menos un residuo 349 de la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que incluyen una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de la complementariedad de cadena pesada variable (CDRH1) de GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH2) de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 (CDRH3) determinante de complementariedad de cadena pesada variable de ARKDSG(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)(X<sub>3</sub>)PY (SEQ ID NO: 111), en donde X<sub>1</sub> es N, Q, D o E, X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo, y X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo; y una cadena ligera con tres CDR que incluye una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable

(CDRL1) de QSIDH (SEQ ID NO: 37); una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL2) de YAS (SEQ ID NO: 38); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de complementariedad (CDRL3) de QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39). En algunas realizaciones, el epítipo incluye además al menos los residuos 328 y 329 de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el epítipo incluye además al menos el residuo 351 de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el epítipo incluye además uno o más residuos entre los residuos 369 a 371 de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el epítipo incluye además al menos los residuos 369 a 371 de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que incluye al menos los residuos 328, 329, 349, 351 y 369 a 371 de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye además una sustitución de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada gamma en la posición del aminoácido de la EU 325 y una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido EU 328. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 325 es serina, y en donde el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 328 es fenilalanina.

También se describen anticuerpos aislados que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4), en donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 23, y en donde el anticuerpo muestra un valor  $EC_{50}$  para unión a TLR4 humano que es menor que el valor  $EC_{50}$  exhibido por el anticuerpo de referencia que tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 43 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el valor de  $EC_{50}$  para unión a TLR4 humano se determina mediante un ELISA competitivo. En algunas realizaciones, el anticuerpo exhibe un valor  $EC_{50}$  para unión a TLR4 humano que es al menos diez veces menor que el valor  $EC_{50}$  exhibido por el anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente adicionalmente a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que incluye una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH1) de  $G(X_1)PI(X_2)(X_3)GYS$  (SEQ ID NO: 110), en donde  $X_1$  es F o Y,  $X_2$  es R, G o W,  $X_3$  es Y, F o G; una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH2) de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH3) de  $ARKDSG(X_1)(X_2)(X_3)PY$  (SEQ ID NO: 111), en donde  $X_1$  es N, Q, D o E,  $X_2$  es cualquier aminoácido hidrófobo, y  $X_3$  es cualquier aminoácido hidrófobo; y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL1) de QSIDH (SEQ ID NO: 37); una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL2) de YAS (SEQ ID NO: 38); y una región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL3) que incluye la secuencia de aminoácidos de  $QQG(X_1)(X_2)(X_3)P(X_4)T$  (SEQ ID NO: 112), donde  $X_1$  es Y o N,  $X_2$  es D o E,  $X_3$  es F o Y, y  $X_4$  es cualquier aminoácido hidrófobo, o la secuencia de aminoácidos de QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39). En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye además una sustitución de aminoácido en la región constante de cadena pesada gamma en la posición del aminoácido EU 325 y una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido EU 328. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 325 es serina, y en donde el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 328 es fenilalanina. En algunas realizaciones, los anticuerpos TLR4 también se unen al complejo TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus.

También se describen anticuerpos aislados que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4), en donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 23 y se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 24, y en donde el anticuerpo exhibe un valor  $EC_{50}$  para unión a TLR4 humano que es menor que el valor  $EC_{50}$  exhibido por un anticuerpo de referencia que tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 43 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el valor  $EC_{50}$  para unión a TLR4 humano se determina mediante un ELISA de competición. En algunas realizaciones, el anticuerpo exhibe un valor  $EC_{50}$  para unión a TLR4 humano que es al menos diez veces menor que el valor de  $EC_{50}$  exhibido por el anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente adicionalmente a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que incluye una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH1) de  $G(X_1)PI(X_2)(X_3)GYS$  (SEQ ID NO: 110), en donde  $X_1$  es F o Y,  $X_2$  es R, G o W,  $X_3$  es Y, F o G; una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH2) de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH3) de  $ARKDSG(X_1)(X_2)(X_3)PY$  (SEQ ID NO: 111), donde  $X_1$  es N, Q, D o E,  $X_2$  es cualquier aminoácido hidrófobo, y  $X_3$  es cualquier aminoácido hidrófobo; y una cadena ligera con tres CDR que incluye una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL1) de QSIDH (SEQ ID NO: 37); una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL2) de YAS (SEQ ID NO: 38); y una región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL3) que incluye la secuencia de aminoácidos  $QQG(X_1)(X_2)(X_3)P(X_4)T$  (SEQ ID NO: 112), en donde  $X_1$  es Y o N,  $X_2$  es D o E,  $X_3$  es F o Y, y  $X_4$  es cualquier aminoácido hidrófobo, o la secuencia de aminoácidos QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39). En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye además una sustitución de aminoácidos en la región constante de cadena pesada gamma en la posición del aminoácido EU 325 y una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido EU 328.

En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido EU 325 es serina, y en donde el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 328 es fenilalanina. En algunas realizaciones, los anticuerpos de TLR4 también se unen al complejo TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus.

5 También se describen anticuerpos aislados que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4) de la SEQ ID NO: 23, en donde el anticuerpo en la cadena principal de IgG1 Fe humana de tipo silvestre exhibe un valor IC<sub>50</sub> para la inhibición de la activación de LPS de TLR4 humano en un ensayo de sangre completa humana que es menor que el valor IC<sub>50</sub> exhibido por un anticuerpo de referencia que tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 43 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo exhibe un valor de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la activación de LPS de TLR4 humano que es al menos dos veces menor que el valor IC<sub>50</sub> exhibido por el anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que incluyen una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH1) de G(X<sub>1</sub>)PI(X<sub>2</sub>)(X<sub>3</sub>)GYS (SEQ ID NO : 110), en donde X<sub>1</sub> es F o Y, X<sub>2</sub> es R, G o W, X<sub>3</sub> es Y, F o G; una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH2) de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDRH3) de ARKDSG(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)(X<sub>3</sub>)PY (SEQ ID NO: 111), en donde X<sub>1</sub> es N, Q, D, X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo y X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo; y una cadena ligera con tres CDR que incluye una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL1) de QSISDH (SEQ ID NO: 37); una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL2) de YAS (SEQ ID NO: 38); y una región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera variable (CDRL3) que incluye la secuencia de aminoácidos de QQG(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)(X<sub>3</sub>)P(X<sub>4</sub>)T (SEQ ID NO: 112), en donde X<sub>1</sub> es Y o N, X<sub>2</sub> es D o E, X<sub>3</sub> es F o Y, y X<sub>4</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo, o la secuencia de aminoácidos de QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 23. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 23 y se une a un epítipo que incluye al menos el residuo 349 de la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye además una sustitución de aminoácido en la región constante de cadena pesada gamma en la posición del aminoácido de EU 325 y una sustitución del aminoácido en la posición de aminoácido de EU 328. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido de la EU 325 es serina, y en el que el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido de la EU 328 es fenilalanina. En algunas realizaciones, los anticuerpos TLR4 también se unen al complejo TLR4/MD-2 de humano y/o de mono cynomolgus.

También se describen anticuerpos aislados que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4), donde el anticuerpo incluye una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que incluyen una región variable determinante de la cadena pesada 1 determinante (CDRH1) aminoácido secuencia de G (X<sub>1</sub>) PI (X<sub>2</sub>) (X<sub>3</sub>) GYS (SEQ ID NO: 110), donde X<sub>1</sub> es F o Y, X<sub>2</sub> es R, G o W, X<sub>3</sub> es Y, F o G; una complementariedad de cadena pesada variable que determina la secuencia de aminoácidos de la región 2 (CDRH2) de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 (CDRH3) determinante de complementariedad de cadena pesada variable de ARKDSG (X<sub>1</sub>) (X<sub>2</sub>) (X<sub>3</sub>) PY (SEQ ID NO: 111), donde X<sub>1</sub> es N, Q, D o E, X<sub>2</sub> es cualquier hidrófobo aminoácido, y X<sub>3</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo; y una cadena ligera con tres CDR que incluye una complementariedad de cadena ligera variable que determina la secuencia de aminoácidos de la región 1 (CDRL1) de QSISDH (SEQ ID NO: 37); una complementariedad de cadena ligera variable que determina la secuencia de aminoácidos de la región 2 (CDRL2) de YAS (SEQ ID NO: 38); y una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera variable (CDRL3) de QQG(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)(X<sub>3</sub>)P(X<sub>4</sub>)T (SEQ ID NO: 112), donde X<sub>1</sub> es Y o N, X<sub>2</sub> es D o E, X<sub>3</sub> es F o Y, y X<sub>4</sub> es cualquier aminoácido hidrófobo. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una secuencia de aminoácidos CDRH1 de GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); GFPIRYGYS (SEQ ID NO: 55), GYPIRFYYS (SEQ ID NO: 56), GYPIRHGYS (SEQ ID NO: 57), GFPIGQGYYS (SEQ ID NO: 58), GYPIWGGYS (SEQ ID NO: 59) o GYPIGGGYS (SEQ ID NO : 60); una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y una secuencia de aminoácidos de CDRH3 seleccionada del grupo que consiste en ARKDSGNYPY (SEQ ID NO: 27); ARKDSGQLFPY (SEQ ID NO: 33); y ARKDSGDYFPY (SEQ ID NO: 35); una secuencia de aminoácidos CDRL1 de QSISDH (SEQ ID NO: 37); una secuencia de aminoácidos CDRL2 de YAS (SEQ ID NO: 38); y una secuencia de aminoácidos CDRL3 de QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39), QQGNDPVT (SEQ ID NO: 61), QQGYDEPFT (SEQ ID NO: 62), QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63), QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64 ) o QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65). En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye además una sustitución de aminoácido en la región constante de cadena pesada gamma en la posición 325 de aminoácido de EU y una sustitución de aminoácido en la posición 328 de aminoácido de EU. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en posición de aminoácido de EU 325 es serina, y en donde el aminoácido sustituido en la posición 328 de aminoácido de la EU es fenilalanina. En algunas realizaciones, los anticuerpos TLR4 también se unen al complejo TLR4/MD-2 de mono humano y/o cynomolgus.

La invención también proporciona anticuerpos aislados que se unen específicamente a un complejo del receptor 4 tipo Toll (TLR4)/MD-2, en donde el anticuerpo incluye una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 67, 69, 71, 73, 75 o 77 e incluye un aminoácido variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo incluye una combinación de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (b) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (c) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (d) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (e) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (f) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 y una región variable de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (g) una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que incluye

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 325 es serina, y en donde el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 328 es fenilalanina. En algunas realizaciones, los anticuerpos de TLR4 también se unen al complejo TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus.

Preferiblemente, los anticuerpos de TLR4 se formatean en un isotipo IgG. Más preferiblemente, los anticuerpos de TLR4 están formateados en un isotipo IgG1. Un ejemplo de un anticuerpo formateado de IgG1 es el anticuerpo 1E11 formateado de IgG1 de la descripción que comprende la secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 40 y la secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 41, como se muestra a continuación:

> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 1E11

```

VQLQESGPGLVKPSDLSLTCVAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWGMGYIHYSGYTDFNPS
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG (SEQ ID NO: 40)

```

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 1E11

```

EIVLTQSPDFQSIVTTPKPKVITTCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS
GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 41)

```

Los anticuerpos anti-TLR4 descritos en este documento también incluyen al menos una sustitución de aminoácidos específica dentro de, por ejemplo, una región Fc o un fragmento de unión de FcR de la misma (por ejemplo, un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio constante de IgG) de tal manera que el anticuerpo modificado provoca alteraciones en la función efectora dependiente de antígeno mientras que retiene la unión al antígeno en comparación con un anticuerpo inalterado. Por ejemplo, los anticuerpos alterados provocan la prevención de la liberación del mediador proinflamatorio. En una realización preferida, los anticuerpos alterados son humanos y del isotipo IgG1.

Los anticuerpos anti-TLR4 de la invención incluyen un anticuerpo alterado en el que se ha modificado al menos un residuo de aminoácido en la región constante de la porción Fc del anticuerpo. Por ejemplo, al menos un aminoácido en el dominio CH2 de la porción Fc ha sido reemplazado por un residuo diferente, es decir, una sustitución de aminoácido. En los anticuerpos alterados descritos en la presente memoria, uno o más de los residuos de aminoácidos que corresponden a los residuos 325, 326 y 328 está sustituido con un residuo diferente en comparación con un anticuerpo inalterado. La numeración de los residuos en la cadena pesada gamma es la del índice EU (véase Edelman, GM et al, 1969, Kabat, E, A., TT Wu, HM Perry, KS Gottesman, y C. Foeller, 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Edición U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, Publicación del NIH No. 91-3242). En una realización preferida, la posición del aminoácido EU 325 de la región constante de cadena pesada gamma está sustituida con serina, y la posición del aminoácido EU 328 de la región constante de cadena pesada gamma está

sustituida con fenilalanina, de modo que las posiciones EU 325 a 328 de la región constante de cadena pesada gamma del anticuerpo IgG1 humano alterado comprende la secuencia de aminoácidos SKAF (SEQ ID NO: 42).

La invención proporciona además el anticuerpo aislado de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio.

5 En un aspecto adicional, la descripción proporciona métodos de tratamiento o prevención de patologías asociadas con actividad de LPS aberrante y/o activación aberrante de TLR4/MD-2 (por ejemplo, la producción aberrante de citoquinas proinflamatorias tal como la producción aberrante de IL-8), o el alivio de un síntoma asociado con tales patologías, mediante la administración de un anticuerpo monoclonal de la divulgación (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino o monoclonal humanizado) a un sujeto en el que se desea dicho tratamiento o prevención. El sujeto a tratar es, por ejemplo, humano. El anticuerpo monoclonal se administra en una cantidad suficiente para tratar, prevenir o aliviar un síntoma asociado con la patología. La cantidad de anticuerpo monoclonal suficiente para tratar o prevenir la patología en el sujeto es, por ejemplo, una cantidad que es suficiente para reducir la producción inducida por LPS de una o más citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-6, IL-8). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "reducida" se refiere a una disminución en la producción de una citoquina proinflamatoria en presencia de un anticuerpo monoclonal de la divulgación, en el que la producción es, por ejemplo, la producción de citoquina proinflamatoria local (por ejemplo, en un sitio de tejido inflamado) o producción de citoquina proinflamatoria sistémica. La producción inducida por LPS de una citoquina proinflamatoria se reduce cuando el nivel de la producción de citoquina proinflamatorias en presencia de un anticuerpo monoclonal de la divulgación es mayor que o igual a 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% menor que un nivel de control de la producción de citoquina proinflamatoria (es decir, el nivel de producción de citoquina inflamatoria en ausencia del anticuerpo monoclonal). Se mide el nivel de producción de citoquina proinflamatoria. Los expertos en la técnica apreciarán que el nivel de producción de citoquina proinflamatoria puede medirse usando una variedad de ensayos, que incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria así como kits de ELISA disponibles comercialmente.

25 Las patologías tratadas y/o prevenidas incluyen, por ejemplo, sepsis inducida por productos microbianos, inflamación aguda, inflamación crónica (por ejemplo, inflamación crónica asociada con condiciones alérgicas y asma), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, IBD y aterosclerosis), lesión isquémica con y sin trasplante, enfermedades renales (por ejemplo, nefropatía diabética), lesión renal aguda y enfermedades en las que el estrés, por ejemplo, estrés celular, induce la expresión de factores de estrés solubles endógenos (por ejemplo, Hsp60, fibronectina, sulfato de heparano, hialuronano, gp96,  $\beta$ -Defensina-2 y proteína surfactante A). Las patologías en las que el estrés, por ejemplo, el estrés celular induce la expresión de factores de estrés solubles endógenos incluyen, por ejemplo, la osteoartritis y la artritis reumatoide. Las patologías asociadas con el estrés, por ejemplo, el estrés celular, también pueden ocurrir en sujetos y pacientes colocados en respiradores, ventiladores y otros dispositivos de asistencia respiratoria. Dichas patologías incluyen, por ejemplo, lesión pulmonar inducida por ventilador ("VILI"), también denominada lesión pulmonar asociada a la ventilación ("VALI").

35 Las composiciones farmacéuticas según la descripción pueden incluir un anticuerpo anti-TLR4 y un vehículo. Estas composiciones farmacéuticas se pueden incluir en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

#### Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es un gráfico que representa la unión por fagos monoclonales que expresan scFv, denominados en este documento como "1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1G12, 15C1", al TLR4 de mono cynomolgus. La especificidad de unión se muestra mediante citometría de flujo usando células CHO simuladamente transfectadas o transfectadas con TLR4 de mono cynomolgus. Los resultados que usan células simuladamente transfectadas se muestran con símbolos grises (clave a la derecha), mientras que los resultados que usan células transfectadas con TLR4 de mono cynomolgus se muestran en otros símbolos de color (clave a la izquierda).

45 La Figura 2 es un gráfico que representa la unión por fagos monoclonales que expresan scFv, denominados en este documento como "1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1G12, 15C1", al complejo TLR4/MD2 humano. La especificidad de la unión se muestra mediante citometría de flujo usando células CHO transfectadas en forma simulada o transfectadas con TLR4/MD2 de mono cynomolgus. Los resultados que utilizan células transfectadas de manera simulada se muestran con símbolos grises (clave a la derecha), mientras que los resultados que utilizan células transfectadas con TLR4/MD-2 de mono cynomolgus se muestran con otros símbolos de color (clave a la izquierda).

50 La Figura 4 es un gráfico que representa la unión por anticuerpos purificados, denominados en este documento "1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1G12, 15C1", al complejo TLR4/MD2 humano. La especificidad de unión se muestra mediante citometría de flujo de células CHO simuladamente transfectadas o transfectadas con TLR4/MD-2 humano. Los resultados que utilizan células transfectadas de manera simulada se muestran con símbolos grises (clave a la derecha), mientras que los resultados que usan células transfectadas con TLR4/MD-2 humano se muestran en otros símbolos de color (clave a la izquierda).

La Figura 5 es una ilustración del contacto entre el aminoácido potencial del parátipo del anticuerpo/epítipo TLR4. La secuencia de CDRH3 del anticuerpo de TLR4 específico humano, 15C1, (SEQ ID NO: 44) puede realizar la interacción del puente salino con lisina 349 de TLR4 humano (SEQ ID NO: 23). La secuencia de CDRH3 del MAb de 1G12 TLR4 específico de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 36) puede realizar la interacción del puente salino con el ácido glutámico 349 del TLR4 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 24). La secuencia de CDRH3 de MAb 1E11 de TLR4 específico de humano/mono cynomolgus puede realizar enlaces de hidrógeno tanto con lisina 349 de TLR4 humano (SEQ ID NO: 23) como con ácido glutámico 349 de TLR4 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 24).

La Figura 6 es un gráfico que representa la unión por anticuerpos purificados, denominados en este documento "1E11, 1E11 N103D", al TLR4 de mono cynomolgus. La especificidad de unión se muestra mediante citometría de flujo usando células CHO simuladamente transfectadas o transfectadas con TLR4/MD2 de mono cynomolgus. Los resultados que usan células simuladamente transfectadas se muestran con símbolos grises, mientras que los resultados que usan células transfectadas con TLR4/MD-2 de mono cynomolgus se muestran en otros símbolos de color.

La Figura 7 es un gráfico que representa la unión de anticuerpos purificados, referidos en la presente memoria "1E11, 1E11 N103D", al complejo TLR4/MD-2 humano. La especificidad de la unión se muestra por citometría de flujo usando células CHO simuladamente transfectadas o transfectadas con TLR4 humano. Los resultados que usan células simuladamente transfectadas se muestran con símbolos grises, mientras que los resultados que usan células transfectadas con TLR4/MD2 humano se muestran en otros símbolos de color.

