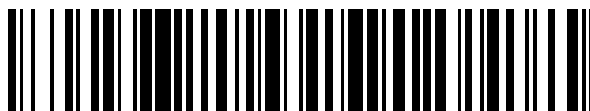


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 151**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/EP2013/061173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13727110 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2855527**

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

30 Prioridad:

31.05.2012 US 201261653652 P

11.07.2012 US 201261670289 P

06.08.2012 US 201261679923 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2019

73 Titular/es:

INNATE PHARMA (100.0%)

117, Avenue de Luminy

13009 Marseille, FR

72 Inventor/es:

BONNAFOUS, CÉCILE;

GAUTHIER, LAURENT;

MOREL, YANNIS;

PATUREL, CARINE y

PERROT, IVAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 695 151 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de ligación a TLR3

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las proteínas toll de *Drosophila* controlan el patrón dorsal-ventral y se cree que representan un mecanismo de defensa hospedero antiguo. En humanos, los TLRs se cree que son un componente importante de inmunidad innata. Las secuencias de proteínas Toll humanas y de *Drosophila* muestran homología sobre la longitud completa de las cadenas de proteínas. La familia de receptores similar a Toll humanos está comprendida de diez proteínas receptoras sumamente conservadas, TLR1-TLR10. Similar a toll de *Drosophila*, los TLRs humanos son proteínas transmembrana tipo I con un dominio extracelular que consiste en un dominio de repetición rico en leucina (LRR) que reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y un dominio citoplásmico que es homólogo al dominio citoplásmico del receptor de interleucina-1 (IL-1) humano. Similar a las rutas de señalización para el toll de *Drosophila* como el receptor IL-1, los receptores similares a Toll humanos señalizan a través de la ruta NF- κ B.

Aunque los diferentes TLRs de mamífero comparten muchas características y mecanismos de transducción de señal, sus funciones biológicas son muy diferentes. Esto es debido en parte al hecho de que cuatro moléculas adaptadoras diferentes (MyD88, TIRAP, TRIF y TRAF) se asocian en varias combinaciones con los TLRs y median diferentes rutas de señalización. Además, diferentes ligandos para un TLR pueden activar de manera preferente diferentes rutas de transducción de señal. Adicionalmente, los TLRs se expresan de manera diferente en varias células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Por consiguiente, la respuesta a un ligando TLR depende no solo en la ruta de señal activada por el TLR, sino también en la naturaleza de las células en las cuales se expresa el TLR individual.

El receptor similar a toll 3 (TLR3) ha recibido atención considerable como un objetivo terapéutico ya que la señalización TLR3 se ha implicado en afecciones inflamatorias y autoinmunitarias. La solicitud de patente WO98/50547 proporciona la secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos de la proteína hTLR3. De Bouteiller y colaboradores (2005) *J. Biol. Chem.* 280(46): 38133-38145) describen el uso de un anticuerpo anti-TLR3 que liga el TLR3 de superficie celular. El anticuerpo C1130 se establece que es activador hacia TLR3 y se ha descrito en WO 2007/051164. Los anticuerpos policlonales que inhiben TLR3 se describieron por Cavassani y colaboradores (2008) *J. Exp. Med.* 205: 2609-2621. WO 03/106499 y Matsumoto y colaboradores (2003) *J. Immunol.* 171:3154-3162 describen un anticuerpo que corresponde a un clon de anticuerpo TLR3.7 (eBioScience Inc., San Diego) reportado por ligarse e inhibir el TLR3 de superficie celular pero no el TLR3 de compartimiento celular o el DC mielóide-linaje. WO 06/060513 describe un anticuerpo C1068 que se reporta que inhibe la producción de citoquinas en las células epiteliales, que se reportan por expresar TLR3 sobre la superficie celular. La solicitud de patente de PCT WO2010/051470 proporciona anticuerpos anti-TLR3 adicionales. Otros anticuerpos anti-TLR3 para el uso de investigación incluyen anticuerpos anti-TLR3 policlonales de R&D Systems Corp., el anticuerpo 40C1285 de Abcam y los anticuerpos 619F7, 713E4, 716G10, IMG-5631 y -IMG-5348, todos de Imgenex Corp.

Sin embargo, entre los anticuerpos anti-TLR3 actualmente disponibles, no son adecuados óptimamente para el uso como agentes terapéuticos, por ejemplo, para modular TLR3 in vivo. Por ejemplo, muchos sufren de falta de eficacia o afinidad a sus epítomos. Por lo tanto, existe una necesidad por proporcionar anticuerpos mejorados dirigidos a TLR3.

55 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones, y cualquier información que no está dentro de las reivindicaciones se proporciona solo para uso informativo.

La presente divulgación surge del descubrimiento de descomposiciones novedosas que comprenden, y métodos para utilizar anticuerpos monoclonales, que incluyen, pero no se limitan a fragmentos de anticuerpos, y derivados que se ligan específicamente a e inhiben la función de TLR3 humano.

La presente divulgación proporciona anticuerpos con nuevas propiedades útiles para ligar como objetivo el TLR3 in vivo. Puesto que el TLR3 liga su ligando natural (ARNds) y se señala exclusivamente en la endosoma en

macrófagos y células dendríticas (DCs) (en pH ácido), los anticuerpos se han seleccionado previamente basados en la alta afinidad en el pH endosómico donde se presenta la señalización. Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo por el cual los anticuerpos anti-TLR3 entran a la célula. La presente invención proporciona anticuerpos que tienen ligación potente a TLR3 expuesto en la superficie celular y un medio ambiente neutro de pH y que muestran potencia mejorada en la inhibición de TLR3. La optimización de la ligación del TLR3 expresado en la superficie celular por lo tanto puede ser un criterio importante para la captación celular (endosómica) por una célula que puede acondicionar la actividad biológica cadena abajo (o general). Los presentes anticuerpos muestran ligación potente a TLR3 de superficie celular humana, como se observa en un ensayo donde TLR3 se expresa exclusivamente en la superficie celular en condiciones de pH neutro. De esta manera, los anticuerpos que tienen ligación de superficie celular mejorada se seleccionaron. La actividad inhibidora de los anticuerpos anti-TLR3 por lo tanto se puede regular por el ciclado de nuevo a la superficie celular de los polipéptidos TLR3 endosómicos implicados en la endocitosis una vez que los receptores se separaron de sus ligandos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que inhibe la señalización mediada por TLR3 en una célula que expresa TLR3, en donde el anticuerpo se liga específicamente a un polipéptido TLR3 humano expresado solamente en la superficie de una célula, opcionalmente en pH neutro. Opcionalmente, el anticuerpo tiene una EC₅₀ de no más de 0.3 µg/ml, opcionalmente no más de 0.2 µg/ml, opcionalmente no más de 0.1 µg/ml, para ligación a las células que expresan TLR3 solamente en la superficie celular.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se ligan a la porción N-terminal de la proteína TLR3 por lo menos parcialmente (o principal o exclusivamente) en la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 (la cara ligada por el ARNd), y opcionalmente además por lo menos parcialmente dentro del sitio de ligación de ARNd N-terminal de un polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, el anticuerpo liga adicionalmente TLR3 por lo menos parcialmente dentro de la cadena principal de la porción N-terminal del polipéptido TLR3.

Mientras que algunos epítomos previos en TLR3 han mostrado que son útiles para la inhibición eficaz de TLR3, los epítomos no han estado necesariamente presentes en los primates no humanos. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que inhiben la actividad del polipéptido TLR3 al ligarse a la porción N-terminal de una proteína TLR3 humana, y que también se ligan al TLR3 de primate no humano. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se ligan a la porción N-terminal de la proteína TLR3 y que no compiten con el ARNd para ligarse al TLR3 humano, en donde los anticuerpos también se ligan a un polipéptido TLR3 de primate no humano (en una célula que expresa TLR3 de primate no humano). En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se ligan a la porción N-terminal de la proteína TLR3 y que compite con el ARNd para ligarse al sitio de ligación de ARNd de N-terminal de un polipéptido TLR3 humano, en donde los anticuerpos también se ligan a un polipéptido TLR3 de primate no humano (en una célula que expresa TLR3 de primate no humano). En una modalidad, los anticuerpos por lo menos parcialmente (o principal o exclusivamente) en la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 (la cara ligada por el ARNd). En una modalidad, los anticuerpos se ligan a TLR3 por lo menos parcialmente dentro del sitio de ligación a ARNd N-terminal de un polipéptido TLR3 humano. En una modalidad, el primate no humano es macaca fascicularis. En una modalidad, el polipéptido TLR3 de primate no humano comprende una secuencia de aminoácidos mostradas en el número de acceso NCBI BAG55033 (SEQ ID NO: 2).

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se ligan a la porción N-terminal de una proteína TLR3 humana, notablemente dentro de los residuos 41 a 251, opcionalmente por lo menos parcialmente dentro de los residuos 41 a 139, 41 a 120 o residuos 41 a 89, del TLR3 humano de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se ligan a la porción N-terminal de una proteína TLR3 humana, en donde el anticuerpo tiene ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en su porción N-terminal en el segmento que corresponde a los residuos 41-139 de SEQ ID NO: 1, relativa con la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, los anticuerpos de la invención interfieren con la ligación de ARNd al sitio de ligación a ARNd N-terminal de un polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos ligan uno o más residuos de aminoácidos dentro de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 que se implica en la ligación del polipéptido TLR3 a ARNd, y/o residuos adyacentes a los mismos.

Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítomo que comprende los residuos 64 y/o residuo 65 de SEQ ID NO: 1, y/o tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 64 y/o residuo 65 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítomo que comprende los residuos 86 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1, y/o tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 86 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítomo que comprende residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1, y/o tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítomo que comprende residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1, y/o tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a

un epítipo que comprende residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1, y/o tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1.

- 5 En una modalidad, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1, y no tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1.
- 10 En una modalidad, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 64 y/o residuo 65 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 86 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos no tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1.
- 15
- 20 Opcionalmente, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 64 y/o residuo 65 de SEQ ID NO: 1, un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 86 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1 y un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Como es evidenciado por la ligación a los mutantes TLR3, los anticuerpos difieren en su epítipo de los anticuerpos previamente descritos.
- 25 En una modalidad, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. En una modalidad, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1. En una
- 30 modalidad, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1, ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. En una modalidad, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112 y/o 113 de SEQ ID NO: 1, y ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en el residuo 137 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos no
- 35 tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 86 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos no tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 64 y/o residuo 65 de SEQ ID NO: 1.
- 40 Opcionalmente, en cualquiera de las modalidades en la presente, los anticuerpos mantienen la ligación (no tienen ligación reducida) a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 116, 145, 182, 196 y/o residuo 171 de SEQ ID NO: 1.
- 45 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que interfieren con la ligación de ARNds a un polipéptido TLR3 humano. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que interfieren con la ligación de ARNds al sitio de ligación a ARNds N-terminal de un polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos compiten con ARNds para ligarse al polipéptido TLR3 humano, por ejemplo, al sitio de ligación a ARNds N-terminal de un polipéptido TLR3 humano. La competición se puede evaluar utilizando métodos estándares, por ejemplo, ensayos Biacore para evaluar si los anticuerpos se ligan a TLR3 inmovilizado en presencia de ARNds, y/o si el ARNds se liga al TLR3 inmovilizado en presencia de anticuerpos, bajo condiciones ácidas.
- 50
- Opcionalmente, los anticuerpos compiten con ARNds para ligarse al polipéptido TLR3 humano en un ensayo in vitro que comprende las etapas de: (i) poner en contacto un anticuerpo anti-TLR3 con un polipéptido TLR3 para obtener anticuerpos ligados al polipéptido TLR3, y (ii) poner en contacto el anticuerpo ligado al polipéptido TLR3 de la etapa
- 55 (i) con ARNds y evaluar si el ARNds disminuye la ligación del polipéptido TLR3 (al anticuerpo, en donde una disminución de la ligación indica competición con el ARNds para el polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos compiten con el ARNds para ligarse con polipéptido TLR3 humano en un ensayo in vitro que comprende las etapas de: (i) poner en contacto un polipéptido TLR3 con el ARNds para obtener el ARNds ligado al polipéptido TLR3, y (ii) poner en contacto el ARNds ligado al polipéptido TLR3 de la etapa (i) con un anticuerpo anti-TLR3 y
- 60 evaluar si el polipéptido TLR3 se liga al complejo de ARNds-polipéptido TLR3, en donde la falta de ligación sustancial indica la competición con ARNds para el polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos compiten con el ARNds para ligar al polipéptido TLR3 humano en un ensayo in vitro que comprende las etapas de: (i) unir un anticuerpo anti-TLR3 a un soporte sólido (por ejemplo, a través de un dominio constante), (ii) poner en contacto dicho anticuerpo con un polipéptido TLR3 para obtener anticuerpos ligados al polipéptido TLR3, y (iii) poner
- 65 en contacto el anticuerpo ligado al polipéptido TLR3 de la etapa (ii) con el ARNds y evaluar si el ARNds disminuye la

ligación del polipéptido TLR3 al anticuerpo, donde una disminución de la ligación indica competición con el ARNds para el polipéptido TLR3 humano.

En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el anticuerpo se liga a un polipéptido TLR3 humano expresado en la superficie de una célula, opcionalmente como es evaluado en una célula que expresa TLR3 exclusivamente en la superficie celular bajo pH neutro, se internaliza en una célula que expresa TLR3, e inhibe la señalización TLR3 en una célula (por ejemplo, una célula dendrítica humana que expresa TLR3).

En un aspecto, los anticuerpos se ligan a polipéptidos TLR3 humanos bajo condiciones neutras, y en particular bajo condiciones representativas de aquellas encontradas en citosol de la célula. Tales condiciones neutras se caracterizan generalmente por un pH entre 6.6 y 7.4, por ejemplo, un pH ligeramente alcalino de 7.2 encontrado en el citosol de la célula. Opcionalmente, el anticuerpo tiene una K_D de no más de 10^{-9} M, opcionalmente menor que 10^{-10} M, opcionalmente menor que 10^{-11} M para la ligación a un polipéptido TLR3 en pH neutro. Opcionalmente, la ligación en condiciones neutras es de mejor afinidad que bajo condiciones ácidas, por ejemplo, donde la K_D para la ligación a TLR3 en condiciones neutras comparadas a ácidas es más baja por al menos 0.5-, 1.0-, 1.5- o 2.0- $\log_{10}$.

La presente invención proporciona además anticuerpos específicos que tienen actividad incrementada sobre los anticuerpos previamente reportados. En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el anticuerpo compite para la ligación a un polipéptido TLR3 (por ejemplo, un polipéptido TLR3 humano que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) con cualquiera de una o cualquier combinación del anticuerpo monoclonal 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7, opcionalmente bajo condiciones ácidas y/o neutras. En una modalidad, un anticuerpo de la invención compite para la ligación a un polipéptido TLR3, opcionalmente bajo condiciones ácidas y/o neutras, con un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de SEQ ID NOS: 3 y 4 (11E1), una región VH y VL de SEQ ID NOS: 14 y 15 (31F6), una región VH y VL de SEQ ID NOS: 25 y 26 (32C4), una región VH y VL de SEQ ID NOS: 36 y 37 (37B7) o una región VH y VL de SEQ ID NOS: 47 y 48 (7G11). En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el anticuerpo puede tener una cadena pesada y/o ligera que tiene una, dos o tres CDRs del anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7.

En un aspecto, el anticuerpo que se liga específicamente a TLR3 tiene una o más (incluyendo cualquier combinación de las mismas, o todas de) de las siguientes propiedades:

a. se liga a un polipéptido TLR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 2;

b. se liga específicamente a un polipéptido TLR3 humano expresado solamente en la superficie de una célula, en donde el anticuerpo tiene una EC_{50} de no más de 0.3 μ g/ml, opcionalmente no más de 0.2 μ g/ml, opcionalmente no más de 0.1 μ g/ml, para la ligación a las células que expresan TLR3 solamente en la superficie celular;

c. se internaliza en una célula que expresa TLR3 sobre su superficie;

d. tiene una afinidad subnanomolar para un polipéptido TLR3 en un pH neutro, por ejemplo, un pH de aproximadamente pH 7.2;

e. tiene una afinidad subnanomolar para un polipéptido TLR3 en un pH ácido, por ejemplo, un pH menor que aproximadamente 6.5, o entre aproximadamente 4.5 a 6.5 o aproximadamente pH 5.6;

f. inhibe la señalización de TLR3 en presencia de un ligando TLR3;

g. inhibe la señalización TLR3 en un fondo inflamatorio, por ejemplo, en presencia de citoquinas inflamatorias tales como IFN α ;

h. compite para la ligación a un polipéptido TLR3 con el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7;

i. compite con el ARNds para la ligación a la porción N-terminal del polipéptido TLR3;

j. tiene ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 64 y/o residuo 65 de SEQ ID NO: 1, y/o ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 86 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1;

k. tiene ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 117 y/o residuo 120 de SEQ ID NO: 1, y/o tiene ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1, y/o tiene ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 112, 113 y/o 115 de SEQ ID NO: 1; y/o

l. se liga a por lo menos, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más residuos en el segmento que corresponde a los residuos 41-251, 41-89, 41-120 o 41-139 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se liga específicamente al por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más residuos en el segmento que corresponde a los residuos 1-251, opcionalmente 41-251, 41-89, 41-120 o 41-139 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el anticuerpo inhibe la señalización por el polipéptido TLR3. Opcionalmente, el anticuerpo no se liga al residuo 116, residuo 145 y/o residuo 182 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el anticuerpo no se liga al residuo 171, y/o residuo 196 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la ligación del anticuerpo a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos 116, 145, 182 y/o residuo 171 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1 se mantiene (es decir, no se reduce sustancialmente), en comparación con la ligación a un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1; de manera preferente dicha mutación es una mutación K145E, D116R, K182E, N196A y/o E171A. Tales anticuerpos pueden tener opcionalmente además cualquiera de las propiedades descritas en la presente, por ejemplo, afinidad subnanomolar para un polipéptido TLR3 en un pH ácido, inhibe la señalización TLR3 en presencia de un ligando TLR3 o en un fondo inflamatorio (por ejemplo, en presencia de citoquinas inflamatorias tal como IFN α), compite para la ligación a un polipéptido TLR3 con 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7; no compite con el ARNDs para la ligación a la porción C-terminal del polipéptido TLR3; o inhibe la secreción IP-10 en la DC (por ejemplo, en la DC mieloide humana). Tales anticuerpos se pueden utilizar adicionalmente en cualquiera de los métodos de la invención.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo que se liga a un polipéptido TLR3, en donde el anticuerpo comprende (i) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 5, 6 o 7 (HCDR1), 8 o 9 (HCDR2) y 10 (HCDR3), y (ii) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente; en donde uno, dos, tres, cuatro, o cinco o más de los aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias se puede sustituir por un aminoácido diferente. En una modalidad, el anticuerpo comprende (i) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 16, 17 o 18 (HCDR1), 19 o 20 (HCDR2) y 21 (HCDR3), y (ii) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente; en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco o más de los aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias se puede sustituir por un aminoácido diferente. En una modalidad, el anticuerpo comprende (i) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 27, 28 o 29 (HCDR1), 30 o 31 (HCDR2) y 32 (HCDR3), y (ii) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco o más de los aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias se puede sustituir por un aminoácido diferente. En una modalidad, el anticuerpo comprende (i) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 38, 39 o 40 (HCDR1), 41 o 42 (HCDR2) y 43 (HCDR3), y (ii) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 44, 45 y 46, respectivamente; en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco o más de los aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias se puede sustituir por un aminoácido diferente. En una modalidad, el anticuerpo comprende (i) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 49, 50 o 51 (HCDR1), 52 o 53 (HCDR2) y 54 (HCDR3), y (ii) las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NO: 55, 56 y 57, respectivamente; en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco o más de los aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias se puede sustituir por un aminoácido diferente.

En otra modalidad, el anticuerpo de cualquiera de las modalidades en la presente es capaz de ser internalizado por una célula que expresa el polipéptido TLR3 sobre su superficie.

En una modalidad, el anticuerpo es quimérico, por ejemplo, contiene una región constante no de murino, opcionalmente humana. En una modalidad, el anticuerpo es humano o humanizado. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón o rata (por ejemplo, comprende CDRs derivadas de una rata o un gen de rata o un segmento de gen de sitio Ig de rata). En otra modalidad, el anticuerpo no se liga sustancialmente a otros TLRs humanos (por ejemplo, TLR4).

En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el isotipo del anticuerpo es IgG, opcionalmente IgG1 o IgG3. En una modalidad el anticuerpo comprende un dominio Fc o es de un isotipo que se liga por Fc γ R.