La Figura 8 es un gráfico que representa la inhibición de la cascada de señalización en dirección 3' inducida por LPS de TLR4, NF-κB, por anticuerpos purificados, a los que se hace referencia en este documento "1E11, 15C1, 1C12, 1G12". La línea celular THP1-azul-CD14 se deriva de la línea celular monocítica humana que expresa al complejo TLR4/MD2 humano y se transfecta en forma estable con un gen informador que facilita el control de la activación de NF-κB/AP-1 inducida por TLR. Las células se incubaron con 1E11, 15C1, 1C12 y 1G12 a las concentraciones indicadas y posteriormente se incubaron con LPS (10 ng/mL). Los niveles de fosfatasa alcalina embrionaria secretada se evaluaron 24 horas después del tratamiento con LPS midiendo la absorbancia a 650 nm usando un lector de microplacas.

La Figura 9 es un gráfico que representa la potencia de unión de anticuerpos purificados con mutaciones CDRH1, denominadas en este documento "15C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6", al complejo TLR4/MD2 humano. La potencia de unión se determina mediante ELISA competitivo. Los resultados obtenidos con el anticuerpo 15C1 parental se muestran con símbolos circulares, mientras que los resultados que usan anticuerpos 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5 y 1E11.C6 se muestran en otros símbolos con diferente color y forma.

La Figura 10 es un gráfico que representa la potencia de unión de anticuerpos purificados con mutaciones CDRH1, a los que se hace referencia en esta memoria como "15C1, 1E11.E1, 1E11.E3, 1E11.E4, 1E11.E5", al complejo TLR4/MD2 humano. La potencia de unión se determina mediante ELISA competitivo. Los resultados obtenidos con el anticuerpo 15C1 parental se muestran con símbolos circulares, mientras que los resultados que usan anticuerpos 1E11.E1, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5 se muestran en otros símbolos con diferente color y forma.

La Figura 11 es un gráfico que representa la potencia de unión de anticuerpos purificados con mutaciones de CDRH1, denominada en este documento "15C1, 1E11.C2E1, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4, 1E11.C2E5", al complejo de TLR4/MD2 humano. La potencia de unión se determina mediante ELISA competitivo. Los resultados obtenidos con el anticuerpo 15C1 parental se muestran con símbolos circulares, mientras que los resultados que usan anticuerpos 1E11.C2E1, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5 se muestran en otros símbolos con diferente color y forma.

La Figura 12 es un gráfico que representa la unión por Fab purificado, denominado en este documento "Fab 15C1, Fab 1E11, Fab 1E11.C2, Fab 1E11.E3 y Fab 1E11.C2E3", al complejo TLR4/MD2 de mono cynomolgus. La especificidad de la unión se muestra mediante citometría de flujo de células CHO transfectadas en forma simulada o transfectadas con el TLR4/MD2 de mono cynomolgus. Los resultados que usan células transfectadas simuladas se muestran con símbolos grises (clave a la derecha), mientras que los resultados que usan las células transfectadas con TLR4/MD2 de mono cynomolgus se muestran en otros símbolos coloreados (clave a la izquierda).

La Figura 13 es un gráfico que representa la inhibición de la cascada de señalización en dirección 3' inducida por LPS de TLR4, NF-κB, por anticuerpos purificados, denominada en este documento "15C1, 1E11.E2". La línea celular THP1-azul-CD14 se deriva de la línea celular monocítica humana que expresa el complejo TLR4/MD2 humano y se transfecta de forma estable con un gen informador que facilita el control de la activación de NF-κB/AP-1 inducida por TLR. Las células se incubaron con 15C1 y 1E11.E2 en las concentraciones indicadas y posteriormente se incubaron con LPS (10 ng/mL). Los niveles de fosfatasa alcalina embrionaria secretada se evaluaron 24 horas después del tratamiento con LPS midiendo la absorbancia a 650 nm usando un lector de microplacas.

La Figura 14 es un gráfico que representa la inhibición de la producción de IL-6 inducida por la activación de TLR4 en el ensayo de sangre completa humana por anticuerpos purificados, denominados en este documento "15C1, 1E11.C2, 1E11.C2E3". La sangre humana se diluyó con una concentración disminuida de anticuerpos y posteriormente se incubó

con LPS. Los niveles de IL-6 se evaluaron 24 horas después del tratamiento con LPS utilizando el kit Milliplex. Los resultados se representan como porcentaje de inhibición de IL-6. Los datos obtenidos con el anticuerpo parental 15C1 se muestran con símbolos de color naranja, mientras que los resultados que usan anticuerpos 1E11.C2 y 1E11.C2E3 se muestran en otros símbolos de color.

5 La Figura 15 es una serie de gráficos que representan la inhibición de la producción de IL-6 inducida por activación de TLR4 en el ensayo de sangre completa de mono cynomolgus por anticuerpos purificados, a los que se hace referencia en esta memoria como "15C1, 1E11C2". Este experimento se realizó con sangre de 2 animales diferentes. La sangre del mono cynomolgus se diluyó con una concentración disminuida de anticuerpos y posteriormente se incubó con LPS. Los niveles de IL-6 se evaluaron 24 horas después del tratamiento con LPS utilizando el kit Milliplex. Los resultados obtenidos con el anticuerpo parental 15C1 se muestran con símbolos circulares, mientras que los resultados que usan el anticuerpo 1E11.C2 se muestran en símbolos cuadrados.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales (MAb) como se describe en las reivindicaciones adjuntas. Los anticuerpos se unen específicamente al complejo receptor TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus. Este complejo receptor se activa mediante lipopolisacárido (LPS), el componente principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas. También se activa mediante ligandos adicionales, que incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, la proteína de fusión del virus respiratorio sincitial, OxPL, Ox-LDL, amiloide  $\beta$ ,  $\beta$ -Defensina 2, níquel, HMGB 1, HSP, S100A8/S100A9, tenascina C, Fibronectina-EDA, Biglicano y Hialuronano. Los anticuerpos monoclonales de la invención inhiben la activación del receptor y la señalización intracelular subsiguiente a través de LPS. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales neutralizan la activación del complejo receptor TLR4/MD-2. En particular, la invención proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen el complejo receptor TLR4/MD-2 expresado en la superficie celular. Además, los anticuerpos monoclonales de la invención también reconocen TLR4 humano y de mono cynomolgus cuando no están complejados con MD-2. El anticuerpo monoclonal es, por ejemplo, un anticuerpo humanizado.

25 Los anticuerpos de la invención se unen específicamente al complejo TLR4/MD-2 de humano y/o de mono cynomolgus, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos en TLR4 humano y/o TLR4 de mono cynomolgus entre los residuos 289 y 375 de la SEQ ID NO: 23 (humana) y la SEQ ID NO: 24 (mono cynomolgus).

30 Los anticuerpos ilustrativos de la invención incluyen, 1E11.C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6, 1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4, 1E11.E5, 1E11.C2E1, 1E11.C2E2, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5. Algunos anticuerpos muestran especificidad para el complejo receptor TLR4/MD-2 de humano y mono cynomolgus, y se ha demostrado que inhiben la activación del receptor y la señalización intracelular posterior a través de LPS. Por ejemplo, 1E11.C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6, 1E11.C2E1, 1E11.C2E2, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5 se unen tanto a TLR4 humano como a mono cynomolgus independientemente de la presencia de MD-2 humano o mono cynomolgus. Los anticuerpos ejemplares de la divulgación 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1D10 y 1G12, solo se unen a TLR4 de mono cynomolgus independientemente de la presencia de MD-2 de mono cynomolgus. 1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5 se unen solo a TLR4 humano independientemente de la presencia de MD-2 humano.

40 Los TLR reconocen partículas microbianas y activan las células inmunitarias contra la fuente de estas partículas microbianas. (Véase Takeda et al., Annu. Rev. Immunol., 21: 335-76 (2003)). Se ha demostrado que TLR4 y MD-2 forman un complejo sobre la superficie celular, y la presencia de MD-2 parece esencial para la capacidad de respuesta de TLR4 a diversos ligandos, incluido a modo de ejemplo no limitante, LPS, proteína de fusión del virus sincitial respiratorio, OxPL, Ox-LDL, amiloide  $\beta$ ,  $\beta$ -Defensina 2, Níquel, HMGB1, HSP, S100A8/S100A9, Tenascina C, Fibronectina-EDA, Biglicano y Hialuronano.

45 El LPS suministra señales a las células inmunes a través de su receptor multicadena en el que el complejo TLR4/MD-2 es el principal componente de señalización. Se ha demostrado que LPS ejerce sus efectos sobre el sistema inmune a través de la señalización de TLR4. El LPS se une rápidamente a la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en el torrente sanguíneo, y en esta forma, LPS interactúa con la proteína de superficie celular CD14 anclada a GPI. LPS se transfiere a TLR4 que transduce una señal de activación intracelular. Recientemente, se encontró que otra proteína, MD-2, era necesaria para que se produjera la transducción de señales a través de TLR4. MD-2 interactúa directamente con TLR4 y juega un papel importante en su modificación postraduccional y el tráfico intracelular. Además, se ha demostrado que MD-2 se une directamente a LPS, lo que demuestra la importancia de esta proteína accesoria en el complejo receptor de LPS (Véase Miyake K., Int. Immunopharmacol., 3: 119-128 (2003)). Por consiguiente, la neutralización de la señalización de LPS mediada por el complejo TLR4/MD-2 es una estrategia terapéutica potencial en el tratamiento de trastornos tales como, por ejemplo, inflamación sistémica aguda y sepsis inducida por infección bacteriana Gram negativa.

## ES 2 651 692 T3

Los anticuerpos de TLR4 de la invención y la divulgación incluyen, por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) mostradas a continuación en la Tabla 1A, las CDR de la cadena ligera mostradas en la Tabla 1B y combinaciones de las mismas.

Tabla 1. Secuencias de CDR de VH de clones de anticuerpos que se unen y neutralizan TLR

ID del clon	CDR1 pesada	CDR2 pesada	CDR3 pesada
1A1	GYSIT ... GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS ... GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGRLLPY (SEQ ID NO: 28)
1A6	GYSIT ... GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS ... GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGKWLPHY (SEQ ID NO: 29)
1B12	GYSIT ... GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS ... GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGHLMPY (SEQ ID NO: 30)
1C7	GYSIT ... GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS ... GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGHNYPY (SEQ ID NO: 31)
1C10	GYSIT ... GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS ... GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGKNFPY (SEQ ID NO: 32)
1C12	GYSIT ... GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS ... GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGQLFPY (SEQ ID NO: 33)
1D10	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGHNLPY (SEQ ID NO: 34)
1E11	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11 N103D	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGDYFPY (SEQ ID NO: 35)
1G12	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGRYWPY (SEQ ID NO: 36)
1E11.C1	GFPIR...YGYS (SEQ ID NO: 55)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C2	GYPPIR...FGYS (SEQ ID NO: 56)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C3	GYPPIR...HGYS (SEQ ID NO: 57)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C4	GFPIG...QGYS (SEQ ID NO: 58)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C5	GYPPIW...GGYS (SEQ ID NO: 59)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C6	GYPPIG...GGYS (SEQ ID NO: 60)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.E1	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.E2	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.E3	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)

ES 2 651 692 T3

ID del clon	CDR1 pesada	CDR2 pesada	CDR3 pesada
1E11.E4	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.E5	GYSIT...GGYS (SEQ ID NO: 25)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C2E1	GYPIR...FGYS (SEQ ID NO: 56)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C2E3	GYPIR...FGYS (SEQ ID NO: 56)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C2E4	GYPIR...FGYS (SEQ ID NO: 56)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)
1E11.C2E5	GYPIR...FGYS (SEQ ID NO: 56)	IHYS...GYT (SEQ ID NO: 26)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)

Tabla 1B. Secuencias de CDR de VL de clones de anticuerpos que se unen y neutralizan TLR4

ID del clon	CDR1 Ligera	CDR2 Ligera	CDR3 Ligera
1A1	QSI.....SDH (SEQ ID NO: 37)	YA.....S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1A6	QSI.....SDH (SEQ ID NO: 37)	YA.....S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1B12	QSI.....SDH (SEQ ID NO: 37)	YA.....S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1C7	QSI.....SDH (SEQ ID NO: 37)	YA.....S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1C10	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1C12	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1010	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E11	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E11 N103D	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1G12	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E110C1	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E110C2	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E110C3	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)

ES 2 651 692 T3

ID del clon	CDR1 Ligera	CDR2 Ligera	CDR3 Ligera
1E110C4	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E110C5	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E110C6	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)
1E110E1	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61)
1E110E2	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYDEPFT (SEQ ID NO: 62)
1E110E3	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63)
1E110E4	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64)
1E110E5	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65)
1E110C2E1	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61)
1E110C2E3	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63)
1E110C2E4	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64)
1E110C2E5	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65)
1E110C2E5	QSI. . . . . SDH (SEQ ID NO: 37)	YA. . . . . S (SEQ ID NO: 38)	QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65)

Los anticuerpos de TLR4 de la invención y la descripción incluyen, por ejemplo, anticuerpos que tienen la combinación de secuencias de cadena pesada y cadena ligera que se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de VH y VL de clones de anticuerpos que se unen y neutralizan TLR4

ID del clon	Cadena pesada variable	Cadena Ligera variable
1A1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:4
1A6	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:4
1B12	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:4
1C7	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:4
1C10	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:4

ES 2 651 692 T3

ID del clon	Cadena pesada variable	Cadena Ligera variable
1C12	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:4
1D10	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:4
1E11	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4
1E11 N103D	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4
1G12	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4
1E11.C1	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:4
1E11.C2	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:4
1E11.C3	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:4
1E11.C4	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:4
1E11.C5	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:4
1E11.C6	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:4
1E11.E1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:79
1E11.E2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:81
1E11.E3	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:83
1E11.E4	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:85
1E11.E5	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:87
1 E11.C2E1	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:91
1 E11.C2E3	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:95
1 E11.C2E4	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:99
1 E11.C2E5	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:103

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 a modo de ejemplo de la divulgación es el anticuerpo 1E11 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ

ID NO: 2) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 1)

5 > Secuencia de aminoácidos de VH de 1E11

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKLEWNGYIHYSYTDNFNS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAIVYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 2)

Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACTGTTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACGAGGGTACAGTTTTCCGCTCACTTTCCGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11

EIVLTQSPDFQSIVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 10 GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSYTD (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo 1A1 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1A1 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 6) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 5, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1A1

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTC  
 CCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
 CGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
 CACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAA  
 GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTA  
 CTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCCGCTCTCCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT  
 CACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de aminoácidos de 1A1 VH

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYT  
 DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGRLLPYWGQGLTLTVSS  
 (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de ácidos nucleicos de VL de 1A1

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTC  
 ACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACA  
 GAAACCTGATCAGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGG  
 GGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAA  
 TAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTCAGCAGGGTTCACAGTTTCC  
 GCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de aminoácidos de VL de 1A1

5 EIVLTQSPDFQSVPKPKVTITCRASQSIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSR  
 FSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

10 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1A1 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGRLLPY (SEQ ID NO: 28). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1A1 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

15 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo 1A6 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1A6 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 8) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 7, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1A6

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTC  
 CCTCACCTGCGTGTCTCTGGTTACTCCATACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
 CGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
 CACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATACCATATCACGTGACACGTCCAA  
 GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTA  
 CTGTGCGAGAAAAGATAGCGGCAAGTGGTTGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG  
 TCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 7)

Secuencia de aminoácidos de VH de 1A6

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYT  
 DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGKWLPLYWGQGLTLTVSS  
 S (SEQ ID NO: 8)

20 Secuencia de ácidos nucleicos de VL de 1A6

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTC  
 ACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACA  
 GAAACCTGATCAGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGG  
 GGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAA  
 TAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTCAGCAGGGTTCACAGTTTCC  
 GCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de aminoácidos de VL de 1A6

## ES 2 651 692 T3

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSR  
FS GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1A6 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGKWLPLY (SEQ ID NO: 29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1A6 tienen las siguientes secuencias: QSIDSH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

10 Un ejemplo de anticuerpo monoclonal de TLR4 de la divulgación es el anticuerpo 1B12 descrito en la presente memoria. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1B12 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 9, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1B12

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTC  
CCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
CGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
CACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAA  
GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATAGCGGGCA  
CCTCATG CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 9)

15 > Secuencia de aminoácidos de VH de 1B12

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWGMGYIHYSGYT  
DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGHLMPYWGQGLVTVS  
S (SEQ ID NO: 10)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1B12

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTC  
ACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACA  
GAAACCTGATCAGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGG  
GGTCCCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAA  
TAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTGACAGGGTCACAGTTTTCC  
GCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA (SEQ ID NO: 3)

> Secuencia de aminoácidos de VL de 1B12

20 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSR  
FS GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

25 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1A6 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGHLMPY (SEQ ID NO: 30). Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo 1B12 tienen las siguientes secuencias: QSIDSH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

30 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo 1C7 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1C7 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 12) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 11, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1C7

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGGCACAACACTAC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 11)

> Secuencia de aminoácidos de VH de 1C7

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKLEWNGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGHNYPYWGQGLTVTVSS (SEQ ID  
 NO: 12)

5 > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1C7

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCACT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACAGGGTACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

> Secuencia de aminoácidos de VL de 1C7

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

10 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1C7 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGHNYPY (SEQ ID NO: 31). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1C7 tienen las siguientes secuencias: QSIDSH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

15 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 a modo de ejemplo de la divulgación es el anticuerpo 1C10 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1C10 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 14) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 13, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1C10

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCC  
 CCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
 CGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
 CACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAA  
 GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTA  
 CTGTGCGAGAAAAGATAGCGCAAGAAGTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG  
 TCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 13)

20

> Secuencia de aminoácidos de VH de 1C10

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSYGT  
DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGKNFPYWGQGLVTVS  
S (SEQ ID NO: 14)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1C10

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTC  
ACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACA  
GAAACCTGATCAGTCTCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGG  
GGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAA  
TAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
  
ACGTATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG  
GTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 3)

5 > Secuencia de aminoácidos de VL de 1C10

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSR  
FS GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

10 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1C10 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSYGT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGKNFPY (SEQ ID NO: 32). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1C10 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

15 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo 1C12 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1C12 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 16) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 15, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1C12

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTC  
CCTCACCTGCCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
CGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
CACTGACTTCAACCCCTCCTCAAGACTCGAATCACCATATCAGTGACACGTCCAA  
GAACGATTTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACTGCAGTGATTA  
CTGTGCGAGAAAAGATAGCGGCCAGTTGTTCCCTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGT  
CACTGTCTCTCC (SEQ ID NO: 15)

Secuencia de aminoácidos de VH de 1C12

20 QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSYGT  
DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGQLFPYWGQGLVTVSS  
(SEQ ID NO: 16)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1C12

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTC  
ACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACA  
GAAACCTGATCAGTCTCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGG  
GGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAA  
TAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTTCC  
GCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de aminoácidos de VL de 1C12

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSR  
 FS GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1C12 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGQLFPY (SEQ ID NO: 33). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1C12 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

10 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo 1D10 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1D10 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 18) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 17, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1D10

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATAGCGGCCACAACCTG  
 CCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 17)

> Secuencia de aminoácidos de VH de 1D10

15 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKLEWGMGYIHYSYTDNFNS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTVAVDYVCARKDSGHNLPLYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 18)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1D10

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTCACT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCCGGCGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

> secuencia de aminoácidos de VL de 1D10

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

20 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1D10 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGHNLPLY (SEQ ID NO: 34). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1D10 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

25 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 a modo de ejemplo de la divulgación es el anticuerpo 1E11 N103D descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11 N103D incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 20) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 19, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

30 > Secuencia de ácido nucleico de VH de IE11 N103D

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTC  
 CCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
 CGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
 CACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAA  
 GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTA  
 CTGTGCGAGAAAAGATTCCGGGCGACTACTCCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT  
 CACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 19)

> secuencia de aminoácidos de VH de IE11 N103D

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYT  
 DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGDYFPYWGQGLVTVS  
 S (SEQ ID NO: 20)

> secuencia de ácido nucleico de VL de IE11 N103D

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTC  
 ACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACA  
 GAAACCTGATCAGTCTCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGG  
 GGTCCCATCGAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAA  
 TAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTCAGCAGGGTACAGTTTTCC  
 GCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 3)

5

> secuencia de aminoácidos de VL de IE11 N103D

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQKPKDQSPKLLIKYASHAISGVPSR  
 FSGSGSFTDFTLINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

10

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11 N103D tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGDYFPY (SEQ ID NO: 35). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 N103D tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

15

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 a modo de ejemplo de la divulgación es el anticuerpo 1G12 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1G12 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 22) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 21, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1G12

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTC  
 CCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATA  
 CGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTA  
 CACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAA  
 GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTA  
 CTGTGCGAGAAAAGATTCCGGGCGGACTGGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT  
 TCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 21)

20

> Secuencia de aminoácidos de VH de 1G12

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYT  
 DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGRYWPYWGQGLVTVS  
 SS (SEQ ID NO: 22)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1G12

## ES 2 651 692 T3

```
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA
ACGTATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAA (SEQ ID NO: 3)
```

### > Secuencia de aminoácidos de VL de 1G12

```
EIVLVTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)
```

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1G12 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGRYWPY (SEQ ID NO: 36). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 N103D tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ IDNO: 39).

10 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C1 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C1 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 67) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 66, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 3.

### > Secuencia de ácido nucleico 1E11.C1 VH

```
CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC
TGCGCTGTCTCTGGTTTCCCGATCCGCTACGGGTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA
GGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCC
15 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTTCGGGCAACTACTTC
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 66)
```

### > Secuencia de aminoácidos de VH de 1E11.C1

```
QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGFPRIYGYSWHWIRQPPGKLEWVMGYIHYSGYTDFNPS
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAIVYCARKDSGNYPFYWGQGLVTVSS (SEQ ID
NO: 67)
```

### > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C1

```
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA
ACGTATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
20 ATCAAA (SEQ ID NO: 3)
```

### > Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11.C1

```
EIVLVTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)
```

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: GFPIRYGYS (SEQ ID NO: 55); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

10 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C2 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C2 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 69) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 68, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C2

```
CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC
TGCGCTGTCTCTGGTTACCCGATCCGGTTCGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA
GGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCC
CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCGGGCAACTACTTC
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 68)
```

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C2

```
QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYPPIRFYGSWHWIRQPPGKLEWMGYIHYSGYTDFNPS
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID
NO: 69)
```

15 > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C2

```
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACTACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTGAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA
ACGTATTACTGTGAGCAGGGTACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAA (SEQ ID NO: 3)
```

> Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C2

```
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS
GSGSGTDFLLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)
```

20 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C2 tienen las siguientes secuencias: GYPIRFYGS (SEQ ID NO: 56); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

25 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C3 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C3 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 71) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 70, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C3

## ES 2 651 692 T3

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
TGCGCTGTCTCTGGTTACCCCATCCGGCACGGGTACAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
GGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCC  
CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGGCAACTACTTC  
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 70)

### > Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C3

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYPIRHGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
NO: 71)

### > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C3

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACTACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCACT  
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
ACGTATTACTGTGACGAGGGTACAGTTTTCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

5

### > Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C3

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

10

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C3 tienen las siguientes secuencias: GYPIRHGYS (SEQ ID NO: 57); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

15

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C4 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C4 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 73) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 72, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

### > Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C4

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
TGCGCTGTCTCTGGTTTCCCGATCGGCCAGGGTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
GGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCC  
CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGGCAACTACTTC  
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 72)

20

### > Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C4

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGFPVIGQYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
NO: 73)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C4

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACGAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

> Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C4

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C4 tienen las siguientes secuencias: GFPIGQGY (SEQ ID NO: 58); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ejemplar es el anticuerpo 1E11.C5 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C5 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 75) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 74, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 3.

15 > Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C5

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGGCTGTCTCTGGTTACCCGATCTGGGGGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACCTGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGACC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCCGCCTCCACC (SEQ ID  
 NO: 74)

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C5

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYPWGGYSWHWIRQPPGKLEWMIYIHSGYTDNFNS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 75)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C5

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACGAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 3)

> Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C5

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C5 tienen las siguientes secuencias: GYPIWGGYS (SEQ ID NO: 59); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

10 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ejemplar es el anticuerpo 1E11.C6 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C6 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 77) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 76, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C5

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TCGCTGTCTCTGGTTACCCCATCGGCGCGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTC AAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCTGGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 76)

15 > Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C5

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYPGGYSWHWIRQPPGKLEWWMGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTA VYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 77)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C5

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCAACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCACT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTCCGCTCACTTTCTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAA (SEQ ID NO: 3)

> Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C5

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

25 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C6 tienen las siguientes secuencias: GYPIGGGYS (SEQ ID NO: 60); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11.C1 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39).

30 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.E1 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.E1 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 79) codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 78.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.E1

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 1)

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.E1

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAIVYCARKDSGNFYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 2)

5 > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.E1

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACTGTTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTCAAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTCAGCAGGGGAACGACTTCCCGGTGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 78)

> Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11.E1

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGNDFPVTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 79)

10 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.E1 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNFYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61).

15 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.E2 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.E2 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 81) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 80.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.E2

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 1)

20

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.E2

## ES 2 651 692 T3

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
NO: 2)

### > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.E2

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
ACGTATTACTGTGACAGGGGTACGACGAGCCGTTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
ATCAAA (SEQ ID NO: 80)

### > Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.E2

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
5 GSGSGTDFLLTINSLEAEDAATYYCQQGYDEPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 81)

10 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.E2 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYDEPFT (SEQ ID NO: 62).

15 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.E3 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.E3 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 83) codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 82.

### > Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.E3

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACC GGTGGTTATAGCTGGCACTGGATAACGGCAGCCCCCA  
GGGAAGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC  
CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTTCGGGCAACTACTTC  
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 1)

### > Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.E3

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
NO: 2)

### 20 > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.E3

## ES 2 651 692 T3

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
ACGTATTACTGTCAGCAGGGCTACGACTTCCCCTGACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
ATCAAA (SEQ ID NO: 82)

### > Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.E3

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGYDFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 83)

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.E3 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63).

10 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 a modo de ejemplo es el anticuerpo 1E11.E4 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.E4 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 85) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 84.

### > Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.E4

15 CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
GGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCC  
CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTTCGGGCAACTACTTC  
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 1)

### > Secuencia de aminoácidos de VH de 1E11.E4

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTA VYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
NO: 2)

### > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.E4

20 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
ACGTATTACTGTCAGCAGGGCTACGACTACCCCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
ATCAAA (SEQ ID NO: 84)

### > Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11.E4

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGYDYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 85)

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.E4 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64).

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.E5 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.E5 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 87) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 86.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.E5

```
CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCCTGTCCCTCACC
TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCAGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA
GGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC
CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC
TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC
CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 1)
```

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.E5

```
QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID
NO: 2)
```

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.E5

```
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC
ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG
TCTCCCAAGCTCCTCATCAAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA
ACGTATTACTGTGACGAGGGCTACGAGTCCCCTGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAA (SEQ ID NO: 86)
```

> Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11.E5

```
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGYEFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 87)
```

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.E5 tienen las siguientes secuencias: GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65).

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C2E1 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C2E1 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 89) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 88, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 91) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 90.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C2E1

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCCTGTCTCTGGTTACCCGATCCGGTTCGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 88)

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C2E1

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYPIRFGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAIVYVCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 89)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C2E1

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCTGAG  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACGAGGGGAACGACTTCCCGGTGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 90)

5

> Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C2E1

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGNDFPVTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 91)

10

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C2E1 tienen las siguientes secuencias: GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61).

15

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ejemplar es el anticuerpo 1E11.C2E3 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C2E3 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 93) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 92, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 95) codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 94.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C2E3

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCCTGTCTCTGGTTACCCGATCCGGTTCGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 92)

20

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C2E3

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYPIRFGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAIVYVCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 93)

> Secuencia de ácido nucleico 1E11.C2E3 VL

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTCAGCAGGGCTACGACTTCCCGTTGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAA (SEQ ID NO: 94)

> Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11.C2E3

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGYDFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 95)

- 5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C2E3 tienen las siguientes secuencias: GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSIDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63).

Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C2E4 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C2E4 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 97) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 96, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 99) codificada por la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 98.

15 > Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C2E4

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCGCTGTCTCTGGTTACCCGATCCGGTTCGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTTACACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTTCGGGCAACTACTTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 96)

> Secuencia de aminoácido de VH de 1E11.C2E4

QVQLQESGPGLVKPSDITLSLTCAVSGYPIRFGYSWHWIRQPPGKLEWMMGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 97)

20 > Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C2E4

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTCAGCAGGGCTACGACTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAA (SEQ ID NO: 98)

> Secuencia de aminoácidos de VL de 1E11.C2E4

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGYDYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 99)

5 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C2E4 tienen las siguientes secuencias: GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64).

10 Un anticuerpo monoclonal de TLR4 ilustrativo es el anticuerpo 1E11.C2E5 descrito en este documento. Como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E11.C2E5 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 101) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 100, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 103) codificada mediante la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 102.

> Secuencia de ácido nucleico de VH de 1E11.C2E5

CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACC  
 TGCGCTGTCTCTGGTTACCCGATCCGGTTCGGCTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCA  
 GGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTGACTTCAACCCCTCC  
 CTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC  
 TCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCAACTACTTC  
 CCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 100)

> Secuencia de aminoácidos de VH de 1E11.C2E5

15 QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYPIRFGYSWHWIRQPPGKLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
 LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSS (SEQ ID  
 NO: 101)

> Secuencia de ácido nucleico de VL de 1E11.C2E5

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATC  
 ACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACTGTTACCAACAGAAACCTGATCAG  
 TCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTCAGT  
 GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCA  
 ACGTATTACTGTGACGAGGGCTACGAGTTCCTGACTTTCCGGCGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAA (SEQ ID NO: 102)

> Secuencia de aminoácido de VL de 1E11.C2E5

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGYEFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 103)

20 Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son como se define por M.P. Lefranc (Véase Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology, J. Wiley and Sons, Nueva York suplemento 40, A1.P.1-A.1P.37 (2000) LIGM: 230). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E11.C2E5 tienen las siguientes secuencias: GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56); IHYSGYT (SEQ ID NO: 26); y ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E11 tienen las siguientes secuencias: QSISDH (SEQ ID NO: 37); YAS (SEQ ID NO: 38); y QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65).

30 Los anticuerpos de TLR4 de la invención se unen específicamente al complejo TLR4/MD-2 humano y/o mono cynomolgus, en donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos en TLR4 de humano y/o cynomolgus entre los residuos 325 y 374 de la SEQ ID NO: 23 (humana) y SEQ ID NO: 24 (mono cynomolgus). Alternativamente, en un aspecto de la divulgación, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1E11 N103D, 1G12, 1E11.C1, 1E11.C2 ,

1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6, 1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4, 1E11.E5, 1E11.C2E1, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5.

5 Los anticuerpos anti-TLR4 de la invención incluyen un anticuerpo alterado en el que al menos el residuo de aminoácido en la posición EU 325 y al menos el resto de aminoácido en la posición EU 328 en el dominio CH2 de la porción Fc del anticuerpo ha sido modificada. Por ejemplo, al menos el residuo de aminoácido en la posición EU 325 se ha sustituido con serina, y al menos el residuo de aminoácido en la posición EU 328 se ha sustituido con fenilalanina.

10 Estos anticuerpos anti-TLR4 con una porción Fc modificada provocan funciones efectoras modificadas, por ejemplo, una actividad del receptor Fc modificado, en comparación con un anticuerpo inalterado. Por ejemplo, el receptor de Fc humano es CD32A. En algunas realizaciones, estos anticuerpos anti-TLR4 desencadenan una prevención de la liberación de mediadores proinflamatorios después de la ligación a CD32A en comparación con un anticuerpo inalterado. Por lo tanto, estos anticuerpos anti-TLR4 provocan una actividad del receptor de Fc modificada, tal como la prevención de la liberación de mediadores proinflamatorios al mismo tiempo que retiene la capacidad de unirse a un antígeno objetivo. En algunas realizaciones, estos anticuerpos anti-TLR4 son anticuerpos neutralizantes, en donde el anticuerpo anti-TLR4 provoca una actividad del receptor Fc modificada, mientras retiene la capacidad de neutralizar una o más actividades biológicas de un antígeno objetivo.

20 Por ejemplo, los anticuerpos anti-TLR4 de la invención incluyen anticuerpos monoclonales que se unen al complejo de del receptor TLR4/MD-2 humano. Este complejo receptor se activa mediante el lipopolisacárido (LPS), el componente principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Los anticuerpos anti-TLR4 de la invención inhiben la activación del receptor y la señalización intracelular subsiguiente a través del LPS. Por lo tanto, los anticuerpos anti-TLR4 neutralizan la activación del complejo receptor TLR4/MD-2. En particular, la invención proporciona anticuerpos anti-TLR4 que reconocen el complejo receptor TLR4/MD-2 expresado en la superficie celular. Estos anticuerpos anti-TLR4 bloquean la producción de IL-8 inducida por LPS. Además, algunos anticuerpos anti-TLR4 de la invención también reconocen TLR4 cuando no están complejados con MD-2. El anticuerpo alterado es, por ejemplo, un anticuerpo humanizado.

25 Definiciones:

30 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular y proteína y química oligo o polinucleótidos y la hibridación descrita aquí son bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, suministro y tratamiento de pacientes.

35 Como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

45 Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Por "unirse específicamente" o "inmunorreaccionar con" o "unirse inmunoespecíficamente" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se une a una afinidad mucho menor ( $K_d > 10^{-6}$ ). Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, dAb (anticuerpo de dominio), monocatenarios,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  y  $F_{(ab)2}$ , scFv y una biblioteca de expresión de  $F_{ab}$ .

55 Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del terminal amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción del terminal carboxilo de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de humanos se relacionan con cualquiera de las

clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, como IgG1, IgG2 y otras. Además, en humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

5 El término "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto único de gen de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por él.

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

25 Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de células T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos contra péptidos del terminal N o del terminal C de un polipéptido. Un anticuerpo es el que se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es  $\leq 1 \mu\text{M}$ ; por ejemplo,  $\leq 100 \text{ nM}$ , preferiblemente  $\leq 10 \text{ nM}$  y más preferiblemente  $\leq 1 \text{ nM}$ .

35 Como se usa en el presente documento, los términos "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, donde una  $K_d$  más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo sitio de unión al antígeno/antígeno, donde esas velocidades dependen de las concentraciones de los socios del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por consiguiente, tanto la "constante de asociación" ( $K_{on}$ ) como la "constante disociación" ( $K_{off}$ ) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La relación de  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación  $K_d$ . (Véase, en general, Davies et al., (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Un anticuerpo de la presente invención es el que se une específicamente a su objetivo, cuando la constante de equilibrio de unión ( $K_d$ ) es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , por ejemplo,  $\leq 100 \text{ nM}$ , preferiblemente  $\leq 10 \text{ nM}$ , y más preferiblemente  $\leq 1 \text{ nM}$ , según lo medido por ensayos tales como ensayos de unión a radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

50 El término "polinucleótido aislado" como se usa en la presente memoria significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente enlazado a un polinucleótido al que no está enlazado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia mayor. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada, y las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera descritas aquí.

55 El término "proteína aislada" al que se hace referencia aquí significa una proteína de ADNc, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

5 El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a proteína nativa, fragmentos o análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, los fragmentos proteicos nativos y los análogos son especies del género polipeptídico. Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera descritas aquí, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos.

10 El término "de origen natural" tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluidos virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otro modo, es de origen natural.

15 El término "operativamente enlazado" como se usa en el presente documento se refiere a que las posiciones de los componentes que se describen están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "operativamente enlazada" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

20 El término "secuencia de control", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped en procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosomal y secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias guía y secuencias compañeras de fusión. El término "polinucleótido" como se denomina aquí significa una cadena polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena simple o doble.

30 Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Editores., Sinauer Associates, Sunderland Mass (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como aminoácidos  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N, N,N-trimetil-lisina,  $\epsilon$ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxi lisina,  $\sigma$ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de polipéptidos usada en este documento, la dirección de la mano izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección de la derecha es la dirección del terminal carboxilo, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

40 Como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de espacio predeterminados, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia.

Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras.

45 Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos conservadores preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

55 Como se analiza en este documento, se contemplan variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina incluidas en la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80% , 90%, 95%, y lo más preferiblemente 99%. En particular, se contemplan reemplazos conservadores de aminoácidos. 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 generalmente se dividen en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrofílicos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia hidroxialifática; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que 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 no tenga un efecto importante sobre la unión o propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio marco. Si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional puede determinarse fácilmente ensayando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los ensayos se describen en detalle en este documento. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los terminales amino y carboxilo preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferiblemente, los métodos de comparación informatizados se usan para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteína predichos que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al., *Science* 253: 164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) modifican las afinidades de unión, y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (preferiblemente sustituciones conservadoras de aminoácidos) en la secuencia de origen natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forman contactos intermoleculares. Una sustitución conservadora de aminoácidos no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia original). Ejemplos de polipéptidos reconocidos en la técnica de estructuras secundarias y terciarias se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., WH Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, editores., Garland Publishing, New York, NY (1991)) y Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991).

Como se usa en este documento, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de fracciones biotiniladas que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fosforos de lantánido), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo). En algunas realizaciones, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. El término "agente farmacéutico o fármaco" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.

Otros términos químicos de la presente invención se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

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

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

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos

10 Los anticuerpos anti-TLR4 proporcionados en la presente memoria reconocen el receptor TLR4/MD-2 de humano y/o mono cynomolgus expresado en la superficie celular. Los anticuerpos son capaces de bloquear, por ejemplo, neutralizar, la activación del receptor y la posterior señalización intracelular inducida por ligandos de TLR4, por ejemplo, LPS. Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos que se unen al complejo receptor TLR4/MD-2 de humano y mono cynomolgus y también se unen a TLR4 independientemente de la presencia de MD-2.

15 Los anticuerpos anti-TLR4 descritos en la presente memoria son anticuerpos que incluyen al menos una sustitución de aminoácido específica en la región constante de cadena pesada gamma de modo que el anticuerpo anti-TLR4 provoca alteraciones en la función efectora dependiente de antígeno mientras retiene la unión al antígeno en comparación a un anticuerpo inalterado. En una realización preferida de los anticuerpos anti-TLR4, la posición del aminoácido EU 325 de la región constante de cadena pesada gamma está sustituida con serina, y la posición del aminoácido EU 328 de la región constante de cadena pesada gamma está sustituida con fenilalanina, de modo que las posiciones EU 325 a 328 de la región constante de cadena pesada gamma del anticuerpo IgG1 humano alterado comprenden la secuencia de aminoácidos SKAF (SEQ ID NO: 42).

20 En una realización, los anticuerpos anti-TLR4 que reconocen el complejo TLR4/MD-2 de humano y cynomolgus tienen la capacidad de inhibir la producción de citoquina proinflamatoria inducida por LPS. La inhibición se determina, por ejemplo, en sangre humana completa y los ensayos con células HEK 293 transfectadas con huTLR4/MD-2 tales como los descritos en las Publicaciones PCT Números. WO2005/065015 y WO2007/110678.