En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab') $_2$, Fv, diacuerpos, fragmento de anticuerpo de cadena individual, o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos de anticuerpos diferentes. En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el anticuerpo no comprende un dominio Fc o es de un isotipo que no se liga sustancialmente por Fc γ R (por ejemplo, CD16 humana). En una modalidad, el anticuerpo es de isotipo IgG4 o IgG2 humano. Los isotipos IgG4 humanos u otros isotipos de IgG modificados para reducir su ligación a Fc γ R se pueden utilizar para sus propiedades farmacológicas ventajosas, tal como vida media en suero, mientras que modulan la señalización de TLR3, en por ejemplo, una DC, sin inducir la muerte de la célula. En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, el anticuerpo anti-TLR3 inhibe la señalización TLR3 y comprende una región constante de isotipo IgG4 o IgG2 humano. En un aspecto, de cualquiera de las modalidades de la invención,

el anticuerpo anti-TLR3 inhibe la señalización TLR3 y comprende una región constante (región constante de cadena pesada) que no se liga sustancialmente a FcγRIIIa.

En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-TLR3 comprende una cadena pesada de isotipo IgG4 humano. En una modalidad, el anticuerpo anti-TLR3 comprende una región constante de cadena pesada IgG4 humana y que comprende una mutación de serina a prolina en el residuo 241, que corresponde a la posición 228 de acuerdo con el índice de EU (Kabat y colaboradores, "Sequences of proteins of immunological interest", 5ª edición, NIH, Bethesda, ML, 1991). Las composiciones que comprenden tales anticuerpos se pueden caracterizar por tener menor que aproximadamente 15%, tal como menor que aproximadamente 10% (por ejemplo, aproximadamente 5% o menor, aproximadamente 4% o menor, aproximadamente 3% o menor, o aun aproximadamente 1% o menor) de "semi-anticuerpos" IgG4 (que comprenden un par de cadena pesada/cadena ligera individual). Tales subproductos de "semi-anticuerpo" IgG4 se forman debido a la heterogeneidad de los puentes disulfuro de cadena inter-pesada en la región bisagra en una proporción de la IgG4 humana secretada (ver Angal y colaboradores, Molecular Immunology, 30 (1): 105-108, 1993 para una descripción de "semi-anticuerpos" IgG4, mutación S241P y principios relacionados). Este efecto es típicamente solo detectable bajo condiciones de desnaturalización, no reductoras.

En otra modalidad, el anticuerpo se conjuga o se liga covalentemente a un resto detectable o tóxico.

En un aspecto, los anticuerpos inhiben opcionalmente la señalización TLR3 sin bloquear la unión de un ligando de ARNds TLR3 al sitio de ligación a ARNds principal (es decir, C-terminal) del polipéptido TLR3.

En un aspecto, los anticuerpos también se ligan a TLR3 humano bajo condiciones ácidas, y en particular bajo condiciones representativas de aquellas encontradas en un compartimiento subcelular acidificado de una célula (por ejemplo, compartimentos de la ruta endocítica endosómica, lisosómica). Tales condiciones ácidas se caracterizan generalmente por un pH menor que aproximadamente pH 6.5, o entre aproximadamente pH 4.5 a 6.5, o aproximadamente pH 5.6.

En un aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, los anticuerpos modulan, opcionalmente inhiben, la señalización TLR3 en un compartimiento subcelular acidificado de una célula (por ejemplo, compartimentos de la ruta endocítica endosómica, lisosómica).

En un aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, los anticuerpos modulan, opcionalmente inhiben, la señalización TLR3 en una célula dendrítica (DC) (por ejemplo, una DC mieloide, DC derivada de monocitos).

En otros aspectos de cualquiera de las modalidades en la presente, la afinidad de ligación bivalente de los anticuerpos para TLR3 bajo condiciones neutras y/o ácidas se puede caracterizar opcionalmente por una K_D media de no más de aproximadamente (es decir, mejor afinidad que) 100, 50, 10, 5, o 1 nanomolar, de manera preferente sub-nanomolar u opcionalmente no más que aproximadamente 500, 200, 100 o 10 picomolar.

En otros aspectos de cualquiera de las modalidades en la presente, los anticuerpos inhiben la señalización TLR3 por al menos parcialmente (o completamente) bloquear la ligación de un ligando TLR3 a un polipéptido TLR3. El ligando TLR3 será generalmente un ligando diferente a un anticuerpo anti-TLR3 y puede ser un ligando TLR3 de origen natural o no de origen natural, opcionalmente un ligando basado en ARNds tal como poliAU (ácido poliadenílico: ácido poliuridílico) o polilC (ácido polinosínico: policitidílico).

En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar, clasificar y/o producir un anticuerpo que se liga e inhibe específicamente un polipéptido TLR3 en un sujeto mamífero, dicho método que comprende las etapas de: a) proporcionar una pluralidad de anticuerpos que ligan el polipéptido TLR3 humano, opcionalmente por un método que comprende inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido TLR3, y (b) evaluar la afinidad de ligación de dichos anticuerpos para el polipéptido TLR3 en una célula que expresa TLR3 humano solamente en la superficie celular. Opcionalmente, el método comprende además seleccionar un anticuerpo de dicha pluralidad que tiene una EC_{50} de no más que 0.3 µg/ml, opcionalmente no más que 0.2 µg/ml, opcionalmente no más que 0.1 µg/ml, para ligarse a las células que expresan TLR3 humano solamente en la superficie celular.

Cualquiera de los métodos de la invención se puede caracterizar adicionalmente ya que comprenden cualquier etapa descrita en la solicitud, incluyendo notablemente, en la "Descripción Detallada de la Invención"). La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo obtenible por cualquiera de los métodos presentes. La invención se refiere adicionalmente a formulaciones farmacéuticas o de diagnóstico de los anticuerpos de la presente invención. La invención se refiere adicionalmente a métodos para utilizar anticuerpos en los métodos de tratamiento o diagnóstico, opcionalmente en combinación con un segundo agente terapéutico (por ejemplo, un corticoide, un DMARD, una anti-citoquina o un agente receptor anticitoquinas, un agente anti-TNFalfa, etc).

Estos aspectos y características adicionales ventajosos de la invención se pueden describir adicionalmente en cualquier lugar en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A, 1B, 1C y 1D muestran el efecto de la dosis *in vitro* para la ligación a las células HEK293T transfectadas transcientemente con un constructo TLR3 ECD y que expresa TLR3 solamente en su superficie para los anticuerpos 11E1, 7G11, 32C4 y 31F6, respectivamente. Cada anticuerpo se compara con el anticuerpo de referencia 31C3; la ligación al TLR3 de superficie celular se mejora para los anticuerpos 11E1, 7G11, 32C4 y 31F6.

Las Figuras 2A, 2B, 2C, y 2D muestran la inhibición dependiente de dosis de la señalización TLR3 utilizando un ensayo de luciferasa TLR3-293T-humano con los anticuerpos anti-TLR3 humanos. Cada anticuerpo se compara con el anticuerpo de referencia 31C3; la inhibición de la señalización TLR3 inducida por ARNds se mejora para los anticuerpos 11E1, 7G11, 32C4, 31F6 y 37B7.

Las Figuras 2F, 2G, y 2H muestran la vista del extremo N-terminal del polipéptido TLR3, que muestra los residuos de aminoácidos mutados indicados en negro y los residuos adyacentes a los residuos que forman parte de los epítomos principales en gris. La Figura 2F muestra una vista de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3, con el extremo N-terminal del polipéptido TLR3 en el lado derecho de la imagen); la Figura 2G muestra una vista de la superficie lateral que contiene glicano del polipéptido TLR3 y la cadena principal, con el extremo N-terminal del polipéptido TLR3 en el primer plano (a la izquierda de la imagen). La Figura 2H muestra una vista de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 y la cadena principal, con el extremo N-terminal del polipéptido TLR3 en primer plano (a la derecha de la imagen).

La Figura 3 muestra resultados de modelos de ratón de artritis reumatoide. La Figura 3A muestra los resultados de un modelo de ratón de artritis reumatoide preventiva. La Figura 3B muestra los resultados de un modelo de ratón de artritis reumatoide curativa. La Figura 3C muestra los resultados de un modelo de ratón de artritis reumatoide curativa cuando los ratones se tratan con PBS, un anticuerpo de control, 28G7 y un anticuerpo anti-TNF γ (Humira^{MR}).

La Figura 4 muestra los resultados del modelo de colitis de ratón. La Figura 4A muestra las mediciones del espesor de la pared para los ratones tratados con solución salina (puntos negros), con TNBS solamente (cuadrados negros) con un anticuerpo anti-TNF γ y TNBS (triángulos negros), con 28G7 y TNBS (puntos abiertos), y con un Ab de control y TNBS (cuadrados abiertos). La Figura 4B muestra el registro del daño macroscópico para los ratones tratados con solución salina (puntos negros), con TNBS solamente (cuadrados negros) con un anticuerpo anti-TNF α y TNBS (triángulos negros), con 28G7 y TNBS (puntos abiertos), y con un Ab de control y TNBS (cuadrados abiertos). El anticuerpo anti-TLR3 de acuerdo con la invención mejora el desarrollo de la enfermedad, bajo condiciones rigurosas. (*p<0.05, **p<0.01 vs solución salina).

La Figura 5 muestra los resultados de un modelo de ratón COPD. La Figura 5A muestra conteos de células diferenciales BAL para macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos. Los anticuerpos anti-TLR3 disminuyeron en gran medida la infiltración de neutrófilos en las vías aéreas, mientras no afectan sustancialmente los macrófagos eosinófilos o linfocitos. La Figura 5B muestra el oxígeno saturado de sangre venosa (en por ciento) para cada uno de LPS/elastasa sola y LPS/elastasa en combinación con los anticuerpos anti-TLR3 o roflumilast. La Figura 5C muestra la IL17A al fluido BAL (BALF), donde los anticuerpos anti-TLR3 disminuyeron IL17A (pg/ml) sustancialmente, y tanto como el roflumilast. La Figura 5D muestra la IP-10 en BALF, donde los anticuerpos -TLR3 disminuyeron la IP-10 (pg/ml) sustancialmente. La Figura 5E muestra los conteos de células diferenciales BAL para macrófagos, neutrófilos y linfocitos para un segundo estudio que compara los anticuerpos anti-TLR3 (28G7), roflumilast (Rofu) y la combinación de roflumilast y anticuerpos anti-TLR3 (combo).

La Figura 6 muestra los resultados de un modelo de ratón CLP (ligación y punción cecal - sepsis). En este modelo agudo, los ratones experimentaron una infección aguda, imitando el choque séptico.