25 También se incluyen en la descripción anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-TLR4 descritos en este documento. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TLR4 de la invención se unen específicamente a un complejo TLR4/MD-2 humano y/o cynomolgus, donde el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos en TLR4 de humano y/o mono cynomolgus entre los residuos 289 y 375 de la SEQ ID NO: 23 (humana) y la SEQ ID NO: 24 (cynomolgus). Por ejemplo, los anticuerpos de TLR4 se unen específicamente a un epítipo que incluye residuos seleccionados del grupo que consiste en al menos los residuos 328 y 329 de la SEQ ID NO: 23 (humana) y la SEQ ID NO: 24 (cynomolgus); al menos los residuos 349 a 351 de la SEQ ID NO: 23 (humana) y la SEQ ID NO: 24 (cynomolgus); y al menos los residuos 369 a 371 de la SEQ ID NO: 23 (humana) y SEQ ID NO: 24 (cynomolgus).

35 Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra un objetivo dado, tal como, por ejemplo, un receptor tipo Toll, el complejo TLR4/MD-2 humano y/o cynomolgus, o TLR4 cuando no está complejoado con MD-2, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de los mismos. (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

40 Los anticuerpos se purifican por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad que usa proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmune. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, se puede inmovilizar en una columna para purificar el anticuerpo inmune específico mediante cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas se discute, por ejemplo, por D. Wilkinson (*The Scientist*, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), páginas. 25-28).

45 Preferiblemente, los anticuerpos anti-TLR4 de la invención son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales anti-TLR4 se generan, por ejemplo, usando los procedimientos expuestos en las publicaciones PCT Nos. WO 2005/065015, WO 2007/110678 y/o WO 2009/101479. Los anticuerpos anti-TLR4 se generan, por ejemplo, usando los procedimientos expuestos en los Ejemplos proporcionados en este documento. Los anticuerpos anti-TLR4 también se generan, por ejemplo, inmunizando ratones BALB/c con combinaciones de transfectantes celulares que expresan altos niveles de un objetivo dado en su superficie. Los hibridomas resultantes de las fusiones de mieloma/célula B se criban a continuación para determinar su reactividad frente al objetivo seleccionado.

50 Los anticuerpos monoclonales se preparan, por ejemplo, usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de

producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

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

15 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan una expresión estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma  
 20 de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales. (Véase Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pp. 51-63)).

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

30 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándar. (Véase Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) páginas 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

35 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

40 Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos No 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra forma no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase la patente de Estados Unidos No 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)). o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificadora de un polipéptido diferente de inmunoglobulina. Tal polipéptido diferente de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

55 Los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Estos anticuerpos son adecuados para la administración a humanos sin engendrar una respuesta inmune por el humano contra la inmunoglobulina administrada. Las formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que están principalmente compuestas por la secuencia de una inmunoglobulina

humana, y contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. La humanización se realiza, por ejemplo, siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen, et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Véase también la patente de Estados Unidos No. 5.225.539). En algunos casos, los residuos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también comprenden, por ejemplo, residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado incluye sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también incluye de forma óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988 y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)).

Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en las que la secuencia completa tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, que incluye las CDR, surge de genes humanos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos completamente humanos" en este documento. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales (véase Cole, et al., 1985 en: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., páginas. 77-96). Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, et al., 1985 en: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., páginas. 77-96).

Además, los anticuerpos humanos también se pueden producir usando técnicas adicionales, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos. (Véase Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a aquella que se observa en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Inter. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

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

Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena se describe en la patente de los Estados Unidos No 5.939.598. Puede obtenerse mediante un método, que incluye eliminar los genes del segmento J de al menos un locus de cadena pesada endógeno en una célula madre embrionaria para evitar la reorganización del locus y evitar la formación de una transcripción de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada, la eliminación se efectúa mediante un vector de direccionamiento que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y produciendo a partir de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.916.771. Este método incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de

nucleótidos que codifica una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera en otra célula huésped de mamífero y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

- 5 En una mejora adicional de este procedimiento, en la publicación PCT WO99/53049 se describe un método para identificar un epítipo clínicamente relevante en un inmunógeno y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se une específicamente al epítipo relevante con alta afinidad.

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

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

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

- 20 Los vectores virales introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores del virus de viruela aviar dan como resultado solo una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se prefieren vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados y vectores del virus del herpes simple (HSV) para introducir el ácido nucleico en las células neuronales. El vector de adenovirus da como resultado una expresión a más corto plazo (aproximadamente 2 meses) que el virus adenoasociado (aproximadamente 4 meses), que a su vez es más corta que los vectores de HSV. El vector particular elegido dependerá de la célula objetivo y la condición que se trate. La introducción puede ser mediante técnicas estándar, por ejemplo, infección, transfección, transducción o transformación. Los ejemplos de modos de transferencia génica incluyen, por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con CaPO<sub>4</sub>, DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección celular y vectores virales.

- 25 El vector puede emplearse para dirigirse esencialmente a cualquier célula objetivo deseada. Por ejemplo, la inyección estereotáxica se puede usar para dirigir los vectores (por ejemplo, adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Además, las partículas pueden administrarse mediante infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión de minibomba, tal como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en el flujo a granel, denominado convección, también ha demostrado su eficacia en el suministro de moléculas grandes a áreas extendidas del cerebro y puede ser útil para suministrar el vector a la célula objetivo. (Véase Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol., 266: 292-305 (1994)). Otros métodos que se pueden usar incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vías de administración oral u otras conocidas.

- 30 El vector puede emplearse para dirigirse esencialmente a cualquier célula objetivo deseada. Por ejemplo, la inyección estereotáxica se puede usar para dirigir los vectores (por ejemplo, adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Además, las partículas pueden administrarse mediante infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión de minibomba, tal como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en el flujo a granel, denominado convección, también ha demostrado su eficacia en el suministro de moléculas grandes a áreas extendidas del cerebro y puede ser útil para suministrar el vector a la célula objetivo. (Véase Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol., 266: 292-305 (1994)). Otros métodos que se pueden usar incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vías de administración oral u otras conocidas.

- 35 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un objetivo tal como TLR4, MD-2, complejo TLR4/MD-2 de humano y/o cynomolgus o cualquier fragmento del mismo. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o receptor o subunidad receptora de la superficie celular.
- 40 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un objetivo tal como TLR4, MD-2, complejo TLR4/MD-2 de humano y/o cynomolgus o cualquier fragmento del mismo. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o receptor o subunidad receptora de la superficie celular.

- 45 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un objetivo tal como TLR4, MD-2, complejo TLR4/MD-2 de humano y/o cynomolgus o cualquier fragmento del mismo. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o receptor o subunidad receptora de la superficie celular.

- 50 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un objetivo tal como TLR4, MD-2, complejo TLR4/MD-2 de humano y/o cynomolgus o cualquier fragmento del mismo. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o receptor o subunidad receptora de la superficie celular.

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulinas, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta generalmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida incluye al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la o las cadenas laterales grandes se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando un enlace químico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se oxidaron nuevamente para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. De acuerdo con esto, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se fuerzan para aparearse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. Otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena única (sFv) también ha sido reportada Véase, Gruber et al., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994).

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

Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en el antígeno de proteína de la invención. Alternativamente, un brazo antiantigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7) o receptores de Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno de proteína descrito en la presente memoria y se une adicionalmente al factor tisular (TF).

Los anticuerpos heteroconjugados también se describen en el presente documento. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (véase la patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (véanse los documentos WO 91/00360, WO 92/200373, EP 03089). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 4.676.980.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la señalización de LPS aberrante. Por ejemplo, el o los residuos de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo

5 puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Véase Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener lisis de complemento mejorada y capacidades de ADCC. (Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

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

10 Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no enlazantes de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modoecina A, sarcina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re.

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

20 Los expertos en la técnica reconocerán que se puede acoplar una gran variedad de fracciones posibles a los anticuerpos resultantes de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse y R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, Nueva York, (1989)).

25 El acoplamiento se puede realizar mediante cualquier reacción química que una a las dos moléculas siempre que el anticuerpo y la otra fracción retengan sus actividades respectivas. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. La unión preferida es, sin embargo, unión covalente. La unión covalente puede lograrse mediante condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes de enlace bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteínas, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametildiaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino, más bien, es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véase Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984), Jansen et al., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982), y Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)).

30 Los enlazadores preferidos se describen en la literatura. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44: 201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también la patente de Estados Unidos No. 5.030.719, que describe uso de un derivado de acetil hidracida halogenado acoplado a un anticuerpo por medio de un enlazador oligopeptídico. Los enlazadores particularmente preferidos incluyen: (i) EDC clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida, (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP hexanoato de (succinimidil-6[3-(2-piridilditio)-propionamida] (Pierce Chem. Co., Cat. # 21651-G); (iv) Sulfo-LC-SPDP hexanoato de(sulfosuccinimidil-6[3-(2-piridilditio)-propionamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat. # 2165-G); y (v) Sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., Cat. # 24510) combinado con EDC.

35 Los enlazadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, lo que conduce a combinados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los ésteres de Sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de Sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen éster de NHS son menos solubles que los ésteres de Sulfo-NHS. Además, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro estéricamente impedido, y puede formar combinados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro, en general, son menos estables que otros enlaces debido a que el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado un menor combinado disponible. Sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tales como EDC) cuando se usan junto con Sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y la patente de los EE. UU. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de los EE.UU. número 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina que forma derivado con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

#### Uso de anticuerpos anti-TLR4

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una transferencia, suministro, tolerancia y similares mejorados. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el Capítulo 87 por Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípido (catiónico o aniónico) (tal como Lipofectin<sup>MR</sup>), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada para uso en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, con la condición de que el ingrediente activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2): 210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". J Pharm Sci. 89(8): 967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) y las citas en el mismo para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Las formulaciones terapéuticas, que incluyen un anticuerpo anti-TLR4 de la invención, se usan para tratar o aliviar un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmune. La presente invención también proporciona el anticuerpo de la invención para uso en el tratamiento o alivio de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmune. Se lleva a cabo un régimen terapéutico identificando un sujeto, por ejemplo, un paciente humano que padece (o está en riesgo de desarrollar) un trastorno relacionado con el sistema inmune, usando métodos estándar. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TLR4 de la invención son herramientas terapéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o trastornos inflamatorios. En ciertas realizaciones, el uso de anticuerpos anti-TLR4 que modulan, por ejemplo, inhiben, neutralizan o interfieren con la señalización de TLR, se contempla para tratar enfermedades autoinmunes y/o trastornos inflamatorios.

Las enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con un componente autoinmune), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmune (ATP), enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, dermatitis herpetiforme celiaca; síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de cresta, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis esclero derma (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjogren, síndrome de hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitiligo y granulomatosis de Wegener .

Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra huésped, anemias hemolíticas, osteoartritis, sepsis, apoplejía, trasplante de tejido y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-TLR4 son útiles en el tratamiento de inflamación aguda y sepsis inducida por productos microbianos (por ejemplo, LPS) y exacerbaciones que surgen de esta inflamación aguda, tales como, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma (véase O'Neill, Curr. Opin. Pharmacol., 3: 396-403 (2003), incorporado en este documento como referencia en su totalidad). Dichos anticuerpos también son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes neurodegenerativas. (Lehnardt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8514-8519 (2003)).

Además, los anticuerpos de la invención también son útiles como reactivos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades, tales como, por ejemplo, osteoartritis, que son causadas por estrés, por ejemplo, estrés celular, que, a su vez, induce factores de "estrés" solubles endógenos que desencadenan TLR4. El factor de estrés soluble endógeno incluye, por ejemplo, Hsp60 (véase Ohashi et al., J. Immunol. 164: 558-561 (2000)) y fibronectina (véase Okamura et al., J. Biol. Chem. 276: 10229-10233 (2001)) y sulfato de heparina, hialuronano, gp96,  $\beta$ -Defensina-2 o proteína A surfactante (véase, por ejemplo, Johnson et al., Crit. Rev. Immunol., 23 (1-2): 15-44 (2003)). Los anticuerpos de la invención también son útiles en el tratamiento de una variedad de trastornos asociados con el estrés, tales como, por ejemplo, el estrés celular que está asociado con sujetos y pacientes colocados en respiradores, ventiladores y otros dispositivos de ayuda respiratoria. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención es útil en el tratamiento de la lesión pulmonar inducida por el ventilador ("VILI"), también denominada lesión pulmonar asociada a la ventilación ("VALI").

Otras áreas de enfermedad en las que la función inhibidora de TLR4 podría ser beneficiosa incluyen, por ejemplo, inflamación crónica (por ejemplo, inflamación crónica asociada con condiciones alérgicas y asma), enfermedades autoinmunes (por ejemplo, trastorno inflamatorio intestinal) y aterosclerosis (véase O'Neill, Curr. Opin. Pharmacol., 3: 396-403 (2003)).

Los síntomas asociados con estos trastornos relacionados con el sistema inmune incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, malestar general, fiebre, dolor, a menudo localizado en el área inflamada, pulso rápido, dolor o molestias en las articulaciones (artralgia), respiración rápida u otros patrones de respiración anormal, escalofríos, confusión, desorientación, agitación, mareos, tos, disnea, infecciones pulmonares, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria, edema, aumento de peso, recaídas mucopurulentas, caquexia, sibilancia, dolor de cabeza y síntomas abdominales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento.

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

Los métodos para el cribado de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en el arte.

Los anticuerpos dirigidos contra un objetivo tal como TLR2, CD14, TLR4, MD-2, el complejo TLR4/MD-2 o cualquier receptor tipo Toll (o un fragmento del mismo) se pueden usar en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de estos objetivos, por ejemplo, para uso en la medición de niveles de estos objetivos dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos de diagnóstico, para uso en la formación de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, los anticuerpos específicos de cualquiera de estos objetivos, o derivado, fragmento, análogo u homólogo de los mismos, que contienen el dominio de unión al antígeno derivado de anticuerpos, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo "Terapéuticos").

Un anticuerpo anti-TLR4 de la invención se puede usar para aislar un objetivo particular usando técnicas estándar, tales como inmunoafinidad, cromatografía o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-TLR4 de la invención (o un fragmento de los mismos) se pueden usar en forma diagnóstica para controlar los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar acoplando (es decir, enlazando físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S o <sup>3</sup>H.

Los anticuerpos de la invención, que incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados y completamente humanos, pueden usarse como agentes terapéuticos. Tales agentes se emplearán generalmente para tratar o prevenir una enfermedad o patología asociada con la expresión aberrante o la activación de un objetivo dado en un sujeto. Se administra al sujeto una preparación de anticuerpo, preferiblemente una que tiene alta especificidad y alta afinidad por su antígeno objetivo, y generalmente tendrá un efecto debido a su unión con el objetivo. La administración del

anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la función de señalización del objetivo. La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la unión del objetivo con un ligando endógeno al que se une de forma natural. Por ejemplo, el anticuerpo se une al objetivo y neutraliza la producción de citoquina proinflamatoria inducida por LPS.

5 Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención se refiere generalmente a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Como se indicó anteriormente, esta puede ser una interacción vinculante entre el anticuerpo y su antígeno objetivo que, en ciertos casos, interfiere con el funcionamiento del objetivo. La cantidad requerida para administrar dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que un anticuerpo administrado se agota del volumen libre del otro sujeto al que se administra. Los intervalos comunes para la dosificación terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

15 Los anticuerpos o uno de sus fragmentos de la invención se pueden administrar para el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos en forma de composiciones farmacéuticas. Los principios y consideraciones involucrados en la preparación de tales composiciones, así como la orientación en la elección de los componentes, se proporcionan, por ejemplo, en Remington: The Science And Practice of Pharmacy, 19ª ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., Editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

20 Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína objetivo. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia de proteína objetivo. Tales péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

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

35 Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

40 Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT<sup>MR</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y Ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etilenvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

45 Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede usarse como un agente para detectar la presencia de un objetivo dado (o un fragmento de proteína del mismo) en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Los anticuerpos son policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se usa un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab, scFv o F(ab)<sub>2</sub>). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente y el marcado final de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada de forma fluorescente. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Incluido dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, se encuentra la sangre y una fracción o componente de la sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el

método de detección puede usarse para detectar un ARNm, proteína o ADN genómico de un analito en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un ARNm de analito incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína de analito incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de un ADN genómico de analito incluyen hibridaciones Southern. Se describen procedimientos para realizar inmunoensayos, por ejemplo, en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína de analito incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo de antiproteína de analito marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas de imagenología estándar.

#### Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos de la invención o polipéptidos quiméricos solubles de la divulgación (también denominados en la presente memoria como "compuestos activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones típicamente comprenden el anticuerpo o el polipéptido quimérico soluble y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

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

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL<sup>MR</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de tal manera que exista facilidad de administración mediante jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente de forma estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para usar como enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se ingiere. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o sabor de naranja.

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

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

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

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación están dictadas y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que debe lograrse, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, empaque o dispensador junto con instrucciones para la administración.

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

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1. Generación de transfectantes estables de TLR4 de mono cynomolgus y TLR4/MD-2 humano

Se generaron transfectantes estables de TLR4 de mono cynomolgus y TLR4/MD-2 humano en células CHO-K1 basándose en las secuencias que se describen a continuación.

> Secuencia de aminoácidos de TLR4 humano

MMSASRLAGTLIPAMAFLSCVRPESWEPCVEVVPNITYQCMELNIFYKIPDNLPFSTKNL  
DLSFNPLRHLGYSFFSFPPELQVLDLSRCEIQTIEDGAYQSLSHLSTLILTGNPIQSLALGAF  
SGLS

SLQKLVAVETNLASLENFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSFKLPEYFSNLTNLEHLDLSSNKIQS  
IYCTDLRVLHQMPLLNLSLDLSLNPINFIQPGAFKEIRLHKLTLRNNFDSLNMKTCIQGLAG  
LEVHRLVLGFEFRNEGNLEKFDKSALEGLCNLTIEEFRLAYLDYLLDDIIDLFNCLTNVSSFSL  
VSVTIERVKDFSYNFGWQHLELVNCKFGQFPPTLKLKSLKRLTFTSNKGGNAFSEVDLPSLEFL  
DLSRNGLSFKGCCSQSDFGTTSLKYLDLSFNGVITMSSNFLGLEQLEHLDFQHSNLKQMSSEFS  
VFLSLRNLIYLDISHHTRVAFNGIFNGLSSLEVLKMGNSFQENFLPDI FTTELRLNLTFLDLS  
QCQLEQLSPTAFNSLSSQLVNLMSHNNFFSLDTFPYKCLNSLQVLDYSLNHIMTSKKQELQHF  
PSSLAFNLNTQNDFACTCEHQSFLOWIKDQRQLLVEVERMECATPSDKQGMPLVSLNITCQMN  
KTIIGVSVLSVLVSVVAVLVYKIFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELV  
KNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANI IHEGFHKSARKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQT  
WQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGG  
SWNPEGTVGTGCNWQEATSI (SEQ ID NO: 23)

> Secuencia de aminoácidos de TLR4 de mono Cynomolgus

MTSALRLAGTLIPAMAFLSCVRPESWEPCVEVVPNITYQCMELKIFYKIPDNI PFSTKNLDLSF  
NPLRHLGYSYFLRFPELQVLDLSRCEIQTIEDGAYQSLSHLSTLILTGNPIQSLALGAFSGLS  
SLQKLVAVETNLASLENFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSFKLPEYFSNLTNLEHLDLSSNKIQN  
IYCKDLQVLHQMPLSNLSLDLSLNPINFIQPGAFKEIRLHKLTLRSNFDLNMKTCIQGLAG  
LEVHRLVLGFEFRNERNLEEFDKSSLEGLCNLTIEEFRLTYLDCYLDNIIDLFNCLANVSSFSL  
VSVNIKRVEDFSYNFRWQHLELVNCKFEQFPTLELKLKSLKRLTFTANKGGNAFSEVDLPSLEFL  
DLSRNGLSFKGCCSQSDFGTTSLKYLDLSFNDVITMSSNFLGLEQLEHLDFQHSNLKQMSQFS  
VFLSLRNLIYLDISHHTRVAFNGIFDGLLSLKVLMAGNSFQENFLPDI FTDLKNTFLDLS  
QCQLEQLSPTAFDTLNKQLVNLMSHNNFFSLDTFPYKCLPSLQVLDYSLNHIMTSNNQELQHF  
PSSLAFNLNTQNDFACTCEHQSFLOWIKDQRQLLVEAERMECATPSDKQGMPLVSLNITCQMN  
KTIIGVSVFVSVVAVLVYKIFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELV  
KNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANI IHEGFHKSARKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQT  
WQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGQHIFWRRLRKALLDGG  
SWNPEEQ (SEQ ID NO: 24)

5 Para células CHO-K1, el ADNc de TLR4 humano que codifica una etiqueta del epítipo c-Myc del terminal N y el ADNc de TLR4 de mono cynomolgus se clonaron en pCDNA3.1 (-) hygro (Invitrogen), y ADNc de MD-2 humano que codifica c-Myc del terminal C y las etiquetas del epítipo de Proteína C se clonaron en pCDNA3 (Invitrogen). Los constructos TLR4 humano y MD-2 humano se cotransfectaron en células CHO usando el reactivo Fugene 6<sup>MR</sup> (Roche), de acuerdo con las directrices del fabricante. Las células resistentes a antibióticos se seleccionaron en medio de cultivo que  
10 contenía 500 µg/mL de G418 y 250 µg/mL de higromicina B (ambos de Invitrogen). El constructo de TLR4 de mono Cynomolgus se transfeció en células CHO utilizando el reactivo Fugene 6<sup>MR</sup> (Roche), de acuerdo con las directrices del fabricante y se cultivaron como se describió anteriormente.

15 Para seleccionar células que expresan el complejo TLR4/MD-2 humano o TLR4 de mono cynomolgus, se incubaron 1x 10<sup>7</sup> células CHO/mL en 1x PBS complementado con BSA al 1% y 10 µg/mL de anticuerpo monoclonal antiproteína C (Roche) o 10 µg/mL de anticuerpo monoclonal proteína 1 C6 anti-TLR4 (NovImmune SA). Las células se lavaron una vez y luego se incubaron en el mismo regulador con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con PE (H+L) (dilución 1:200; Anwara). Posteriormente, las células se incubaron con microperlas anti-PE (Miltenyi Biotec) y se pasaron a través de una columna Midi MACS LS. Las células retenidas en la columna se eluyeron y se volvieron a colocar en cultivo con  
20 selección de antibióticos. Se continuaron las rondas de clasificación hasta que se obtuvieron poblaciones uniformemente positivas de células que expresaban el complejo TLR4/MD-2 humano y se obtuvieron TLR4 de mono cynomolgus.

Ejemplo 2. Aleatorización de CDR de anticuerpo 15C1 y selecciones de superficie celular

El anticuerpo humanizado anti-TLR4 15C1 (como se describe en la patente de los Estados Unidos 7.674.884, mostrada en el presente documento como las SEQ ID NOs: 43 y 4 a continuación) se sometieron a aleatorización de secuencia para obtener anticuerpos que se unen a TLR4 de mono cynomolgus y/o humano capaces de neutralizar la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS mediada por TLR4.

> Secuencia de aminoácidos de VH de 15C1

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWVMGYIHYSGYT  
DFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARKDPSDAFPYWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 43)

> Secuencia de aminoácidos de VL de 15C1

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSSISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 4)

10 Las regiones V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 43) y V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo 15C1 humanizado se clonaron en el vector pNDS descrito en Ravn et al., (Nucleic Acids Res. 2010 Nov; 38 (21): e193). Brevemente, la región V<sub>H</sub> se clonó en el marco de la secuencia guía PelB usando un sitio de restricción NcoI en 5' y un sitio de restricción XhoI en 3'. Luego, la región V<sub>L</sub> se insertó en el marco de una secuencia enlazadora utilizando la enzima de restricción Sall en 5' y la enzima de restricción NotI en 3' para formar un constructo que codifica para el scFv de 15C1 fusionado en su parte terminal C a las etiquetas 6xHis y c-Myc y la proteína pIII.

Luego, se aleatorizaron tramos de 5 residuos en la CDR3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 44) o cadena ligera (SEQ ID NO: 48) para generar 6 bibliotecas (tamaño de biblioteca que varía de 5x10<sup>7</sup> a 2x10<sup>8</sup>). Las diferentes bibliotecas generadas se muestran a continuación en la Tabla 3 y la Tabla 4 donde X representa cualquier aminoácido.

Tabla 3. Bibliotecas de aleatorización de CDRH3 de 15C1.

<u>CDRH3 de 15C1 (SEQ ID NO: 44)</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>
<u>Biblioteca 1 (SEQ ID NO: 45)</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>
<u>Biblioteca 2 (SEQ ID NO: 46)</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>
<u>Biblioteca 3 (SEQ ID NO: 47)</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>

Tabla 4. Bibliotecas de aleatorización de CDRL3 de 15C1

<u>CDRL3 de 15C1 (SEQ ID NO: 48)</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>I</u>
<u>Biblioteca 4 (SEQ ID NO: 49)</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>L</u>	<u>I</u>
<u>Biblioteca 5 (SEQ ID NO: 50)</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>
<u>Biblioteca 6 (SEQ ID NO: 51)</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>P</u>	<u>X</u>	<u>I</u>

Se realizaron cinco rondas de selección usando estas bibliotecas y se realizó el cribado de las variantes con las actividades deseadas usando extractos periplásmicos de scFv. En resumen, se bloquearon alícuotas de bibliotecas de fagos de scFv modificadas con 15C1 (10<sup>12</sup> Pfu) con PBS que contenía leche desnatada al 3% (p/v) durante una hora a

temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Los fagos bloqueados se deseleccionaron luego durante una hora a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> sobre células CHO (en un matraz T75 con 80% de confluencia) que se habían bloqueado previamente con PBS que contenía leche desnatada al 2% (p/v). Los fagos deseleccionados se incubaron a continuación en células CHO que expresaban TLR4 de mono cynomolgus durante tres horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las células se lavaron luego diez veces con PBS. Los fagos unidos se eluyeron mediante la adición de 1 mL de ácido cítrico 75 mM seguido de neutralización con 280 µL de Tris-HCl pH 9. Luego, se añadieron 10 mL de TG1 en crecimiento exponencial al matraz T75 e incubando durante una hora a 37°C con agitación lenta. Una alícuota del TG1 infectado se diluyó en serie para valorar el resultado de la selección. TG1 infectado se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos y se resuspendió en 0,5 mL de 2x TY-AG (medio 2x TY que contenía 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 2%) y se extendió en placas de bioensayo agar 2x TYAG. Después de una noche de incubación a 30°C, se añadieron 10 mL de 2x TYAG a las placas y las células se rasparon de la superficie y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 mL. Se añadió 2x TYAG que contenía 50% de glicerol a la suspensión celular para obtener una concentración final de 17% de glicerol. Las alícuotas de la ronda de selección se mantuvieron a -80°C.

### Ejemplo 3. Cribado de variantes de scFv de 15C1

Los procedimientos generales para la construcción y manipulación de bibliotecas de scFv humanas se describen en Vaughan et al., (Nat. Biotech., 1996, 14: 309-314). Bibliotecas de variantes de scFv de 15C1 se criban contra TLR4 de mono cynomolgus de acuerdo con el siguiente procedimiento.

#### Preparación de ScFv periplasmática para cribado

Después de cinco rondas de selecciones en células CHO que expresan TLR4 de mono cynomolgus en la membrana, se recogieron clones individuales en una placa de microtitulación de pozos profundos que contiene 0,9 mL de medio 2xTYAG (glucosa al 0,1%) por pozo y se cultivaron a 37°C durante 5-6h (250 rpm). A continuación, se añadieron 100 µL por pozo de IPTG 0,2 mM en medio 2xTY para obtener una concentración final de IPTG 0,02 mM. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Las placas de pozos profundos se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. Los sedimentos se resuspendieron en 150 µL de regulador TES (Tris/HCl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), sacarosa al 20%, complementado con inhibidor completo de proteasa, Roche). Se produjo un choque hipotónico añadiendo 150 µL de regulador TES diluido (dilución 1:5 de TES: agua) e incubación en hielo durante 30 minutos. Las placas se centrifugaron luego a 4.000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células y los desechos. Los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente a otra placa de microtitulación y se mantuvieron en hielo para su análisis inmediato en ensayos de cribado

#### Preparación de fagos monoclonales para cribado

Se recogieron clones individuales en una placa de microtitulación que contenía 150 µL de medio 2xTYAG (glucosa al 2%) por pozo y se cultivaron a 37°C (100-120 rpm) durante 5-6 h. Se añadió el fago auxiliar M13K07 a cada pozo para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 10 (es decir, 10 fagos para cada célula en el cultivo) y se incubó a 37°C (100 rpm) durante 1 h. Después del cultivo, las placas se centrifugaron a 3.200 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente, las células se resuspendieron en 150 µL de medio 2xTYAK y se cultivaron durante la noche a 30°C (120 rpm). Las placas se centrifugaron a continuación durante 10 minutos a 3.000 rpm y el sobrenadante que contenía el fago se concentró a continuación mediante precipitación con PEG. Brevemente, los fagos se precipitaron mediante la adición de 1/3 de volumen de PEG 8.000 frío al 20%, NaCl 2,5 M al sobrenadante que contenía el fago. La mezcla se incubó en hielo durante 1 h y luego se centrifugó 15 minutos a 8.000 rpm a 4°C. El sedimento de fagos se resuspendió en 500 µL de regulador TE.

#### Cribado de scFv

En resumen, se distribuyeron células CHO-K1 y se transfectaron en forma estable CHO-K1 que expresan TLR4 de mono cynomolgus en placas ópticas de 384 pozos FMAT® (Applied Biosystems) a una densidad de 5.000 células por pozo (en 50 µL de DMEM F12, 10% de FCS, Gln 2 mM), 24 horas antes del ensayo de cribado. El día 0, las células se mezclaron con un pequeño volumen de preparación periplásmica de scFv (40 µL por pozo) y 10 µL de conjugado Penta-His Alexa Fluóor 647 (dilución 1:200, QIAGEN). Después de un período de incubación de 1 a 8 horas, se midió la fluorescencia de las células en un analizador Cellular Detection System 8200 (Applied Biosystems). Se retuvieron los clones de scFv que se unen a CHO-K1 que expresan TLR4 de mono cynomolgus pero no a células CHO-K1 de tipo silvestre y se sometieron a análisis adicionales. Los clones seleccionados fueron 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11 y 1G12.

#### Fago monoclonal que se une a TLR4 de mono cynomolgus y humano

Se incubaron 10<sup>5</sup> células CHO o células CHO que expresan el TLR4 de mono cynomolgus en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% con diferentes concentraciones de fagos monoclonales precipitados que expresan scFv seleccionados por FMAT (1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1G12). Como control, se

5 expresó también scFv de 15C1 parental como fago monoclonal para la prueba de unión. Las células se lavaron luego y se incubaron en el mismo regulador con anticuerpo monoclonal para M13, fd, fagos filamentosos F1-FITC (1:50, anticuerpos Acris). Las células se analizaron finalmente usando un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). La Figura 1 muestra el análisis FACS de estas células después de la tinción de anticuerpos, que reveló que 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11 y 1G12 reconocieron células que expresan solo TLR4 de mono cynomolgus, a diferencia de 15C1 que no se une a estas células. Además, estos resultados sugieren que los scFv probados son específicos de la proteína TLR4 de mono cynomolgus ya que no se unieron a las células CHO nativas.

10 De forma similar, se incubaron  $10^5$  células CHO o células CHO que expresan el complejo TLR4/MD-2 humano en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% con diferentes concentraciones de los fagos monoclonales precipitados que expresan scFv como se describió anteriormente. La Figura 2 muestra el análisis FACS de estas células después de la tinción del anticuerpo, que reveló que 1E11 reconoció células que expresan el complejo TLR4/MD-2 humano, de forma similar a 15C1 pero no a 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10 y 1G12. Estos resultados sugieren que los scFv 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10 y 1G12 son específicos de TLR4 de mono cynomolgus y que 1E11 es de reactividad cruzada para TLR4 humano y de mono cynomolgus.

15 Ejemplo 4. Reformateo de scFv en formato de IgG y unión de IgG a TLR4 de mono cynomolgus y humano

Reformateo, producción y purificación

20 La secuencia de  $V_H$  y  $V_L$  de scFv seleccionados (1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1G12) se amplificaron con oligonucleótidos específicos que introducen una secuencia guía en el extremo 5'. Las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  amplificadas se clonaron en el vector de expresión de mamífero en el marco con dominios de IgG1 humana constante y Kappa constante, respectivamente. Las construcciones se verificaron por secuenciación antes de la transfección en células de mamífero.

25 Las secuencias de ADNc de  $V_H$  y  $V_L$  en sus vectores de expresión apropiados se transfectaron en células de mamífero usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche, Basilea, Suiza). En resumen, los picos de células se cultivaron en placas de 6 pozos a una concentración de  $6 \times 10^5$  células por pozo en 2 mL de medio de cultivo que contenía suero bovino fetal. Los vectores de expresión, que codifican las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  candidatas, se cotransfectaron en las células usando el reactivo de transfección Fugene 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un día después de la transfección, se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 3 mL de medio fresco sin suero a las células y se cultivaron durante tres días a 37°C. Después de un período de cultivo de tres días, el sobrenadante se recolectó para IgG purificada en columnas de flujo rápido de proteína G-Sefarosa 4B (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sobrenadantes de las células transfectadas se incubaron durante la noche a 4°C con regulador de unión a IgG ImmunoPure (G) (Pierce, Rockford IL). Las muestras se pasaron a continuación sobre columnas de flujo rápido de Proteína G-Sefarosa 4B y la IgG se purificó en consecuencia usando regulador de elución. La fracción de IgG eluida se dializó a continuación contra PBS y se cuantificó el contenido de IgG por absorción a 280 nm. La pureza y la integridad de IgG se verificaron mediante SDS-PAGE.

35 Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del anticuerpo 1E11 reformateado con IgG1 se muestran a continuación:

> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 1E11

```

QVQLQESGPGLVKPSDITLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSSTAVDVTAVYYCARKDSGNYPFYWGQGLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPG (SEQ ID NO: 40)
    
```

> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 1E11

## ES 2 651 692 T3

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKH  
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 41)

### > Secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de 1E11

ATGAGTGTGCCACTCAGGTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGAA  
ATTGTGTGACGCAGTCTCCAGACTTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATCACC  
TGCCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCCTTACTGTTACCAACAGAAACCTGATCAGTCT  
CCCAAGCTCCTCATCAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGC  
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACG  
TATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCCGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATC  
AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT  
GGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG  
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG  
GGAGAGTGTTAA (SEQ ID NO: 52)

### > Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de 1E11

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTGTCAGTAACTACAGGTGTCCACCAGGTGCAG  
CTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTG  
TCTGGTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCAGGGAAGGGA  
CTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACT  
CGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC  
GCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATCCGTCCGACGCCTTTCTTACTGG  
GGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTCTCCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTG  
GCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC  
TTCCCCGAACCGGTGACAGTCTCGTGAACTCAGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC  
CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCCAGC  
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
AAGAGACTTCAGCCCAAATCTTCTCACAAAACCTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAA  
CTCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC  
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
GAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA  
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATCTCGGGAGGAGATGACC  
AGAACCAGGTGACCTGACTTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
TGGGAGAGCAACGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGAC  
GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG  
TCTCCGGGTAA (SEQ ID NO: 53)

5

Anticuerpo monoclonal que se une a TLR4 de mono cynomolgus y humano

5 Se incubaron 10<sup>5</sup> células CHO o células CHO que expresan el TLR4 de mono cynomolgus en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% con diferentes concentraciones de anticuerpos purificados seleccionados por FMAT (1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11, 1G12) con 15C1 como control. Las células se lavaron en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% y se incubaron en IgG de cabra antihumana (H+L) Alexa Fluor® 647 (1:200; Invitrogen). Las células se analizaron usando un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). La Figura 3 muestra el análisis FACS de estas células después de la tinción de anticuerpos, que reveló que los Mab 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1C12, 1D10, 1E11 y 1G12 reconocieron células que expresan solo TLR4 de mono cynomolgus, contrariamente a 15C1 que no se une a estas células. Además, estos resultados confirman que estos anticuerpos fueron específicos de la proteína TLR4 ya que no se unieron a las células CHO nativas.

10 Se llevaron a cabo experimentos similares con células CHO o células CHO que expresan el complejo TLR4/MD2 humano. La Figura 4 muestra el análisis FACS de estas células después de la tinción de anticuerpos, que reveló que Mab 1E11 reconoció células que expresaban el complejo TLR4/MD2 humano, de manera similar a Mab 15C1 pero que Mab 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1D10 y 1G12 no pueden unirse a la proteína humana. Mab 1C12 también se pudo unir a TLR4 humano pero con una potencia menor en comparación con Mab 1E11 y 15C1. Estos resultados confirman que 1E11 y 1C12 son anticuerpos monoclonales de reacción cruzada capaces de unirse tanto a TLR4 humano como de mono cynomolgus solos o en complejo con MD2. Estos resultados también confirman que 1A1, 1A6, 1B12, 1C7, 1C10, 1D10 y 1G12 son anticuerpos monoclonales específicos anti-TLR4 de mono cynomolgus.

Ejemplo 5. Análisis de especificidad de parátipo-epítipo entre anticuerpos anti-TLR4 y TLR4

20 La Figura 5 muestra una ilustración del contacto del aminoácido potencial del epítipo del parátipo/TLR4 del anticuerpo que determina las especificidades anticuerpo/TLR4. El TLR4 humano y el TLR4 del mono cynomolgus tienen solo un aminoácido diferente en las regiones que se sabe que son importantes para la unión (véase Irene Dunne-Siegrist et al., J Biol Chem, 30 de noviembre de 2007; 282 (48): 34817-27). Efectivamente, el TLR4 humano tiene una lisina (aminoácido cargado positivamente) en la posición 349, mientras que el TLR4 de mono cynomolgus tiene un ácido glutámico (aminoácido cargado negativamente) en esta posición. Estos resultados sugieren que se produce un puente salino entre el aminoácido 103 de la cadena pesada de los anticuerpos seleccionados y el aminoácido 349 de TLR4. Además, los anticuerpos de reacción cruzada (1E11 y 1C12) tienen una asparagina o una glutamina en la posición 103 que pueden servir tanto como donante de hidrógeno para el ácido glutámico como aceptor de hidrógeno para lisina. Estos aminoácidos específicos pueden permitir la reactividad cruzada del anticuerpo tanto de TLR4 humano como de mono cynomolgus.