Las Figuras 7A y 7B muestran los resultados de las combinaciones de fármacos con los TLR3 mAbs anti-humanos (etiquetados IPH33.1) en combinación con dexametasona o Humira^{MR} respectivamente. Los anticuerpos redujeron cada uno sustancialmente la producción de IP-10 *in vitro* por PBMC en respuesta al poliIc adicionalmente cuando se combinaron con la dexametasona o Humira^{MR}.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**Introducción**

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de anticuerpos monoclonales de alta afinidad que inhiben específica y eficientemente la ruta de señalización TLR3. Los inventores también proporcionan nuevos epítomos presentes en el TLR3 humano, incluyendo el epítomo reconocido por el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y/o 37B7, que son particularmente eficientes en inhibir la señalización TLR3, e inhibir la liberación de citoquinas en respuesta a la estimulación con un ligando TLR3.

Los anticuerpos se pueden utilizar para tratar una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un sujeto en necesidad de los mismos. La presente invención también proporciona métodos para tratar recaídas, ataques, o fases agudas, que se presentan durante el curso de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en un sujeto en necesidad de los mismos utilizando un anticuerpo anti-TLR3 que inhibe la señalización TLR3. La presente invención también proporciona métodos novedosos para tratar enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias establecidas en un sujeto en necesidad de los mismos utilizando un anticuerpo anti-TLR3 que inhibe la señalización TLR3. La invención también proporciona regímenes de tratamiento y combinaciones de tratamiento que se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en un sujeto en necesidad de las mismas utilizando un anticuerpo anti-TLR3 que inhibe la señalización TLR3.

Los anticuerpos de la presente invención que se ligan a TLR3 bajo condiciones ácidas y neutras, se ligarán generalmente tanto TLR3 de superficie celular como TLR3 endosómico en alta afinidad, tal que los anticuerpos serán útiles en cualquier situación (por ejemplo, tratamiento o prevención de la enfermedad), donde la orientación (por ejemplo, modulación) a TLR3 es útil. El TLR3 se ha descubierto en algunos casos de inflamación, la superficie de los macrófagos y el bloqueo de TLR3 en la neutralización de la cloroquina de la acidificación endosómica sin embargo mostró alguna actividad anti-inflamatoria (Cavassani y colaboradores, 2008, *supra*). Sin embargo, los anticuerpos de la invención tendrán la ventaja más grande sobre otros anticuerpos en el tratamiento o prevención de enfermedades donde la modulación (por ejemplo, inhibición) de la señalización por TLR3 en los compartimentos citosólicos (por ejemplo, endosómicos) es útil o requerida, y la importancia relativa para modular la señalización de tales compartimentos TLR3 puede depender de la enfermedad. Un ejemplo de tal enfermedad es artritis reumatoide; el TLR3 expresado en compartimento endosómico se cree que desempeña una función importante en la artritis reumatoide, puesto que el tratamiento con cloroquina, un inhibidor de la acidificación endosómica, inhibe la señalización TLR3 e inhibe la producción de citoquinas inflamatorias de los cultivos sinoviales de pacientes que tienen artritis reumatoide (Sacre y colaboradores, (2008) J. Immunol. 181:8002-8009). El TLR3 expresado en el compartimento endosómico se cree que desempeña una función importante en un número de otras enfermedades donde la DC (por ejemplo, DC mielóide) se implica en la exacerbación de la enfermedad, ya que la mDC tiene una capacidad bien documentada para captar antígenos de células apoptóticas o necróticas incluyendo durante la necrosis de tejido durante la inflamación aguda.

Puesto que los presentes anticuerpos son específicos para TLR3, también se pueden utilizar para otros propósitos, incluyendo purificación de TLR3 o células que expresan TLR3, modulación (por ejemplo, activación o inhibición) de los receptores TLR3 *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*, orientación de las células que expresan TLR3 para destrucción *in vivo*, o específicamente etiquetado/ligación a TLR3 *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*, incluyendo, para métodos tales como inmunotinción, análisis de IHC, es decir, en biopsias congeladas, análisis FACS, e inmunoprecipitación.

Definiciones

Como se utiliza en la presente, "ligando TLR3" se refiere a cualquier compuesto que pueda ligarse específicamente a, y alterar la actividad de TLR3 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. El compuesto puede ser un ligando de origen natural, por ejemplo, generalmente ARNs o ARNs viral, o un ligando sintético tal como poliIC o poliAU. El compuesto puede ser cualquier tipo de molécula, incluyendo compuestos o elementos inorgánicos u orgánicos, incluyendo proteínas (tales como anticuerpos), ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, o cualquier otra entidad molecular. Además, tales compuestos pueden modular los receptores TLR3 en cualquier forma, incluyendo activación o inhibición, y mediante cualquier mecanismo, incluyendo por la ligación al receptor y accionando o desactivando la actividad de una manera similar a un ligando de origen natural, o al ligarse al receptor y bloquear el acceso a otros ligandos. De manera preferente, el ligando activa el receptor, y como tal se puede utilizar para inducir la producción de citoquinas por las células que expresan TLR3.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo del dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos se asignan a una de cinco clases mayores: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Varias de éstas se dividen adicionalmente en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son principalmente responsables por el reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son llamados "alfa", "delta", "épsilon", "gamma" y "mu", respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG e/o IgM son las clases preferidas de anticuerpos empleados en esta invención, con IgG que se prefiere particularmente debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se fabrican más fácilmente en una instalación de laboratorio. De manera preferente, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. Particularmente preferidos son los anticuerpos adecuados humanizados, quiméricos, humanos, o de otra manera humanos. "Anticuerpos" también incluye cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

El término “se liga específicamente a” significa que un anticuerpo se puede ligar de manera preferente en un ensayo de ligación competitivo al socio de ligación, por ejemplo, TLR3, como es evaluado utilizando ya sea formas recombinantes de las proteínas, epítopos en la presente, o proteínas nativas presentes sobre la superficie de las células objetivo aisladas. Los ensayos de ligación competitivos y otros métodos para determinar la ligación específica se describen adicionalmente a continuación y son bien conocidos en la técnica.

Cuando un anticuerpo se dice que “compite con” un anticuerpo monoclonal particular (por ejemplo, 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7) u otro ligando TLR3 (por ejemplo, ARNs), significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal (u otro ligando TLR3) en un ensayo de ligación utilizando ya sea moléculas TLR3 recombinantes o moléculas TLR3 expresadas superficiales. Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la ligación de 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 a un polipéptido TLR3 o célula que expresa TLR3 en un ensayo de ligación, el anticuerpo se dice que “compite”, respectivamente, con 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7.

El término “afinidad”, como se utiliza en la presente, significa la resistencia de la ligación de un anticuerpo a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo se da por la constante de disociación K_D , definida como $[Ab] \times [Ag]/[Ab-Ag]$, donde $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo de anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo no ligado y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno no ligado. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_D$. Los métodos preferidos para determinar la afinidad de los mAb se pueden encontrar en Harlow, y colaboradores, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988), Coligan y colaboradores, eds, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY, (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983), las referencias que se incorporan completamente en la presente a manera de referencia. Un método preferido y estándar bien conocido en el campo para determinar la afinidad de los mAb es el uso de los instrumentos Biacore.

Dentro del contexto de esta invención, un “determinante” designa un sitio de interacción o ligación en un polipéptido.

El término “epítipo” se define como un determinante antigénico, y es el área o región o un antígeno al cual un anticuerpo se liga. Un epítipo de proteína puede comprender residuos de aminoácidos implicados directamente en la ligación, así como residuos de aminoácidos que se bloquean efectivamente por el anticuerpo o péptido de ligación a antígeno específico, es decir, residuos de aminoácidos dentro de la “huella” del anticuerpo. Es la forma más simple o área estructural más pequeña en una molécula de antígeno compleja que puede combinarse con, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales/estructural. El término “epítipo lineal” se define como un epítipo compuesto de residuos de aminoácidos que están contiguos en la secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria). El término “epítipo conformacional o estructural” se define como un epítipo compuesto de residuos de aminoácidos que no todos están contiguos y de esta manera representan partes separadas de la secuencia lineal de los aminoácidos que se llevan en proximidad uno al otro por el plegamiento de la molécula (estructuras secundarias, terciarias y/o cuaternarias). Un epítipo conformacional es dependiente de la estructura 3-dimensional. El término “conformacional” por lo tanto se utiliza frecuentemente de manera intercambiable con “estructural”.

Por “fragmento inmunogénico”, se propone en la presente cualquier fragmento polipeptídico o peptídico que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria tal como (i) la generación de anticuerpos que se ligan a dicho fragmento y/o que se ligan a cualquier forma de la molécula que comprende dicho fragmento, incluyendo el receptor ligado a membrana y mutantes derivados del mismo, (ii) la estimulación de una respuesta de células T que implican células T que reaccionan al complejo bi-molecular que comprende cualquier molécula MHC y un péptido derivado de dicho fragmento, (iii) la ligación de vehículos transfectados tales como bacteriófagos o bacterias que expresan genes que codifican inmunoglobulinas de mamífero. Alternativamente, un fragmento inmunogénico también se refiere a cualquier construcción capaz de inducir una respuesta inmunitaria como se define anteriormente, tal como un fragmento peptídico conjugado a una proteína portadora por acoplamiento covalente, un constructo de polipéptido recombinante quimérico que comprende dicho fragmento peptídico en su secuencia de aminoácidos, y específicamente incluye células transfectadas con un ADNc de la cual la secuencia comprende una porción que codifica dicho fragmento.

Un anticuerpo “adecuado humano” se refiere a cualquier anticuerpo, anticuerpo derivatizado o fragmento de anticuerpo que se puede utilizar con seguridad en humanos, por ejemplo, en métodos terapéuticos descritos en la presente. Los anticuerpos humanos adecuados incluyen todos los tipos de anticuerpos humanizados, quiméricos o completamente humanos, o cualquiera de los anticuerpos en los cuales por lo menos una porción de los anticuerpos se deriva de humanos o de otra manera se modifican para evitar la respuesta inmunitaria que es provocada generalmente cuando se utilizan anticuerpos no humanos nativos.