30 La mutagénesis dirigida al sitio se realizó en la posición 103 en el anticuerpo 1E11 para introducir la mutación N103D. El vector que contiene la secuencia de V<sub>H</sub> verificada de 1E11 N103D se cotransfectó luego con la secuencia de V<sub>L</sub> en células de mamífero usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche, Basilea, Suiza) como se describió previamente. A continuación, se incubaron 10<sup>5</sup> células CHO o células CHO que expresan el TLR4 de mono cynomolgus en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% con diferentes concentraciones de anticuerpos purificados (1E11 y 1E11 N103D). Las células se lavaron en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% y se incubaron en IgG de cabra anti-humana (H+L) Alexa Fluor® 647 (1:200; Invitrogen) y finalmente se analizaron usando un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). La Figura 6 muestra los resultados del análisis de estas células después de la tinción del anticuerpo, lo que reveló que los Mab 1E11 y 1E11 N103D reconocieron células que expresaban solo TLR4 de mono cynomolgus. Sin embargo, la unión Mab 1E11 N103D a mono cynomolgus es significativamente menor en comparación con 1E11. De manera similar, se incubaron 10<sup>5</sup> células CHO o células CHO que expresan el complejo TLR4/MD-2 humano en solución salina regulada con fosfato, albúmina de suero bovino al 2% con diferentes concentraciones de anticuerpos purificados (1E11 y 1E11 N103D) y luego se controlaron la unión de los anticuerpos a estas células mediante FACS. La Figura 7 representa el análisis FACS de estas células después de la tinción del anticuerpo, que reveló que los Mab 1E11 y 1E11 N103D reconocen las células que expresan el TLR4 humano con la misma potencia. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la posición 103 es crucial para la unión de 1E11 a TLR4 de humano y mono cynomolgus. Más precisamente, estos datos indican que podría diseñarse un motivo CDRH3 con el fin de inducir la reactividad cruzada entre especies de un anticuerpo anti TLR4.

Tabla 5. Reactividad cruzada de anticuerpos anti-TLR4.

Motivo CDRH3 = CARKDSG [N, Q, D] [Y, L] FPY (SEQ ID NO: 54)		
ID del clon	CDR3 pesada	Especificidad de la especie
1A1	ARKDSGRLLPY (SEQ ID NO: 28)	

Motivo CDRH3 = CARKDSG [N, Q, D] [Y, L] FPY (SEQ ID NO: 54)		
ID del clon	CDR3 pesada	Especificidad de la especie
1A6	ARKDSGKWLPLY (SEQ ID NO: 29)	
1B12	ARKDSGHLMPY (SEQ ID NO: 30)	
1C7	ARKDSGHNYPY (SEQ ID NO: 31)	Mono Cynomolgus
1C10	ARKDSGKNFPY (SEQ ID NO: 32)	
1G12	ARKDSGRYWPY (SEQ ID NO: 36)	
1D10	ARKDSGHNLPY (SEQ ID NO: 34)	
15C1	ARKDPSDAFPY (SEQ ID NO: 44)	Humana
1E11	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	
1E11 N103D	ARKDSGDYFPY (SEQ ID NO: 35)	Humana y mono cynomolgus
1C12	ARKDSGQLFPY (SEQ ID NO: 33)	

Ejemplo 6. Inhibición de la cascada de señalización en dirección 3' inducida por LPS de TLR4: NFκB, por anticuerpos purificados.

5 Las células THP1-Blue<sup>MR</sup>-CD14 (Invivogen), que expresan el complejo TLR4/MD2 humano, se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 10<sup>5</sup> células/pozo en 30 μL de medio de detección HEK-Blue (Invivogen). Los anticuerpos de TLR4 se diluyeron en 30 μL de medio hasta la concentración apropiada y se añadieron a las células durante 30 min a 37°C. Luego, el LPS se diluyó a 10 ng/mL en 30 μL de medio, se agregó a las células y se dejó incubar durante 24 horas a 37°C. La absorbancia se midió a 650 nm usando un lector de microplacas. La Figura 8 muestra los resultados de la inhibición de la cascada de señalización en dirección 3' inducida por LPS de TLR4 mediante los Mab seleccionados (1E11, 15C1, 1C12 y 1G12). 1E11 mostró potencia de inhibición de la señalización de TLR4 inducida por LPS comparable a 15C1. 1C12 mostró capacidades de inhibición más bajas en comparación con 1E11 y 1G12 no afectó a la cascada de señalización en dirección 3' inducida por LPS de TLR4 humano lo que confirma su especificidad por TLR4 de mono cynomolgus.

Ejemplo 7. Aleatorización de CDR del anticuerpo 1E11 y selecciones de superficie celular

15 La secuencia del anticuerpo 1E11 de reactividad cruzada (secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 40 y secuencia de cadena ligera de la SEQ ID NO: 41) tiene la misma potencia de unión y de bloqueo que 15C1. Este anticuerpo se sometió a una aleatorización de la secuencia para obtener anticuerpos que se unen a TLR4 humano y de mono cynomolgus con mayor afinidad en comparación con el anticuerpo parental y 15C1 y son capaces de neutralizar la producción de citoquina proinflamatoria inducida por LPS mediada por TLR4.

20 > Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 1E11

## ES 2 651 692 T3

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISIDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH  
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 41)

### > Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 1E11

QVQLQESGPGLVKPSDITLCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPS  
LKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAIVYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKS  
LSLSPG (SEQ ID NO: 40)

### 5 > Secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de 1E11

ATGAGTGTGCCACTCAGGTCCTGGGGTGTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGAA  
ATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTTCTGCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTACCATCACC  
TGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACTGTTACCAACAGAAACCTGATCAGTCT  
CCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGTTTCTGAGTGGC  
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACG  
TATTACTGTCAGCAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCCGGCGAGGGACCAAGGTGGAGATC  
AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT  
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG  
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGG  
GGAGAGTGTTAA (SEQ ID NO: 52)

### > Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de 1E11

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTTCTTCTTCTGTCAGTAACACTACAGGTGTCCACCAGGTGCAG  
CTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCGTCCCTCACCTGCGCTGTC  
TCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGA  
CTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACT  
CGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC  
GCTGTGGACTGTCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATCCGTCCGACGCCTTTCTTACTGG  
GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTG  
GCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC  
TTCCCCGAACCGGTGACAGTCTCGTGGAACTCAGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC  
CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCCAGC  
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
AAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA  
CTCTGGGGGGACCGTCACTTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCC

CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC  
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  
 AACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA  
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATCTCGGGAGGAGATGACC  
 AAGAACCAGGTGAGCTGACTTGGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAACGGGACGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG  
 TCTCCGGGTTAA (SEQ ID NO: 53)

5 Las regiones V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1) y V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo 1E11 se clonaron en el vector pNDS descrito en Ravn et al., (Nucleic Acids Res. noviembre de 2010; 38 (21): e193). En resumen, la región V<sub>H</sub> se clonó en el marco de la secuencia guía PelB usando un sitio de restricción NcoI en 5' y un sitio de restricción XhoI en 3'. Luego, la región V<sub>L</sub> se insertó en el marco de una secuencia enlazadora utilizando la enzima de restricción Sall en 5' y la enzima de restricción NotI en 3' para formar una construcción que codifica la scFv de 15C1 fusionada en su parte terminal C a las etiquetas 6xHis y c-Myc y la proteína pIII. A continuación, se aleatorizaron 5 residuos en el CDRH1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 25) o la cadena ligera (SEQ ID NO: 48) con el fin de generar 5 bibliotecas (tamaño de biblioteca que varía de 5x10<sup>7</sup> a 2x10<sup>8</sup>). Las diferentes bibliotecas generadas se muestran a continuación en la Tabla 6 y la Tabla 7 donde X representa cualquier aminoácido.

Tabla 6. Bibliotecas de aleatorización de CDRH1 de 1E11.

CDRH1 de 1E11 (SEQ ID NO: 25)	G	Y	S	I	T	G	G	Y
Biblioteca 1 (SEQ ID NO: 104)	G	X	X	I	X	X	X	Y
Biblioteca 2 (SEQ ID NO: 105)	G	Y	X	I	X	X	X	X

Tabla 7. Bibliotecas de aleatorización de CDRL3 de 1E11.

CDRL3 de 1E11 (SEQ ID NO: 48)	Q	Q	G	H	S	F	P	L	T
Biblioteca 3 (SEQ ID NO: 49)	Q	Q	X	X	X	X	X	L	T
Biblioteca 4 (SEQ ID NO: 50)	Q	Q	G	H	X	X	X	X	X
Biblioteca 5 (SEQ ID NO: 51)	Q	Q	X	X	X	X	P	X	T

15 Se realizaron cinco rondas de selección usando estas bibliotecas y se realizó el cribado de variantes con las actividades deseadas usando extractos periplásmicos de scFv. En resumen, se bloquearon alícuotas de bibliotecas de fagos de scFv modificadas con 1E11 (10<sup>12</sup> Pfu) con PBS que contenía leche desnatada al 3% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Los fagos bloqueados se deseleccionaron luego durante una hora a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> sobre células CHO (en un matraz T75 con 80% de confluencia) que se habían bloqueado previamente con PBS que contenía leche desnatada al 2% (p/v). Los fagos deseleccionados se mezclaron después con una concentración creciente de anticuerpo 15C1 y se incubaron en células CHO que expresan TLR4 humano durante tres horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las células se lavaron luego diez veces con PBS. Los fagos unidos se eluyeron mediante la adición de 1 mL de ácido cítrico 75 mM seguido de neutralización con 280 µL de Tris-HCl pH 9. Luego, se añadieron 10 mL de TG1 en crecimiento exponencial al matraz T75 e incubando durante una hora a 37°C con agitación lenta. Una alícuota de TG1 infectada se diluyó en serie para valorar el resultado de la selección. TG1 infectado

se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos y se resuspendió en 0,5 mL de 2xTY-AG (medio 2xTY que contenía 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 2%) y se esparció en placas de agar para bioensayo 2xTYAG. Después de una noche de incubación a 30°C, se añadieron 10 mL de 2xTYAG a las placas y las células se rasparon de la superficie y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 mL. Se añadió 2xTYAG que contenía 50% de glicerol a la suspensión celular para obtener una concentración final de 17% de glicerol. Las alícuotas de la ronda de selección se mantuvieron a -80°C. Después de cinco rondas de selecciones en células CHO que expresan TLR4 humano en la membrana en competencia con el anticuerpo 15C1, 50 clones individuales se recogieron en una placa de microtitulación de pozos profundos que contenía 0,9 mL de medio 2xTYAG (glucosa al 0,1%) por pozo y se cultivaron a 37°C durante 5-6 h (250 rpm). Los plásmidos que codifican scFv se purificaron luego y se analizaron mediante secuenciación de Sanger.

5

10 Ejemplo 8. Identificación de variantes maduras por afinidad de 1E11.

Los clones aislados después de la última ronda de selección se secuenciaron y analizaron. Después del alineamiento, se identificaron los consensos de secuencia en CDRH1 o CDRL3. Luego se seleccionaron secuencias de scFv enriquecidas con consenso de aminoácidos específico. Los scFv 1E11.C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5 y 1E11.C6 tienen secuencias específicas de CDRH1. Los scFv 1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5 que tienen secuencias CDRL3 específicas también se identificaron. La secuencia V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los scFv seleccionados se amplificaron con oligonucleótidos específicos que introducen una secuencia guía en el extremo 5'. Las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> amplificadas se clonaron en el vector de expresión de mamífero en el marco con los dominios de IgG1 humana constante y Kappa constante, respectivamente. Las construcciones se verificaron mediante secuenciación antes de la transfección en células de mamífero. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del anticuerpo 1E11.C1 reformateado con IgG1 se muestran a continuación:

15

20

> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 1E11.C1

```
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFS
GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 106)
```

> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 1E11.C1

```
QVQLQESGPGLVKPSDITLSLTCAVSGFPIRYGYSWHWIRQPPGKLEWVMGYIHYSGYTDFNPL
KTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDSGNYFPYWGQGLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO: 108)
```

25

> Secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de 1E11.C1

## ES 2 651 692 T3

ATGAGTGTGCCACTCAGGTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGAA  
ATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATCACC  
TGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCATTACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAGTCT  
CCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTCTGAGG  
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGCTGCAACG  
TATTACTGTGAGCAGGGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATC  
AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT  
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG  
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
GACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGG  
GGAGAGTGTAA (SEQ ID NO: 107)

### > Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de 1E11.C1

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTTCTTCTTCTGTCAGTAACTACAGGTGTCCACCAGGTGCAG  
CTTCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCGTGCCCTCACCTGCGCTGTC  
TCTGGTTTTCCGATCCGCTACGGGTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGA  
CTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACTACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACT  
CGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC  
GCTGTGGACTGTCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATTCCGGCACTACTTCCCTTACTGG  
GGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTCTCCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTG  
GCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTAC  
TTCCCCGAACCGGTGACAGTCTCGTGGAACTCAGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC  
CCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCCAGC  
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
AAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA  
CTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCCGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC  
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
GAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA  
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTATACCCTGCCCCATCTCGGGAGGAGATGACC  
AAGAACCAGGTGAGCCTGACTTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
TGGGAGAGCAACGGGCAGCCGAGAAACAACATAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGAC  
GGCTCCTTCTTCTTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG  
TCTCCGGGTAA (SEQ ID NO: 109)

- 5 Las secuencias de ADNc de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> en sus vectores de expresión apropiados se transfectaron en células de mamífero usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche, Basilea, Suiza). En resumen, se cultivaron picos de células en placas de 6 pozos a una concentración de 6 x 10<sup>5</sup> células por pozo en 2 mL de medio de cultivo que contenía suero bovino fetal. Los vectores de expresión, que codifican las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> candidatas, se cotransfectaron en las células usando el reactivo de transfección Fugene 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un día después de la transfección, se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 3 mL de medio fresco sin suero a las células y se cultivaron durante tres días a 37°C. Después de un período de cultivo de tres días, el sobrenadante se recolectó para IgG purificada en columnas de flujo rápido de proteína G-Sefarosa 4B (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sobrenadantes de las células transfectadas se incubaron durante la noche a 4°C con regulador de unión a IgG ImmunoPure (G) (Pierce, Rockford IL). Las muestras se pasaron a continuación
- 10

5 sobre columnas de flujo rápido de Proteína G-Sefarosa 4B y la IgG se purificó en consecuencia usando regulador de elución. La fracción de IgG eluida se dializó a continuación contra PBS y se cuantificó el contenido de IgG por absorción a 280 nm. La pureza y la integridad de IgG se verificaron mediante SDS-PAGE. La potencia de unión relativa de las variantes de 1E11 se evaluó mediante ELISA competitivo. En resumen, se recubrió el anticuerpo 15C1 durante la noche en una placa Maxisorp de 96 pozos y luego se bloqueó con PBS-BSA. El anticuerpo de referencia 15C1 y las variantes maduras de afinidad de 1E11 se añadieron a la placa a una concentración fija y se realizó una dilución en serie de 3,5 veces de las muestras. A continuación, se añadió a la placa una forma soluble marcada con histidina del complejo TLR4/MD-2 humano a una concentración fija. Después de una hora de incubación a 37°C, la placa se lavó y se distribuyó una solución de anticuerpo Penta-His-HRP, esta etapa fue seguida por un tiempo de incubación adicional de una hora a 37°C. Finalmente, la placa se lavó y se añadió TMB para la revelación colorimétrica, la reacción enzimática se detuvo con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los resultados se determinaron de acuerdo con la absorbancia a 450 nm. La potencia de unión relativa se calculó dividiendo la EC<sub>50</sub> de referencia con la EC<sub>50</sub> de las variantes maduras de afinidad (Tabla 8).

15 Todos los Mab seleccionados con mutaciones en su CDRH1 (1E11.C1, 1E11.C2, 1E11.C3, 1E11.C4, 1E11.C5, 1E11.C6) fueron positivos para unirse a TLR4 humano con potencia de unión relativa que variaba con un aumento de 3 a 17 veces en comparación con el anticuerpo parental 15C1 (Figura 9 y Tabla 8). Los Mab seleccionados con mutaciones en sus CDRL3 (1E11.E1, 1E11.E2, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5) también fueron positivos para unirse al TLR4 humano con una potencia de unión relativa que varía con un aumento de 2 a 5 veces en comparación con el anticuerpo parental 15C1 (Figura 10 y Tabla 8).

20 Para probar un efecto de unión aditiva combinando variantes de cadena ligera y pesada, se eligió la variante 1E11.C2 con CDRH1 modificado, que tenía la mayor potencia de unión. La cadena pesada de esta variante se asoció con la cadena ligera de 1E11.E1, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5 que se modificaron en la CDRL3. La región VH de 1E11.C2 se clonó con la VL de 1E11.E1, 1E11.E3, 1E11.E4 y 1E11.E5 en vectores de expresión de mamíferos como se describió anteriormente. Después de la expresión y purificación, las nuevas variantes de 1E11 llamadas 1E11.C2E1, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5 se analizaron mediante ELISA competitivo para determinar su potencia de unión.

25 Todos los Mab seleccionados (1E11.C2E1, 1E11.C2E3, 1E11.C2E4 y 1E11.C2E5) fueron positivos para unirse al TLR4 humano con potencia de unión que varía con un aumento de 29 a 40 veces en comparación con el anticuerpo parental 15C1 (Figura 11 y Tabla 8).

30 Tabla 8. Valores de EC<sub>50</sub> de anticuerpos que se unen a TLR4 humano determinados por ELISA y aumento de potencia de unión relativa de variantes maduras de afinidad de 1E11

EC <sub>50</sub> de referencia de 15C1 µg/mL	0,63					
variantes de 1E1 (CDRH1)	1E11,C1	1E11,C2	1E11,C3	1E11,C4	1E11,C5	1E11,C6
EC <sub>50</sub> µg/mL	0,052	0,036	0,119	0,251	0,087	0,061
Aumento de la potencia de unión relativa	12	17	5	2,5	7	10
Variantes de 1E11 (CDRL3)	1E11.E1	1E11.E2	1E11.E3	1E11.E4	1E11.E5	
EC <sub>50</sub> µg/mL	0,157	0,315	0,126	0,130	0,152	
Aumento de la potencia de unión relativa	4	2	5	5	4	
1E11 variantes (CDRH1/CDRL3)	1E11.C2E1	1E11.C2E3	1E11.C2E4	1E11.C2E5		
EC <sub>50</sub> µg/mL	0,021	0,016	0,015	0,017		

EC <sub>50</sub> de referencia de 15C1 µg/mL	0,63					
variantes de 1E1 (CDRH1)	1E11,C1	1E11,C2	1E11,C3	1E11,C4	1E11,C5	1E11,C6
Aumento de la potencia de unión relativa	29	39	40	36		

También se realizaron pruebas de unión con TLR4 de mono cynomolgus. Curiosamente, las mutaciones en la CDRH1 (C1, C2, C3, C4, C5) aumentan la unión del anticuerpo modificado con 1E11 a TLR4 de mono cynomolgus, pero las mutaciones en CDRL3 (E1, E2, E3, E4 y E5) disminuyen o casi elimina el anticuerpo que se une a esta molécula (Tabla 9 y Figura 12).

5

Tabla 9. Reactividad cruzada de anticuerpos anti-TLR4 madurados de afinidad.

ID del clon	CDR1 pesada	CDR3 pesada	CDR3 ligera	Potencial de unión de la especie
1E11	GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	Humano: + Mono Cynomolgus: +
1E11.C1	GFPIRYGYS (SEQ ID NO: 55)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	Humano: ++ Mono Cynomolgus: ++
1E11.C2	GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	
1E11.C3	GYPIRHGYS (SEQ ID NO: 57)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	
1E11.C4	GFPIGQGYGYS (SEQ ID NO: 58)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	
1E11.C5	GYPIWGGYS (SEQ ID NO: 59)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	
1E11.C6	GYPIGGGYS (SEQ ID NO: 60)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 39)	
1E11.E1	GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61)	Humano: + Mono cynomolgus: +/-
1E11.E2	GYSITGGYS	ARKDSGNYFPY	QQGYDEPFT	

ID del clon	CDR1 pesada	CDR3 pesada	CDR3 ligera	Potencial de unión de la especie
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 62)	
1E11.E3	GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63)	
1E11.E4	GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64)	
1E11.E5	GYSITGGYS (SEQ ID NO: 25)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65)	
1E11.C2E1	GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGNDFPVT (SEQ ID NO: 61)	
1E11.C2E3	GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGYDFPLT (SEQ ID NO: 63)	
1E11.C2E4	GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGYDYPLT (SEQ ID NO: 64)	Humano: +++ Mono cynomolgus: +
1E11.C2E5	GYPIRFGYS (SEQ ID NO: 56)	ARKDSGNYFPY (SEQ ID NO: 27)	QQGYEFPLT (SEQ ID NO: 65)	
<u>Consenso</u>	G (F/Y) PI (R/G/W) (Y/F/G)GYS (SEQ ID NO: 110)	ARKDSG (N/Q/D/E) (hidrófobo) (hidrófobo)PY (SEQ ID NO: 111)	QQG (Y/N) (D/E) (F/Y)P (hidrófobo)T (SEQ ID NO: 112)	

Por lo tanto, es posible predecir la especificidad de unión del anticuerpo dependiendo de sus composiciones de CDR y en función de la potencia de unión relativa y la reactividad cruzada de TLR4.

- 5 Efectivamente, anticuerpos que tienen las CDR de cadena pesada compuestas por la secuencia GYSITGGYS de CDR1 (SEQ ID NO: 25) o una CDR1 con la secuencia consenso G(F/Y)PI(R/G/W)(Y/F/G)GYS (SEQ ID NO: 110); secuencia IHYSGYT de CDR2 (SEQ ID NO: 26); CDR3 con la secuencia consenso ARKDSG (N/Q/D/E) (X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)PY (SEQ ID NO: 111) donde X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cada uno independientemente cualquier aminoácido hidrófobo, y las CDR de cadena ligera compuestas de secuencia QSISDH de CDR1 (SEQ ID NO: 37); secuencia YAS de CDR2 (SEQ ID NO: 38); y la secuencia QQGHSFPLT de CDR3 (SEQ ID NO: 39), son TLR4 de humano/mono cynomolgus con reactividad cruzada.
- 10 Anticuerpos que tienen las CDR de cadena pesada compuestas de CDR1 con la secuencia consenso G(F/Y)PI(R/G/W)(Y/F/G)GYS (SEQ ID NO: 110), secuencia IHYSGYT de CDR2 (SEQ ID NO: 26), CDR3 con la secuencia consenso ARKDSG(N/Q/D/E)(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)PY (SEQ ID NO: 111) donde X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cada uno independientemente cualquier aminoácido hidrófobo, y las CDR de cadena ligera compuestas por la secuencia QSISDH de CDR1 (SEQ ID NO: 37); la secuencia

YAS de CDR2 (SEQ ID NO: 38); la secuencia QQGHSFPLT de CDR3 (SEQ ID NO: 39) o CDR3 con la secuencia consenso QQG(Y/N)(D/E)(F/A)PXT (SEQ ID NO: 112, donde X es cualquier aminoácido hidrófobo), son TLR4 de humano/mono cynomolgus que tienen reactividad cruzada con una mayor potencia de unión al TLR4 humano en comparación con el anticuerpo parental 15C1.

#### 5 Ejemplo 9. Inhibición de la activación de LPS de TLR4

10 La activación inducida por LPS de TLR4 da como resultado la activación de la ruta de señalización de NFκB. Para probar la inhibición de esta ruta de señalización, se usaron células THP1-Blue<sup>MR</sup>-CD14 (Invivogen), que expresan el complejo TLR4/MD2 humano y se transfectaron de forma estable con un gen informador con elementos sensibles a NFκB. Los anticuerpos de TLR4 se probaron en este ensayo como se describió anteriormente. La Figura 13 muestra los resultados de la inhibición de la cascada de señalización en dirección 3' inducida por LPS de TLR4 mediante Mab seleccionados (15C1 y 1E11.E2). Curiosamente, a pesar de un aumento de 2 veces en la potencia de unión de 1E11.E2 en comparación con 15C1 parental, este anticuerpo no mostró una mayor potencia de inhibición de la señalización de TLR4 inducida por LPS en comparación con 15C1.

15 *In vivo*, la activación de TLR4 por LPS da como resultado la producción de IL-6 por los macrófagos. Para analizar la potencia de 1E11, 1E11.C2 y 1E11.C2E3 *ex vivo*, estos anticuerpos se produjeron tal como se describió previamente y se ensayaron en análisis de sangre completa de humano y mono cynomolgus. Este experimento consiste en medir la inhibición de la producción de IL-6 cuando se bloquea la activación de TLR4 por LPS.

20 En resumen, la sangre se diluyó en una cantidad igual de RPMI 1640 y se esparció en placas de 96 pozos de fondo en U. Se prepararon diluciones de anticuerpos (9 concentraciones entre 20 µg/mL y 305 pg/mL, concentraciones finales) en RPMI 1640 y se añadieron por triplicado a la sangre. Una hora más tarde, se añadió LPS (0,25 ng/mL de concentración final en RPMI 0,1% FCS) a los pozos y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, los sobrenadantes se recogieron cuidadosamente y se congelaron para análisis posterior. Los niveles de IL-6 se midieron en sobrenadantes según las instrucciones del kit Milliplex para uso con el lector Luminex 200. Los datos en bruto fueron obtenidos y analizados por el software Milliplex Analyst.

25 En el ensayo de sangre completa humana, las IC<sub>50</sub> de 1E11.C2 y 1E11.C2E3 fueron de 70 ng/mL y 50 ng/mL, respectivamente. En comparación con 15C1, el anticuerpo parental que tiene un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 220 ng/mL, estos anticuerpos son 3 veces y 5 veces mejores, respectivamente, en el bloqueo de TLR4 humano (Figura 14). Curiosamente para 1E11.C2, un aumento de 17 veces en la potencia de unión se tradujo en un aumento de 3 veces en la potencia de bloqueo, mientras que, para 1E11.C2E3, un aumento de 40 veces en la potencia de unión se correlacionó con un aumento de 5 veces en la potencia de bloqueo.

30 En el ensayo de sangre completa de mono cynomolgus realizado con 2 muestras de animales, el anticuerpo 1E11.C2 bloqueó la activación de TLR4 por LPS con una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 500 ng/mL (Figura 15).

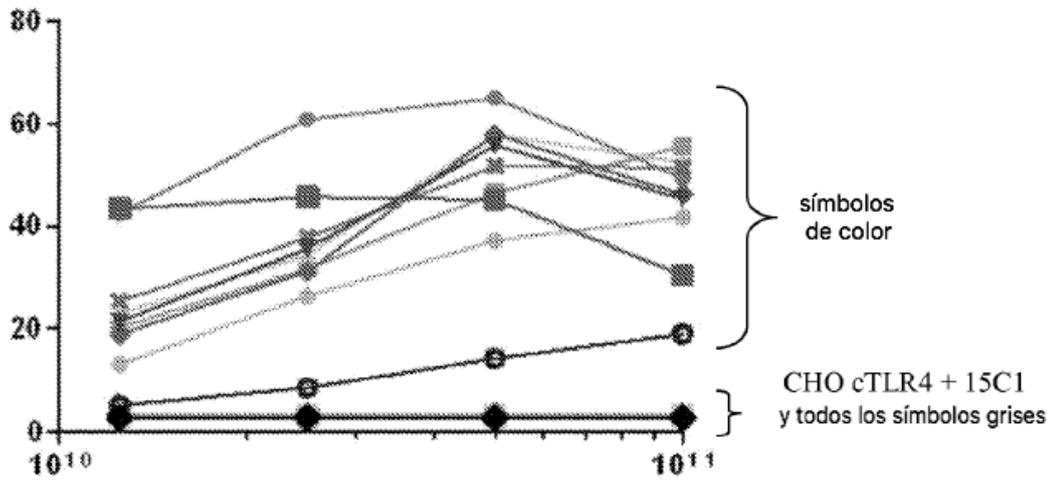
Aunque la invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.



- 5 en donde el anticuerpo exhibe un valor  $IC_{50}$  para bloquear TLR4 humana que es más potente que el valor de  $IC_{50}$  exhibido por un anticuerpo de referencia que tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 43 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable de la SEQ ID NO. : 4 cuando se mide en un ensayo ELISA de sangre completa que mide la producción de IL-6 después de que las muestras de sangre se incuban con el anticuerpo y el anticuerpo de referencia.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una combinación de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste en:
- 10 (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- 15 (d) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- (e) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- 20 (f) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- (g) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91;
- (h) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95;
- 25 (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99; y
- (j) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103.
- 30 3. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo comprende además una sustitución de aminoácido en la región constante de cadena pesada gamma en la posición del aminoácido EU 325 y una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido EU 328.
4. El anticuerpo aislado de la reivindicación 3, en el que el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 325 es serina, y en el que el aminoácido sustituido en la posición del aminoácido EU 328 es fenilalanina.
- 35 5. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio.

FIGURA 1

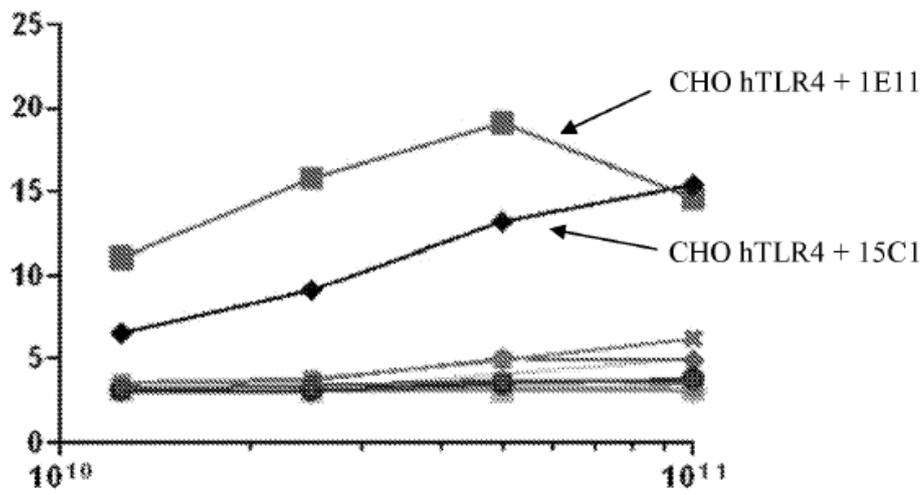
Media de inicio



- |                      |                |
|----------------------|----------------|
| —◆— CHO cTLR4 + 1A1  | —◆— CHO + 1A1  |
| —■— CHO cTLR4 + 1A6  | —■— CHO + 1A6  |
| —▲— CHO cTLR4 + 1B12 | —▲— CHO + 1B12 |
| —◆— CHO cTLR4 + 1C7  | —◆— CHO + 1C7  |
| —◆— CHO cTLR4 + 1C10 | —◆— CHO + 1C10 |
| —◆— CHO cTLR4 + 1C12 | —◆— CHO + 1C12 |
| —◆— CHO cTLR4 + 1D10 | —◆— CHO + 1D10 |
| —■— CHO cTLR4 + 1E11 | —■— CHO + 1E11 |
| —◆— CHO cTLR4 + 1G12 | —◆— CHO + 1G12 |
| —◆— CHO cTLR4 + 15C1 | —◆— CHO + 15C1 |

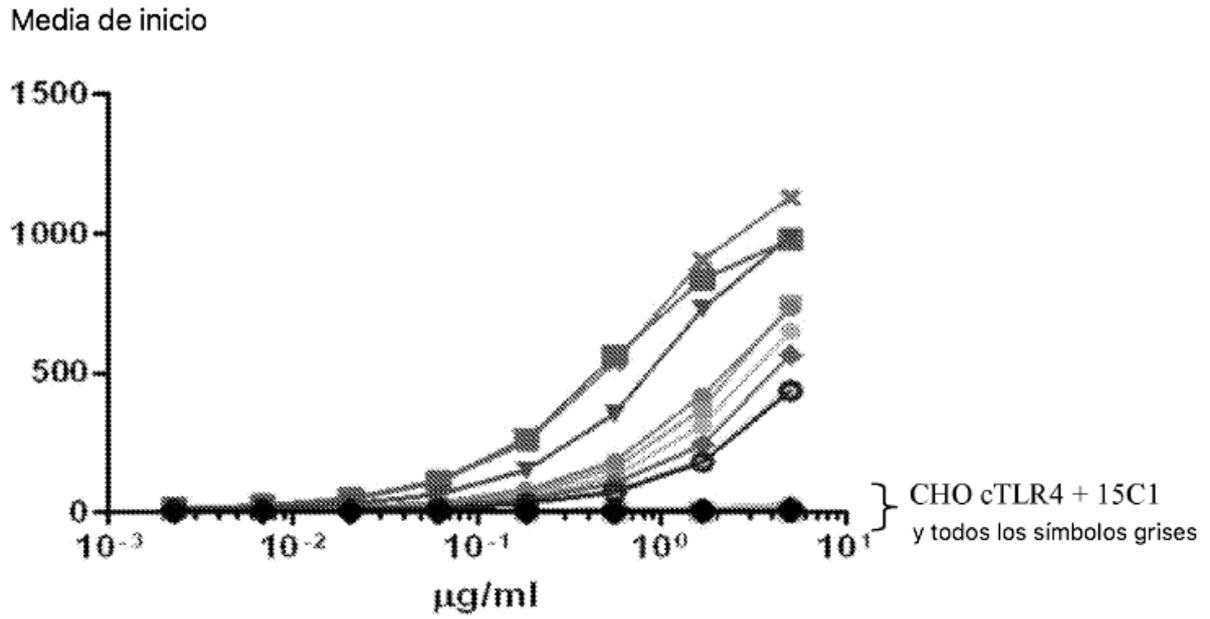
FIGURA 2

Media de inicio



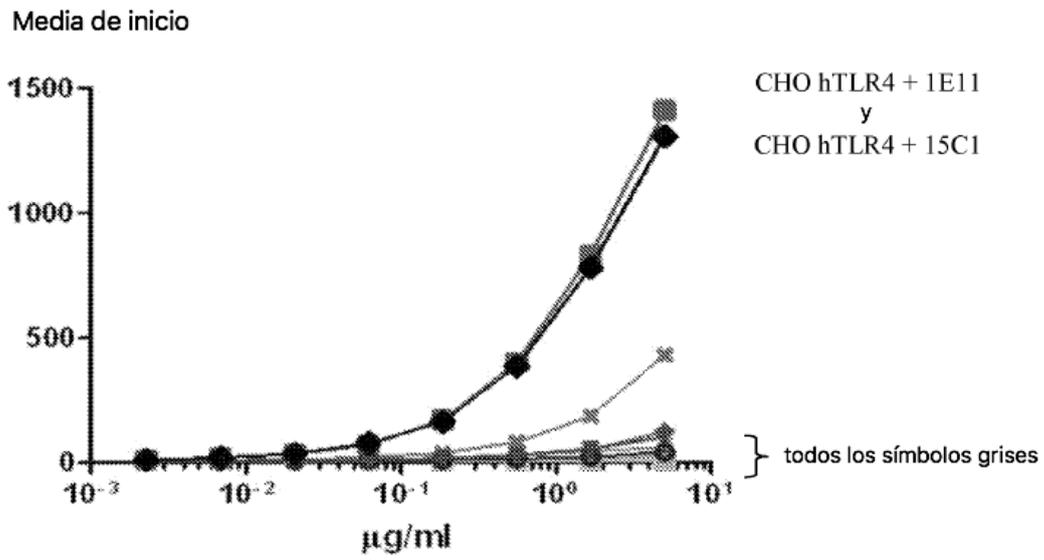
- |                  |            |
|------------------|------------|
| CHO hTLR4 + 1A1  | CHO + 1A1  |
| CHO hTLR4 + 1A6  | CHO + 1A6  |
| CHO hTLR4 + 1B12 | CHO + 1B12 |
| CHO hTLR4 + 1C7  | CHO + 1C7  |
| CHO hTLR4 + 1C10 | CHO + 1C10 |
| CHO hTLR4 + 1C12 | CHO + 1C12 |
| CHO hTLR4 + 1D10 | CHO + 1D10 |
| CHO hTLR4 + 1E11 | CHO + 1E11 |
| CHO hTLR4 + 1G12 | CHO + 1G12 |
| CHO hTLR4 + 15C1 | CHO + 15C1 |

FIGURA 3



- |                    |              |
|--------------------|--------------|
| ◆ CHO cTLR4 + 1A1  | ◆ CHO + 1A1  |
| ◆ CHO cTLR4 + 1A6  | ◆ CHO + 1A6  |
| ◆ CHO cTLR4 + 1B12 | ◆ CHO + 1B12 |
| ◆ CHO cTLR4 + 1C7  | ◆ CHO + 1C7  |
| ◆ CHO cTLR4 + 1C10 | ◆ CHO + 1C10 |
| ◆ CHO cTLR4 + 1C12 | ◆ CHO + 1C12 |
| ◆ CHO cTLR4 + 1D10 | ◆ CHO + 1D10 |
| ◆ CHO cTLR4 + 1E11 | ◆ CHO + 1E11 |
| ◆ CHO cTLR4 + 1G12 | ◆ CHO + 1G12 |
| ◆ CHO cTLR4 + 15C1 | ◆ CHO + 15C1 |

FIGURA 4



- |                      |                |
|----------------------|----------------|
| —●— CHO hTLR4 + 1A1  | —●— CHO + 1A1  |
| —■— CHO hTLR4 + 1A6  | —■— CHO + 1A6  |
| —*— CHO hTLR4 + 1B12 | —*— CHO + 1B12 |
| —◆— CHO hTLR4 + 1C7  | —◆— CHO + 1C7  |
| —◊— CHO hTLR4 + 1C10 | —◊— CHO + 1C10 |
| —*— CHO hTLR4 + 1C12 | —*— CHO + 1C12 |
| —●— CHO hTLR4 + 1D10 | —●— CHO + 1D10 |
| —■— CHO hTLR4 + 1E11 | —■— CHO + 1E11 |
| —*— CHO hTLR4 + 1G12 | —*— CHO + 1G12 |
| —◆— CHO hTLR4 + 15C1 | —◆— CHO + 15C1 |