Para los propósitos de la presente invención, un anticuerpo “humanizado” o “humano” se refiere a un anticuerpo en el cual la región de estructura constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas se fusionan con la región de ligación, por ejemplo, la CDR, de una inmunoglobulina animal. Tales anticuerpos se diseñan para mantener la especificidad de ligación del anticuerpo no humano del cual las regiones de ligación se derivan, pero evitan una reacción inmune contra el anticuerpo no humano. Tales anticuerpos se pueden obtener de ratones transgénicos u otros animales que se han “diseñado” para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a

la estimulación antigénica (ver, por ejemplo, Green y colaboradores (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg y colaboradores (1994) *Nature* 368:856; Taylor y colaboradores (1994) *Int Immun* 6:579, las enseñanzas totales de las cuales se incorporan en la presente a manera de referencia). Un anticuerpo completamente humano también se puede construir por métodos de transfección genéticos o cromosómicos, así como tecnología de expresión in fago, todos de los cuales son conocidos en el campo (ver, por ejemplo, McCafferty y colaboradores (1990) *Nature* 348:552-553). Los anticuerpos humanos también se pueden generar por células B activadas in vitro (ver, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,567,610 y 5,229,275, que se incorporan en su totalidad a manera de referencia).

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

Los términos “dominio Fc”, “porción Fc” y “región Fc” se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, de aproximadamente 230 aminoácidos (aa) a aproximadamente 450 aa de cadena pesada γ humana (gamma) o su secuencia contraparte en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpo (por ejemplo, α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o alotipo de origen natural de las mismas. A menos que se especifique de otra manera, la numeración de aminoácidos de Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulina se utiliza por toda esta descripción (ver Kabat y colaboradores (1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5ª ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren a un material que es sustancialmente o esencialmente libre de componentes que lo acompañan normalmente como es encontrado en su estado nativo. Pureza y homogeneidad se determinan típicamente utilizando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poli(acrilamida) o cromatografía líquida de alto desempeño. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación es sustancialmente purificada.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan intercambiabilmente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácido, es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímero de aminoácido no de origen natural.

El término “recombinante” cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. De esa manera, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan anormalmente, subexpresado o no expresado en lo absoluto.

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

Producción de Anticuerpos Anti-TLR3

Los anticuerpos adecuados para el método de la invención se ligan específicamente a TLR3. Los anticuerpos de la invención se ligan adicionalmente a TLR3 con alta afinidad en condiciones que corresponden a aquellas encontradas en la superficie celular. Los anticuerpos de la invención son adicionalmente capaces de inhibir la ruta de señalización de TLR3. La capacidad de los anticuerpos inhibidores para inhibir específicamente la ruta de señalización TLR3 los hacen útiles para numerosas aplicaciones, en particular para tratar o prevenir enfermedades en donde la inhibición de la ruta de señalización TLR3 es deseable, es decir evita la secreción de citoquinas y quimiocinas adicionales así como la activación celular, como se describe en la presente.

En una modalidad, la invención proporciona métodos que utilizan un anticuerpo que se liga a TLR3 humano y compete para ligarse al TLR3 humano con el anticuerpo monoclonal 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7.

“TLR3”, “polipéptido TLR3” y “receptor TLR3”, usados intercambiabilmente, se utilizan en la presente para referirse al Receptor 3, similar a Toll un miembro en la familia de receptor similar a Toll (TLRs). La secuencia de aminoácidos del TLR3 se muestra en SEQ ID NO: 1 (número de acceso NCBI NP_003256, la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia). La secuencia de ARNm de TLR3 humano se describe en el número de acceso NCBI NM_003265. Las secuencias TLR3 humano también se describen en la publicación de patente de PCT no. WO 98/50547, la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia. Una secuencia de aminoácidos de TLR3 de primate no humano (macaca fascicularis) se muestra en el número de acceso NCBI BAG55033 (SEQ ID NO: 2).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite con el anticuerpo monoclonal 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 y reconoce, se liga a, o tiene inmunoespecificidad para sustancialmente o esencialmente el mismo, o el mismo, epítipo o "sitio epitópico" en una molécula TLR3 como el anticuerpo monoclonal 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. En otras modalidades, el anticuerpo monoclonal consiste en, o es un derivado o un fragmento de, el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7.

Cualquier fragmento de TLR3, de manera preferente pero no exclusivamente TLR3 humano, o cualquier combinación de fragmentos TLR3, se pueden utilizar como inmunógenos para producir anticuerpos, y los anticuerpos de la invención pueden reconocer epítopos en cualquier ubicación dentro del polipéptido TLR3, siempre y cuando lo puedan hacer en las células que expresan TLR3 tales como MdDC o MoDC como se describe en la presente. En una modalidad, los epítopos reconocidos están presentes en la superficie celular, es decir son accesibles a los anticuerpos presentes fuera de la célula. De manera más preferente, el epítipo es el epítipo reconocido específicamente por el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. Además, los anticuerpos que reconocen distintos epítopos dentro del TLR3 se pueden utilizar en combinación, por ejemplo, para ligarse a los polipéptidos TLR3 con eficacia y amplitud máxima entre diferentes individuos.

Los anticuerpos de esta invención se pueden producir por una variedad de técnicas conocidas en el campo. Típicamente, se producen por inmunización de un animal no humano, de manera preferente un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido TLR3, de manera preferente un polipéptido TLR3 humano. El polipéptido TLR3 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido TLR3 humano, o un fragmento o derivado del mismo, típicamente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto sobre la superficie de las células que expresan un polipéptido TLR3, de manera preferente el epítipo reconocido por el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. Tales fragmentos contienen típicamente por lo menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia del polipéptido madura, aún de manera más preferente por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de los mismos. Los fragmentos típicamente se derivan esencialmente del dominio extracelular del receptor. En una modalidad preferida, el inmunógeno comprende un polipéptido TLR3 humano de tipo natural en una membrana lipídica, típicamente en la superficie de una célula. En una modalidad específica, el inmunógeno comprende células intactas, particularmente células humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas. En otra modalidad preferida, el polipéptido es un polipéptido TLR3 recombinante.

La etapa de inmunizar un mamífero no humano con un antígeno se puede llevar a cabo en cualquier manera bien conocida en el campo para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (ver, por ejemplo, E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), la divulgación completa de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia). El inmunógeno se suspende o se disuelve en una solución amortiguadora, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo o incompleto. Los métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, tipos de soluciones amortiguadoras y cantidades de adyuvantes son bien conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo y no son limitantes de ninguna manera en la presente invención. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero son fácilmente elucidados.

Similarmente, la ubicación y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también es bien conocida en el campo. En un protocolo de inmunización típico, los animales no humanos se inyectan intraperitonealmente con un antígeno en el día 1 y nuevamente alrededor de una semana después. Esto es seguido por regímenes de recuerdo del antígeno a aproximadamente el día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como adyuvante de Freund incompleto. Las inyecciones de recuerdo se llevan a cabo intravenosamente y se pueden repetir durante varios días consecutivos. Esto es seguido por una inyección de refuerzo en el día 40, ya sea intravenosa o intraperitonealmente, típicamente sin adyuvante. Este protocolo da por resultado la producción de células B productoras de anticuerpo específicas a antígeno después de aproximadamente 40 días. Otros protocolos también se pueden utilizar siempre y cuando den por resultado la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno utilizado en la inmunización.

Para la preparación de anticuerpo policlonales, el suero se obtiene de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en el mismo se aíslan por técnicas bien conocidas. El suero se puede purificar por afinidad utilizando cualquiera de los inmunógenos expuestos en lo anterior ligados a un soporte sólido para obtener los anticuerpos que reaccionan con los polipéptidos TLR3.

En una modalidad alterna, los linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado se aíslan, se desarrollan in vitro, y luego se exponen al inmunógeno en el cultivo de células. Los linfocitos luego se recolectan y la etapa de fusión descrita posteriormente se lleva a cabo.

Para los anticuerpos monoclonales preferidos, la siguiente etapa es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la fusión subsecuente de aquellos esplenocitos con una célula inmortalizada a fin de formar un hibridoma productor de anticuerpos. El aislamiento de los esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en el campo e implica típicamente la remoción del bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en piezas pequeñas y comprimir los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nylon de filtro de

células en una solución amortiguadora apropiada para producir una suspensión celular individual. Las células se lavan, se centrifugan y se vuelven a suspender de una solución amortiguadora que lisa cualquiera de los glóbulos rojos. La solución se centrifuga nuevamente y los linfocitos restantes en la pelotilla se vuelven a suspender finalmente en solución amortiguadora reciente.

Una vez aislados y presentes en la suspensión célula individual, los linfocitos se pueden fusionar a una línea de células inmortales. Esto es típicamente una línea de células de mieloma de ratón, aunque muchas otras líneas de células inmortales útiles para crear hibridomas son conocidas en el campo. Las líneas de mieloma de murino preferidas incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, U. S. A., células X63 Ag8653 y SP-2 disponibles de the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U. S. A. La fusión se lleva a cabo utilizando polietilenglicol o similar. Los hibridomas resultantes luego se desarrollan en un medio selectivo que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Los hibridomas se desarrollan típicamente en una capa alimentadora de macrófagos. Los macrófagos son de manera preferente de compañeros de camada de mamífero no humano utilizado para aislar esplenocitos y se ceban típicamente con adyuvante de Freund incompleto o similar a varios días antes de colocar en placas los hibridomas. Los métodos de fusión se describen en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986), la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia.

Las células se dejan desarrollar en el medio de selección durante un tiempo suficiente para la formación de colonias y la producción de anticuerpos. Este es usualmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Las colonias de hibridomas luego se someten a ensayo para la producción de anticuerpos que se ligan específicamente a los productos génicos de polipéptido TLR3, opcionalmente el epítipo específicamente reconocido por el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. El ensayo es típicamente un ensayo de tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier ensayo que pueda ser adaptado a los pocillos en los que se desarrollan los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayos o clasificación de células activadas por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción de anticuerpos deseados se examinan para determinar si una o más de distintas colonias están presentes. Si más de una colonia está presente, las células se pueden volver a clonar y desarrollar para asegurar que solamente una célula individual haya dado origen a la colonia que produzca el anticuerpo deseado. Típicamente, los anticuerpos también se someterán a prueba para la capacidad de ligarse a los polipéptidos TLR3, por ejemplo, células que expresan TLR3, en secciones de tejido incrustadas en parafina, como se describe a continuación.

Los hibridomas que se confirman para producir un anticuerpo monoclonal de esta invención se pueden desarrollar en grandes cantidades en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar in vivo como tumores de ascitis en un animal.

Después de suficiente crecimiento para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de crecimiento que contiene el anticuerpo monoclonal (o el fluido de ascitis) se separa de las células y el anticuerpo monoclonal presente en las mismas se purifica. La purificación se logra típicamente por electroforesis en gel, diálisis, cromatografía utilizando proteína A o proteína G-Sepharose, o una Ig anti-ratón ligada a un soporte sólido tal como agarosa o cuentas de Sepharose (todas descritas, por ejemplo, en the Antibody Purification Handbook, Biosciences, publicación No. 18-1037-46, Edición AC, la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia). El anticuerpo ligado se eluye típicamente de las columnas de proteína A/proteína G al utilizar soluciones amortiguadoras con pH bajo (soluciones amortiguadoras de glicina o acetato de pH 3.0 o menos) con neutralización inmediata de fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones se acumulan, se dializan, y se concentran como sea necesario.

Los pocillos positivos con una colonia evidente individual se vuelven a clonar típicamente y se vuelven a someter a ensayo para asegurar solo que un anticuerpo monoclonal está siendo detectado y producido.

Los anticuerpos también se pueden producir por selección de bibliotecas de combinación de inmunoglobulinas, como se divulga por ejemplo, en (Ward y colaboradores Nature, 341 (1989) p. 544, la divulgación completa de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia).

La identificación de uno o más anticuerpos que liga(n) a TLR3, particularmente de manera sustancial o esencialmente el mismo epítipo como el anticuerpo monoclonal 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 se pueda determinar fácilmente utilizando cualquiera de una variedad de ensayos de clasificación inmunológicos en los cuales se puede someter a ensayo la competición del anticuerpo. Muchos de tales ensayos se practican rutinariamente y son bien conocidos en el campo (ver, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 5,660,827, expedida el 26 de agosto de 1997, que se incorpora específicamente en la presente a manera de referencia). Se entenderá que determinar

actualmente el epítipo al cual un anticuerpo descrito en la presente se liga no es de ninguna forma requerido para identificar un anticuerpo que se liga al mismo o sustancialmente al mismo epítipo como el anticuerpo monoclonal descrito en la presente.

Por ejemplo, donde los anticuerpos de prueba que se examinan se obtienen de diferentes animales de origen, o aún de un diferente isotipo Ig, se puede emplear un ensayo de competición simple en el cual los anticuerpos de control (11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, por ejemplo) y de prueba se mezclan (o pre-adsorben) y se aplican a una muestra que contiene polipéptidos TLR3. Los protocolos basados en el análisis de western blotting y el uso de un análisis BIACORE son adecuados para el uso en tales estudios de competición.

En ciertas modalidades, se pre-mezclan los anticuerpos de control (11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, por ejemplo) con cantidades variantes de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un período de tiempo antes de aplicar a la muestra de antígeno TLR3. En otras modalidades, las cantidades de control y variantes de los anticuerpos de prueba se pueden mezclar simplemente durante la exposición a la muestra de antígeno TLR3. Siempre y cuando se pueda distinguir la ligación de los anticuerpos libres (por ejemplo, al utilizar las técnicas de separación o lavado para eliminar los anticuerpos no ligados) y 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, al utilizar anticuerpos secundarios específicos de especie o específicos de isotipo o al etiquetar específicamente 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 con una etiqueta detectable) se puede determinar si los anticuerpos de prueba reducen la ligación de 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 a los antígenos, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo como 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. La ligación de los anticuerpos de control (etiquetados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el valor alto de control. El valor bajo de control se puede obtener al incubar los anticuerpos etiquetados (11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7) con anticuerpos no etiquetados de exactamente el mismo tipo (11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7), donde la competición se presentará y reducirá la ligación de los anticuerpos etiquetados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo etiquetado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo, es decir, uno que "reacciona de manera cruzada" o compite con el anticuerpo etiquetado (11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7). Cualquier anticuerpo de prueba que reduce la ligación de 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 a los antígenos TLR3 por lo menos aproximadamente 50%, tal como por lo menos aproximadamente 60%, o de manera más preferente por lo menos aproximadamente 80% o 90% (por ejemplo, aproximadamente 65-100%), en cualquier relación de 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7: anticuerpo de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera que es un anticuerpo que se liga a sustancialmente al mismo epítipo o determinante como 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. De manera preferente, tal anticuerpo de prueba reducirá la ligación de 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 al antígeno TLR3 por al menos aproximadamente 90% (por ejemplo, aproximadamente 95%).

La competición también se puede evaluar por, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En tal prueba, las células que llevan un polipéptido TLR3 dado se pueden incubar primero con 11E1, por ejemplo, y luego con el anticuerpo de prueba etiquetado con fluorocromo o biotina. El anticuerpo se dice que compite con 11E1 si la ligación obtenida en la pre-incubación con una cantidad de saturación de 11E1 es aproximadamente 80%, de manera preferente de aproximadamente 50%, aproximadamente 40% o menos (por ejemplo, aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la ligación (como es medida por medio de fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin pre-incubación con 11E1. Alternativamente, un anticuerpo se dice que compite con 11E1 si la ligación obtenida con un anticuerpo 11E1 etiquetado (por un fluorocromo o biotina) en las células pre-incubadas con una cantidad de saturación del anticuerpo de prueba es de aproximadamente 80%, de manera preferente aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, o menos (por ejemplo, aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la ligación obtenida sin pre-incubación con el anticuerpo de prueba.

Un ensayo de competición simple en el cual un anticuerpo de prueba se pre-adsorbe y se aplica en una concentración de saturación a una superficie en la cual un antígeno TLR3 se inmoviliza también se puede emplear. La superficie en el ensayo de competición simple es de manera preferente un chip BIACORE (u otro medio adecuado para el análisis de resonancia de plasmones superficiales). El anticuerpo de control (por ejemplo, 11E1) luego se pone en contacto con la superficie en una concentración de saturación TLR3 y la ligación de TLR3 y superficie del anticuerpo de control se mide. Esta ligación del anticuerpo de control se compara con la ligación del anticuerpo de control a la superficie que contiene TLR3 en ausencia del anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la ligación de la superficie que contiene TLR3 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítipo como el anticuerpo de control tal que el anticuerpo de prueba "reacciona de manera cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la reducción del anticuerpo de control (tal como 11E1) a un antígeno TLR3 por al menos aproximadamente 30% o más, de manera preferente aproximadamente 40%, se puede considerar que es un anticuerpo que se liga sustancialmente al mismo epítipo o determinante como un control (por ejemplo, 11E1). De manera preferente, tal anticuerpo de prueba reducirá la ligación del anticuerpo de control (por ejemplo, 11E1) al antígeno TLR3 por al menos aproximadamente 50% (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, o más). Se apreciará que el orden de los anticuerpos de control y prueba se pueden revertir: es decir, el anticuerpo de control se puede primero ligar a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie después de un ensayo de competición. De manera

preferente, el anticuerpo que tiene afinidad más alta para el antígeno TLR3 se liga a la superficie primero, ya que se esperará que disminuya en la ligación observada para el segundo anticuerpo (asumiendo que los anticuerpos son de reacción cruzada) será de mayor magnitud. Ejemplos adicionales de tales ensayos se proporcionan en, por ejemplo, Saunal (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41, la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia.

La determinación de si un anticuerpo se liga dentro de una región de epítipo se puede llevar a cabo en formas conocidas por la persona experta en el campo. Como un ejemplo de tales métodos de mapeo/caracterización, una región de epítipo para un anticuerpo anti-TLR3 se puede determinar por la "huella" del epítipo utilizando modificación química de las aminas/carboxilo expuestos en la proteína TLR3. Un ejemplo específico de tal técnica de huella es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por la espectrometría de masas) en donde se presenta un intercambio de hidrógeno/deuterio del receptor y los protones de amida de proteína de ligando, ligación, e intercambio posterior, en donde los grupos amida de cadena principal que participan en la ligación de la proteína se protegen del intercambio posterior y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto por proteólisis péptica, separación por cromatografía líquida de alto desempeño de microbore rápida, y/o espectrometría de masas de ionización de electrospray. Ver, por ejemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J. R. and Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítipo adecuada es el mapeo de epítipo de resonancia magnética nuclear (RMN), donde típicamente la posición de las señales en los espectros RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno formado en complejo con el péptido de ligación a antígeno, tal como un anticuerpo, se comparan. El antígeno típicamente se etiqueta de manera selectiva isotópicamente con ¹⁵N de modo que solo las señales que corresponden al antígeno y no señales del péptido de ligación a antígeno se observan en el espectro RMN. Las señales de antígeno que se originan de los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de ligación a antígeno cambiarán típicamente la posición en el espectro del complejo comparado con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la ligación se pueden identificar de esa manera. Ver, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang y colaboradores, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. 1996 Jun; 9 (3): 516-24.

El mapeo/caracterización de epítipos también se puede llevar a cabo utilizando métodos de espectrometría de masas. Ver, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* (2000) 35 (4): 493-503 y Kiselar and Downard, *Anal Chem.* (1999) 71 (9): 1792-801. Las técnicas de digestión de proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítipos. Las regiones/secuencias determinantes-relevantes antigénicas se pueden determinar por la digestión de proteasa, por ejemplo, al utilizar tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 a TLR3 o digestión o/n en un pH 7-8, seguido por el análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación del péptido. Los péptidos protegidos de la escisión de tripsina por el ligador anti-TLR3 se puede identificar subsecuentemente por la comparación de las muestras sujetas a la digestión de tripsina y las muestras incubadas con anticuerpos y luego sometidas a la digestión, por ejemplo, tripsina (revelando de esta manera una huella para el ligador). Otras enzimas como quimiotripsina, pepsina, etc., también, o alternativamente se pueden utilizar en métodos de caracterización de epítipos similares. Por otra parte, la digestión enzimática puede proporcionar un método rápido para analizar si una secuencia determinante antigénica potencial está dentro de una región del polipéptido TLR3 que no se expone en la superficie y, por consiguiente, de manera probable no es relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad. Ver, por ejemplo, Manca, *Ann 1st Super Sanita.* 1991; 27: 15-9 para un planteamiento de técnicas similares.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para la elucidación de un epítipo de ligación. Por ejemplo, en "escaneo de alanina", cada residuo dentro de un segmento de proteínas se reemplaza con un residuo de alanina, y se miden las consecuencias para la afinidad de ligación. Si la mutación conduce a una reducción significativa en la afinidad de ligación, se implica de manera más probable en la ligación. Los anticuerpos monoclonales específicos para los epítipos estructurales (es decir, anticuerpos que no se ligan a la proteína no plegada) se pueden utilizar para verificar que el reemplazo de alanina no influya sobre todo el plegamiento de la proteína. Ver, por ejemplo, Clackson and Wells, *Science* 1995; 267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1-6.