FIGURA 5

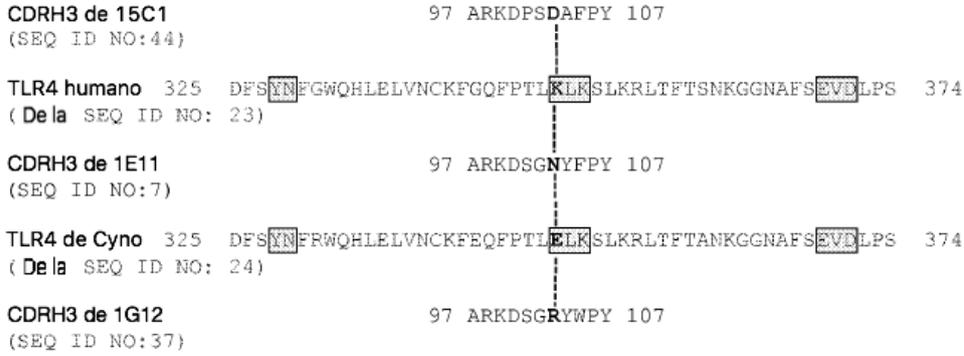


FIGURA 6

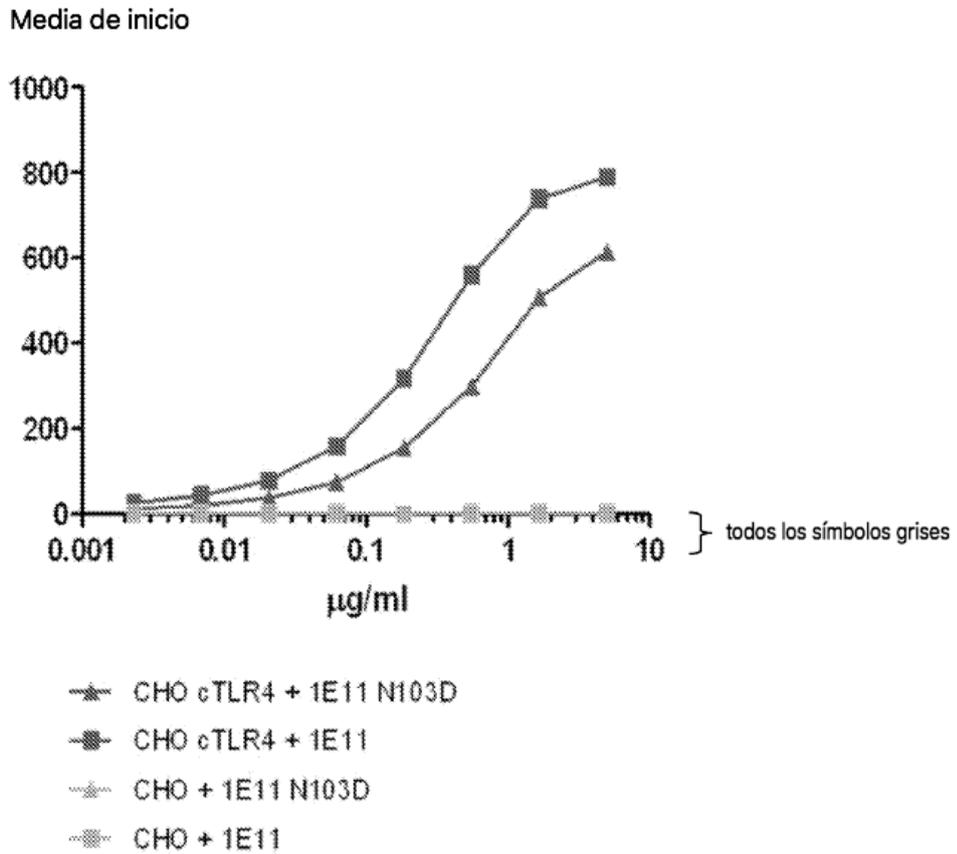


FIGURA 7

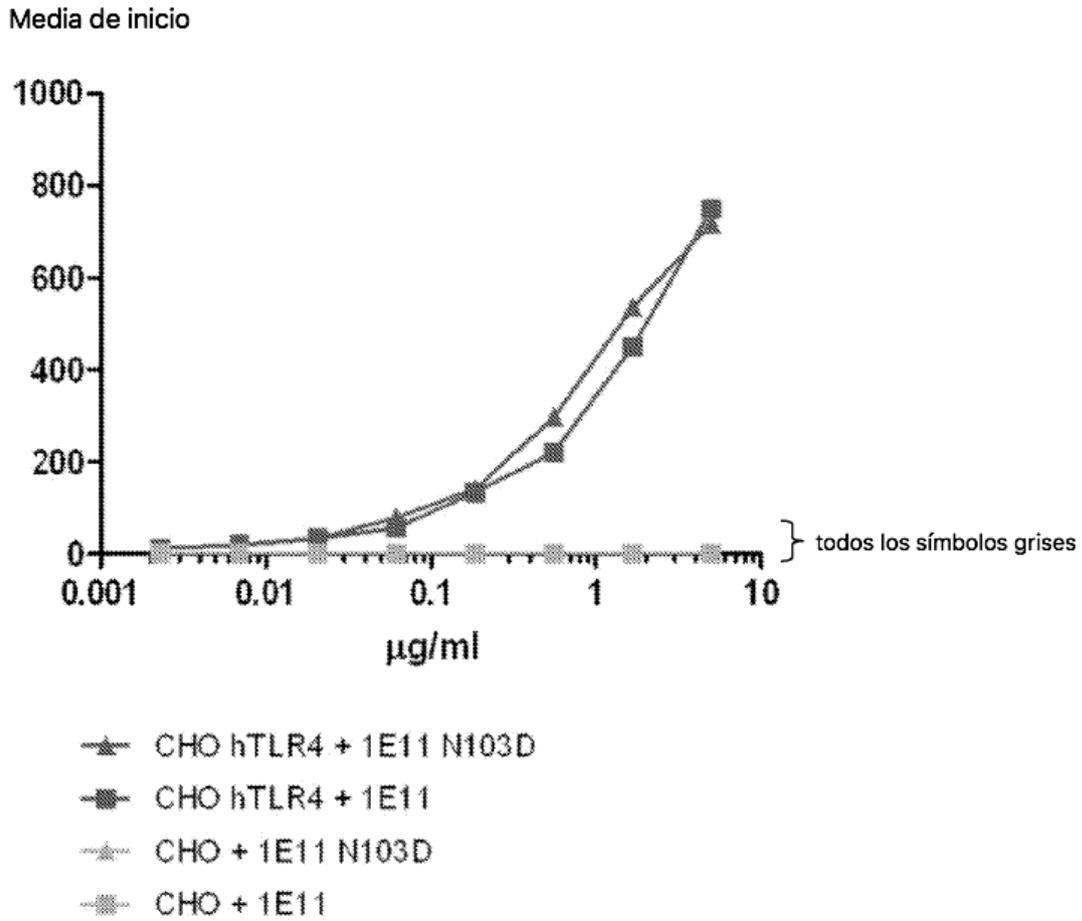


FIGURA 8

THP1-Azul

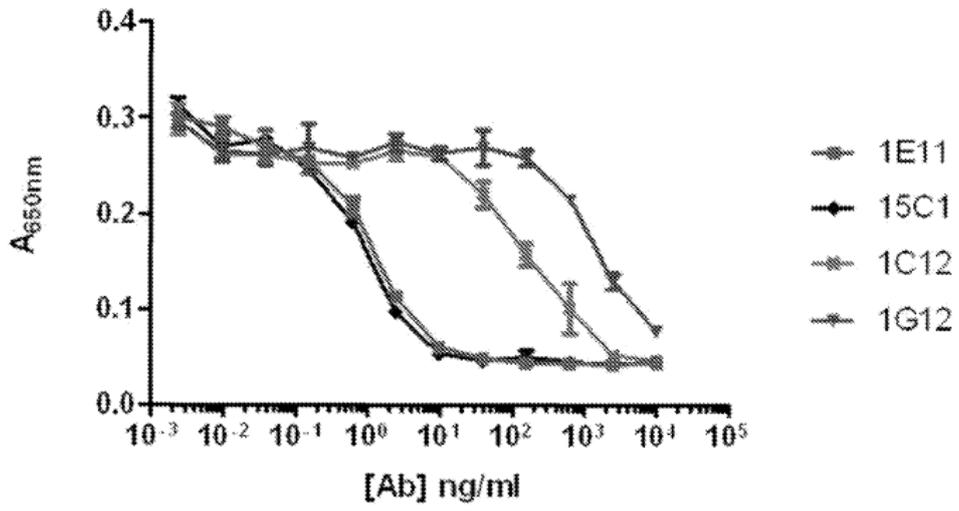


FIGURA 9

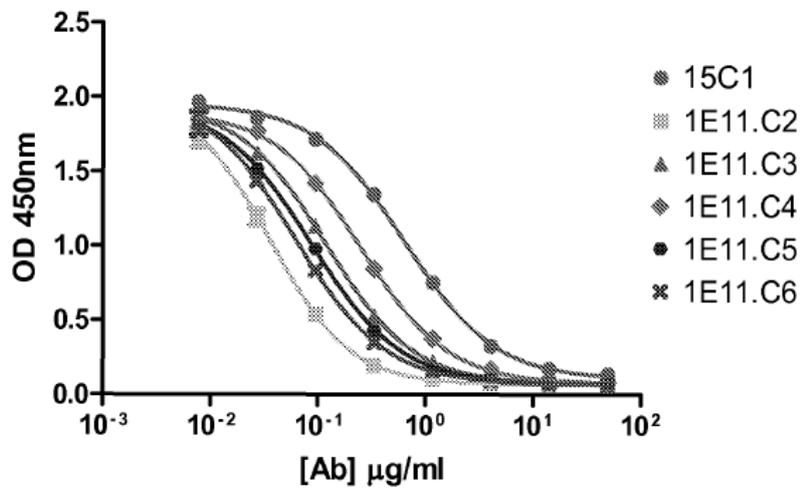


FIGURA 10

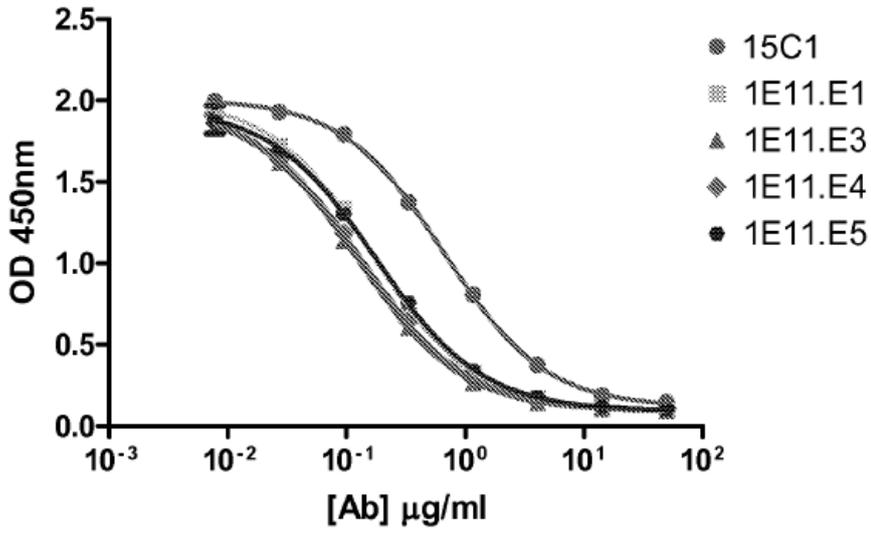


FIGURA 11

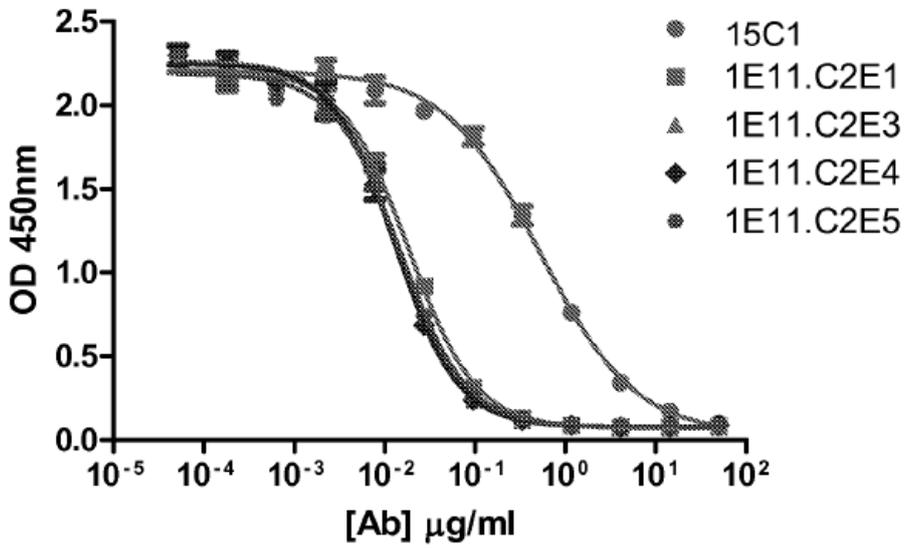
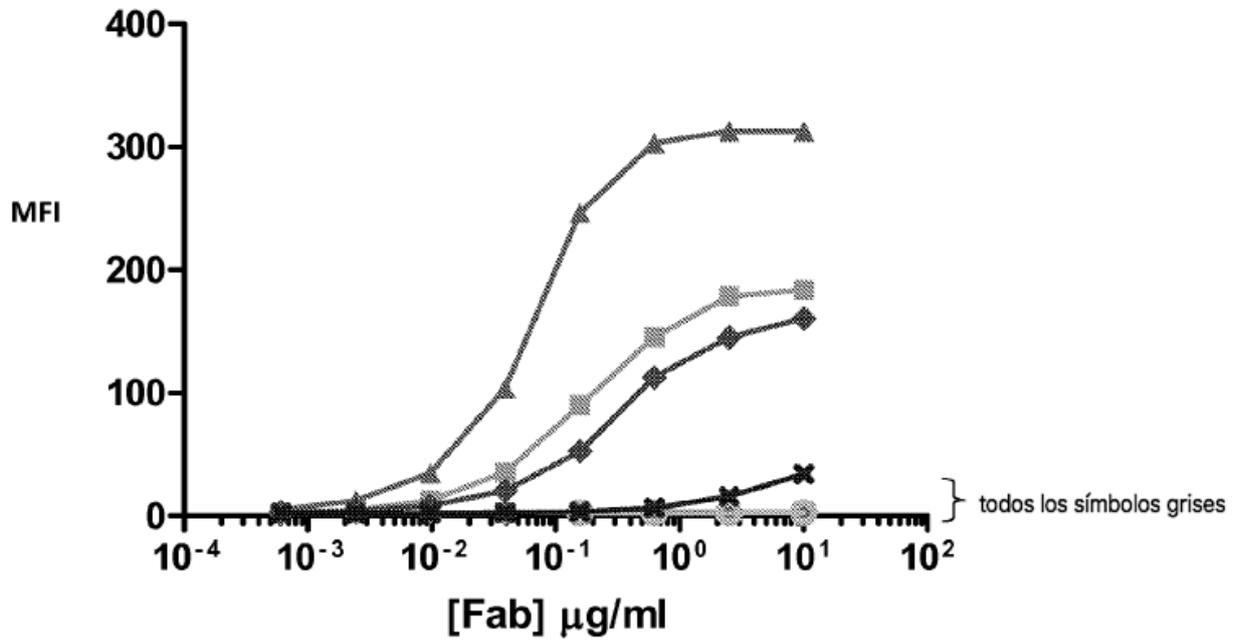


FIGURA 12



- ◆ CHO-cTLR4+ Fab 15C1
- ◆ CHO-cTLR4+ Fab 1E11
- ◆ CHO-cTLR4+ Fab 1E11.C2
- ◆ CHO-cTLR4+ Fab 1E11.E3
- ◆ CHO-cTLR4+ Fab 1E11.C2E3
- ◆ CHO+ Fab 15C1
- ◆ CHO+ Fab 1E11
- ◆ CHO+ Fab 1E11.C2
- ◆ CHO+ Fab 1E11.E3
- ◆ CHO+ Fab 1E11.C2E3

FIGURA 13

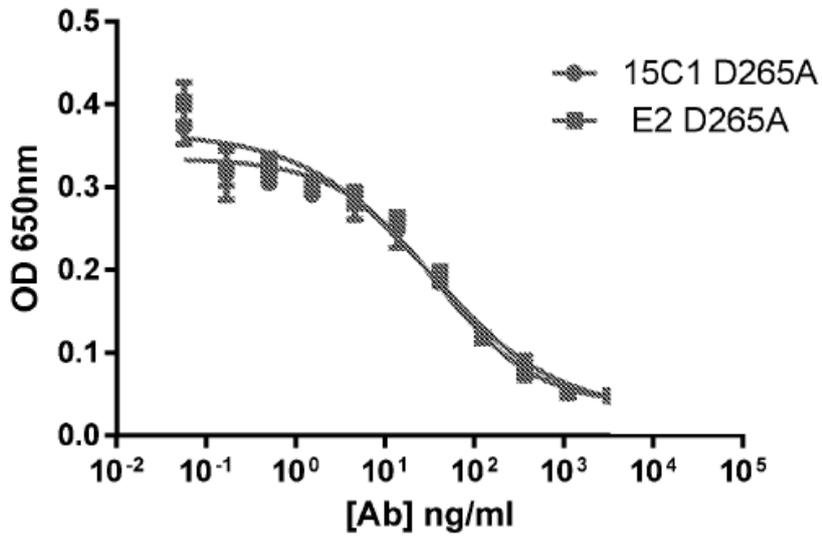


FIGURA 14

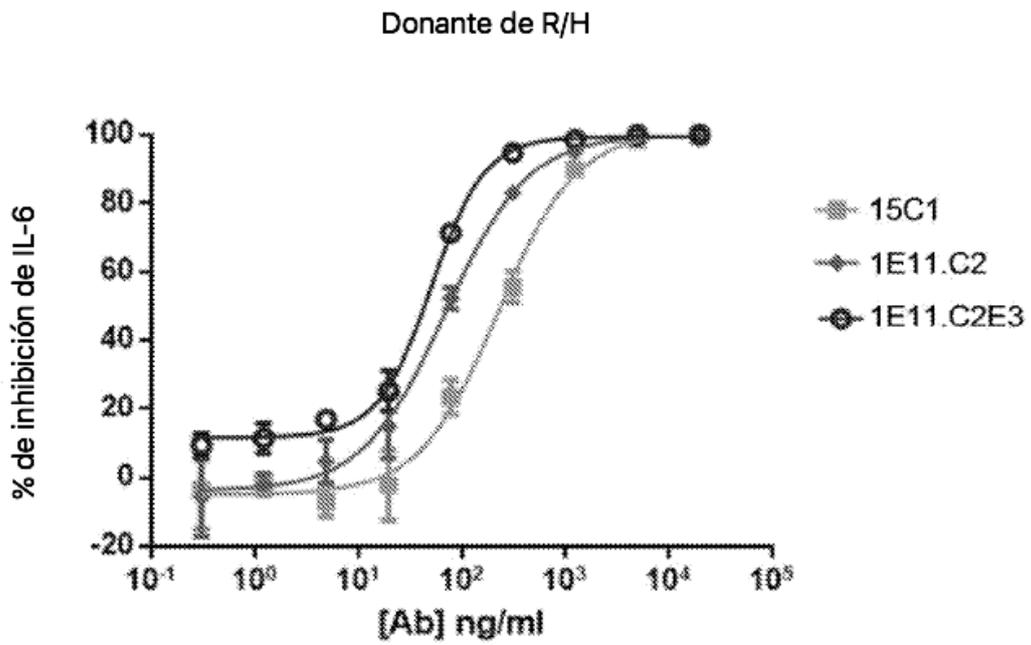
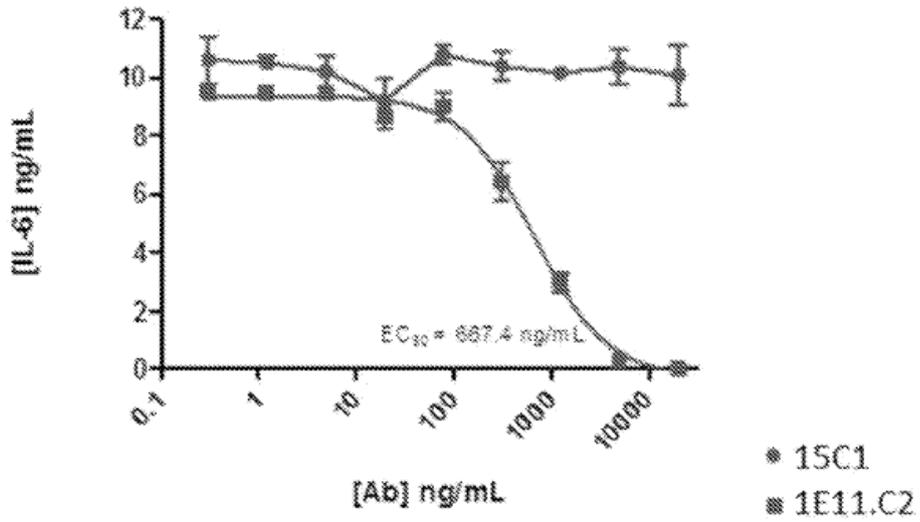


FIGURA 15

Mono 1



Mono 2