La microscopía electrónica también se puede utilizar para la "obtención de huellas" del epítipo. Por ejemplo, Wang y colaboradores, *Nature* 1992; 355:275-278 utilizó la aplicación coordinada de microscopía de crioelectrones, la reconstrucción de imágenes tridimensionales, y cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento Fab en la superficie de la cápside del virus de mosaico del frijol pinto nativo.

Otras formas de ensayo "sin etiqueta" para la evaluación del epítipo incluyen resonancia de plasmones superficiales (SPR, BIACORE) y espectroscopia de interferencia reflectométrica (RifS). Ver, por ejemplo, Fägerstam y colaboradores, *Journal Of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice y colaboradores, *J. Chromatogr.* 1993; 646:159-168; Leipert y colaboradores, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37:3308-3311; Kröger y colaboradores, *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17:937-944.

Cabe destacar que un anticuerpo que se liga al mismo o sustancialmente el mismo epítipo como un anticuerpo de la invención se puede identificar en uno o más de los ensayos de competición ejemplares descritos en la presente.

Una vez que se identifican los anticuerpos que son capaces de ligarse a TLR3 y/o que tienen otras propiedades deseadas, también se evaluarán típicamente como utilizando métodos estándares incluyendo aquellos descritos en la presente, por su capacidad de ligarse a otro polipéptido, incluyendo polipéptidos no relacionados y otros miembros de la familia TLR (por ejemplo, TLR1, 2, o 4-10 humano). Idealmente, los anticuerpos solo se ligan con afinidad sustancial a TLR3, por ejemplo, TLR3 humano, y no se ligan en un nivel significativo a los polipéptidos no relacionados o a otros miembros de la familia TLR (por ejemplo, TLR2 o TLR4; la secuencia de aminoácidos del TLR4 precursor humano incluyendo un péptido señal en los residuos de aminoácidos 1-23 se encuentra en el número de acceso NCBI NP_612564, la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia). Sin embargo, se apreciará que, siempre y cuando la afinidad de TLR3 sea sustancialmente mayor (por ejemplo, 5x, 10x, 50x, 100x, 500x, 1000x, 10,000x, o más) que para los otros miembros de la familia TLR (u otros polipéptidos no relacionados), entonces los anticuerpos son adecuados para el uso en los presente métodos.

La ligación de los anticuerpos a las células que expresan TLR3 también se puede evaluar en los primates no humanos, por ejemplo, monos rhesus o cynomolgus, u otros mamíferos tales como ratones. La invención por lo tanto proporciona un anticuerpo, así como fragmentos y derivados del mismo, en donde dicho anticuerpo, fragmento o derivado se liga específicamente a TLR3, y que además se liga a TLR3 de los primates no humanos, por ejemplo, monos rhesus o cynomolgus, un polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la captación o localización celular, opcionalmente localización en un compartimiento subcelular tal como la ruta endocítica, se evalúa a fin de seleccionar un anticuerpo que sea fácilmente captado en la célula y/o en el compartimiento celular donde TLR3 se expresa. La captación o localización celular será generalmente medida en las células en las cuales el anticuerpo se busca o se cree que ejerce su actividad, tal como en DC. La captación o localización celular se puede evaluar por métodos estándares, tal como por tinción confocal utilizando un anticuerpo marcado con un resto detectable (por ejemplo, un resto fluorescente).

En la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, se puede llevar a cabo etapas de selección particular para aislar los anticuerpos como es reclamado. En este aspecto, en una modalidad específica, la invención también se refiere a métodos para producir anticuerpos que inhiben la señalización TLR3, que comprenden: (a) proporcionar una pluralidad de anticuerpos; y (b) seleccionar anticuerpos de la etapa (a) que son capaces de ligarse con alta afinidad a un polipéptido TLR3 expresado solamente en la superficie celular. Los anticuerpos se pueden someter a prueba para ligarse a TLR3 bajo condiciones neutras. En una modalidad, la etapa (a) comprende (i) inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido TLR3; y (ii) preparar anticuerpos de dicho animal inmunizado. En una modalidad, la etapa (a) comprende generar bibliotecas de secuencias de anticuerpos (por ejemplo, utilizando la expresión en fago).

La afinidad de ligación bivalente de los anticuerpos para el TLR3 humano bajo condiciones ácidas se puede determinar. Los anticuerpos se pueden caracterizar, por ejemplo, por una KD media de no más de aproximadamente (es decir mejor afinidad que) 100, 60, 10, 5, o 1 nanomolar, de manera preferente sub-nanomolar u opcionalmente no más de aproximadamente 300, 200, 100 o 10 picomolar. La KD se puede determinar, por ejemplo, por ejemplo, al inmovilizar proteínas TLR3 humanas recombinantemente producidas sobre una superficie de chip, seguida por la aplicación del anticuerpo que se somete a prueba en solución, por ejemplo, como se muestra en los presente ejemplos. Para seleccionar los anticuerpos que retienen ligación similar bajo condiciones ácidas y neutras, se puede minimizar la diferencia observada entre la ligación entre pH neutro (por ejemplo, 7.2) y pH ácido (por ejemplo, un pH en el intervalo de 4.5-6.5), por ejemplo, donde la afinidad de ligación en el pH ácido no es sustancialmente más baja, por ejemplo, donde la KD para la ligación a TLR3 disminuye por no más de 0.2-, 0.3-, 0.5-, 1.0-, o 1.5- log10, que aquella observada en pH no ácido. En una modalidad, el método comprende además una etapa (d), seleccionar anticuerpos de (b) que son capaces de competir para la ligación a TLR3 con el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, o que son capaces de (o no capaces de) competir para la ligación a TLR3 con el ARNDs (por ejemplo, poliAU).

En un aspecto de cualquiera de las modalidades, los anticuerpos preparados de acuerdo con los presentes métodos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano utilizado para producir anticuerpos de acuerdo con los métodos de la invención es un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, rata), bovino, porcino, ave de corral, caballo, conejo, cabra u oveja. Los anticuerpos de la presente invención abarcan 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7. Sin embargo, se apreciará que otros anticuerpos se pueden obtener utilizando los métodos descritos en la presente, y de esta manera los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos diferentes a 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7. Adicionalmente, los anticuerpos de la invención se pueden especificar opcionalmente para ser anticuerpos diferentes a cualquiera de los anticuerpos 31C3, 29H3, 23C8, 28F11 o 34A3 divulgados en WO2011/004028 o como se depositan en Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue de Docteur Roux, F-75724 Paris el 3 de Julio de 2009, bajo el número CNCM I-4187 (29H3.7) y CNCM I-4186 (31C3.1), anticuerpo TLR3.7 (eBioScience Inc., San Diego), anticuerpo C1068 de WO 06/060513, anticuerpo C1130 de WO 2007/051164, cualquiera de los anticuerpos descritos en WO2010/051470, por ejemplo, anticuerpos 1-19 y F17-F19, y sus variantes tales como 15EVQ y 12QVQ/QSV, anticuerpo 40C1285 (Abcam), o anticuerpos 619F7, 713E4, 716G10, IMG-5631, IMG-315 o IMG-5348 (todos de Imgenex. Corp.) o derivados de los anteriores, por ejemplo, que comprenden la región de ligación a antígeno en totalidad o en parte. Cada una de las divulgaciones anteriores se incorpora en la presente a manera de referencia.

De acuerdo con una modalidad alterna, el ADN que codifica un anticuerpo que se liga a un epítipo presente en los polipéptidos TLR3 se aísla del hibridoma de esta invención y se coloca en un vector de expresión apropiado para la transfección en un hospedero apropiado. El hospedero luego se utiliza para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento a antígeno del anticuerpo, o versiones que comprenden un resto detectable.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar sondas de oligonucleótidos que son capaces de ligarse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de murino). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en los vectores de expresión, que luego se transfectan en las células hospederas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. Como se describe en cualquier lugar en la presente solicitud, tales secuencias de ADN se pueden modificar por cualquiera de una gran variedad de propósitos, por ejemplo, para humanizar anticuerpos, producir fragmentos o derivados, o para modificar la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, en el sitio de ligación a antígeno a fin de optimizar la especificidad de ligación del anticuerpo.

La expresión recombinante en las bacterias del ADN que codifica el anticuerpo es bien conocida en el campo (ver, por ejemplo, Skerra y colaboradores, *Curr. Opin. in Immunol.*, 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, *Immunol.* 130, p. 151 (1992).

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

En ciertas modalidades, los anticuerpos de esta invención son capaces de modular, por ejemplo, inhibir la señalización por, polipéptidos TLR3, y en consecuencia para modular la actividad o comportamiento de las células que expresan TLR3. Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir la activación de las células que expresan TLR3, por ejemplo, pueden inhibir la ruta de señalización TLR3, opcionalmente al bloquear la ligación a TLR3 de los ligandos naturales o endógenos tal como ARNds; opcionalmente pueden bloquear la capacidad de la proteína TLR3 para formar homodímeros en presencia de un ligando TLR3, bloqueando de esta manera el inicio de una cascada de señalización. Se hace referencia a estos anticuerpos de esta manera como anticuerpos "neutralizantes" o "inhibidores" o "de bloqueo". Tales anticuerpos son útiles, *inter alia*, para disminuir la actividad de las células inmunes que expresan TLR3, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de afecciones que implican la actividad de células que expresan TLR3 en exceso o número, o en donde la actividad de las células que expresan TLR3 disminuida puede mejorar, prevenir, eliminar, o de cualquiera manera mejorar la afección o cualquier síntoma del mismo.

Un intervalo de ensayos celulares se puede utilizar para evaluar la capacidad de los anticuerpos para modular la señalización TLR3. Cualquiera de una gran variedad de ensayos, incluyendo modelos moleculares, basados en células, y basados en animales se puede utilizar para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-TLR3 para modular la actividad de células que expresan TLR3. Por ejemplo, se pueden utilizar en ensayos basados en células en las cuales las células que expresan TLR3 se exponen al ARNds, ARNds viral, poliIC, o poliAU, u otro ligando TLR3 y la capacidad del anticuerpo para alterar la ligación del ligando o la estimulación del receptor (como se determina, por ejemplo, al examinar cualquiera de las actividades de células TLR3 tratadas en la presente, tal como la expresión del interferón, actividad NFkB, activación de células NK, etc.) es evaluada. El ligando TLR3 utilizado en los ensayos puede estar en cualquier forma adecuada, incluyendo, pero no limitado a como una composición de ligando purificada, en una mezcla con ligandos no TLR3, en una composición de origen natural, en una célula o sobre la superficie de una célula, o secretada por una célula (por ejemplo, una célula que produce ligando se utiliza en el ensayo), en solución o sobre un soporte sólido.

La actividad de las células que expresan TLR3 también se puede evaluar en ausencia de un ligando, al exponer las células al propio anticuerpo y al evaluar su efecto en cualquier aspecto de la actividad o comportamiento de las células. En tales ensayos, un nivel de línea base de actividad (por ejemplo, producción de citoquinas, proliferación, ver posteriormente) de las células que expresan TLR3 se obtiene en la ausencia de un ligando, y la capacidad del anticuerpo o compuesto para alterar el nivel de actividad de línea base se detecta. En una modalidad de este tipo, se utiliza un procedimiento de clasificación de alto rendimiento para identificar los compuestos capaces de afectar la activación del receptor.

Cualquier cambio fisiológico adecuado que refleja la actividad TLR3 se puede utilizar para evaluar los anticuerpos de prueba o derivados de anticuerpo. Por ejemplo, se puede medir una variedad de efectos, tales como cambios en la expresión génica (por ejemplo, genes que responden a NFkB), secreción de proteínas (por ejemplo, interferón), crecimiento celular, proliferación celular, pH, segundos mensajeros intracelulares, por ejemplo, Ca^{2+} , IP3, cGMP, o cAMP, o actividad tal como capacidad para activar las células NK. En una modalidad, la actividad del receptor se evalúa al detectar la producción de citoquinas, por ejemplo, citoquinas sensibles a TLR3, citoquinas pro-inflamatorias.

La modulación TLR3 se puede evaluar utilizando cualquiera de una variedad de sistemas de lectura posibles, la mayoría basado en una ruta de transducción de señal TLR/IL-1R, que implican, por ejemplo, la ruta de transducción de señal independiente MyD88/dependiente TRIF, que implica, por ejemplo, IRF3, IRF7, IKK ϵ y/o TBK1 (Akira and Takeda (2004) Nature Review Immunol. 4:499-511). Estas rutas activan las cinasas incluyendo el complejo de cinasa KB. La activación TLR3 se puede evaluar al examinar cualquier aspecto de la señalización TLR. Por ejemplo, la activación de la señalización TLR desencadena alteraciones en las asociaciones de proteína-proteína (por ejemplo, TRIF con TBK y/o IKK ϵ), en la localización intracelular de las proteínas (tal como el movimiento de NK-kB en el núcleo), y en la expresión génica (por ejemplo, en la expresión de genes sensibles a NK-kB), y la producción de citoquinas (por ejemplo, la producción y secreción de IFN-gamma, IL-6, IP10, MCP-1). Cualquiera de tal alteración se puede detectar y utilizar para detectar la activación TLR3. En una modalidad, la estimulación TLR3 se detecta al recolectar sobrenadantes después de 18-20 hr de cultivo y medir los niveles de IFN-gamma, IL-6, IP-10 y/o MCP-1 por el ELISA de intercalación. En otra modalidad, la estimulación TLR3 se detecta al recolectar sobrenadantes después de 18-20 hr de cultivo y al medir los niveles de IFN-gamma, IL-6, IP-10 y/o MCP-1 por el ELISA de intercalación.

En una modalidad, las células que expresan naturalmente TLR3 son utilizadas, tal como DC (por ejemplo, DC mielóide o DC derivada de monocitos). En otra modalidad, se utilizan células que contienen un constructo reportero que provoca la expresión de un producto génico detectable en la estimulación TLR3 y la activación subsecuente de la ruta de transducción de señal. Los genes reporteros y los constructos de genes reporteros útiles particularmente para los ensayos incluyen, por ejemplo, un gen reportero ligado operativamente a un promotor sensible a NF-kB o a una señalización mediada por, particularmente TRIF, IRF3, IRF7, IKK ϵ , TBK1. Ejemplos de tales promotores incluyen, sin limitación, aquellos para IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 p40, IP-10, CD80, CD86, y TNF- α . El gen reportero ligado operativamente al promotor sensible a TLR puede incluir, sin limitación, una enzima (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), etc.), un marcador de bioluminiscencia (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 5,491,084), proteína fluorescente azul (BFP, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 6,486,382), etc.), una molécula expresada sobre la superficie (por ejemplo, CD25, CD80, CD86), y una molécula secretada (por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 p40, TNF- α). Ver, por ejemplo, Hcker H y colaboradores (1999) EMBO J. 18:6973-82; Murphy TL y colaboradores (1995) Mol Cell Biol 15:5258-67, las divulgaciones de las cuales se incorporan en la presente a manera de referencia. Los plásmidos reporteros adecuados para el uso son comercialmente disponibles (InvivoGen, San Diego, CA). En una modalidad, el ensayo incluye determinar, en una célula hospedera preparada para expresar un polipéptido TLR3 humano, si una composición de prueba induce la expresión de luciferasa (u otro reportero) bajo el control de un promotor sensible a la señalización TLR3 (por ejemplo, ISRE, elemento de respuesta estimulada por IFN).

En los ensayos que dependen de la lectura de la actividad enzimática, el sustrato se puede suministrar como parte del ensayo, y la detección puede implicar la medición de la quimioluminiscencia fluorescencia, desarrollo de color, incorporación de la etiqueta radiactiva, resistencia a fármacos, densidad óptica, u otro marcador de actividad enzimática. Para los ensayos que dependen de la expresión superficial de una molécula, la detección se puede lograr utilizando análisis de citometría de flujo (FACS) o ensayos funcionales. Las moléculas secretadas se pueden evaluar utilizando un ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA) o bioensayos. Muchos de estos y otros sistemas de lectura adecuados son bien conocidos en el campo y son comercialmente disponibles. De manera preferente, el sistema reportero, cualquiera que se utilice, es cuantificable.

En otra modalidad, el efecto de los anticuerpos en las células que expresan TLR3 se evalúa en los primates no humanos in vivo. Por ejemplo, se administra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TLR3 de la presente invención a un primate no humano que es ya sea sano o afectado por una afección, por ejemplo, una enfermedad o inflamación autoinmunitaria y se evalúa el efecto de la administración en, por ejemplo, el número o actividad de células que expresan TLR3 en el primate, la presencia y/o niveles de citoquinas, o en la progresión de la afección. Cualquier anticuerpo o derivado de anticuerpo o fragmento que lleve a cabo un cambio detectable en cualquiera de estos parámetros relacionados a TLR3 es candidato para el uso en los métodos descritos en la presente.

En cualquiera de los ensayos descritos en la presente, un incremento o disminución de 5%, 10%, 20%, de manera preferente 30%, 40%, 50%, de manera mucho más preferente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o mayor en cualquier medición detectable de actividad estimulada por TLR3 en las células indica que el anticuerpo de prueba es adecuado para el uso en los presentes métodos.

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

Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se ligan a los polipéptidos TLR3 humanos. En una modalidad, los anticuerpos son anticuerpos TLR3 antagonistas. En otra modalidad, los anticuerpos bloquean la señalización inducida a través del TLR3 humano.

Los anticuerpos tienen opcionalmente afinidad (K_D) en un pH ácido, es decir un pH de aproximadamente 5.6, de menor que 10^{-9} M, de manera preferente menor que 10^{-10} M. En otra modalidad, los anticuerpos tienen una afinidad (K_D) en un pH neutro, es decir un pH de aproximadamente 7.2, de menor que 10^{-9} M, de manera preferente menor que 10^{-10} M. En otra modalidad, los anticuerpos tienen una afinidad (K_D) en un pH ácido, es decir un pH de aproximadamente 5.6, y en un pH neutro, es decir un pH de aproximadamente 7.2, de menor que 10^{-9} M, de manera preferente menor que 10^{-10} M. La afinidad puede ser, por ejemplo, monovalente o bivalente que se liga a TLR3.

En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de inhibir la señalización TLR3 en presencia de un ligando TLR3, es decir ARNDs (poliAU, poliC). En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de inhibir la señalización TLR3 cuando se administran después de un ligando TLR3. En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de inhibir la señalización TLR3 cuando se administran antes de un ligando TLR3. En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de inhibir la señalización TLR3 cuando se administran simultáneamente con un ligando TLR3.

En otra modalidad, los anticuerpos compiten para la ligación con ARNDs al sitio de ligación a ARNDs N-terminal del polipéptido TLR3. En otra modalidad, los anticuerpos no compiten para la ligación con ARNDs al sitio de ligación a ARNDs C-terminal del polipéptido TLR3.

Epítopos de Anticuerpo

En otra modalidad, los anticuerpos se ligan sustancialmente al mismo epítipo como el anticuerpo 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7. En una modalidad, todos los residuos claves de los epítopos están en un segmento que corresponde a los residuos 1 a 251 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1. En una modalidad, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos en el segmento que corresponde a los residuos 1 a 251 (o 41-139, 41-115, 41-120 o 41-251) del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1. En otra modalidad, los anticuerpos se ligan a uno o más aminoácidos presentes sobre la superficie del polipéptido TLR3 dentro de los epítopos ligados por los anticuerpos anti-TLR3 de la invención, opcionalmente, los anticuerpos se ligan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos seleccionados del grupo que consiste en: 41, 43, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 86, 88, 89, 91, 92, 93, 96, 97, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 120, 121, 132, 134, 137 y residuo 139 de SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a por lo menos parcialmente (o principalmente) en la superficie lateral sin glicano de la porción N-terminal del polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan por lo menos parcialmente (o principalmente) sobre la cadena principal de la porción N-terminal del polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan por lo menos parcialmente (o principalmente) sobre la superficie lateral sin glicano de la porción N-terminal del polipéptido TLR3 humano y parcialmente sobre la cadena principal de la porción N-terminal del polipéptido TLR3 humano. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a uno o más residuos de aminoácidos dentro de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 que se implica en la ligación del polipéptido TLR3 a ARNDs, y/o residuos adyacentes a los mismos. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuos 41 y/o residuo 43 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de residuos 60, 61, 62, 64, 65, 67 y/o residuo 68 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2 o 3 de residuos 86, 88 y/o residuo 89 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de residuos 91, 92, 93, 96, 97 y/o residuo 121 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más de residuos 108, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 120. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3 o 4, de residuos 132, 134, 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3 o, 4 de los residuos 112, 113, 115, 117, 120, 137 y 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 117 y residuos 137 y/o 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 120 y residuos 137 y/o 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 117 y/o 120 pero no los residuos 137 y/o 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los residuos R64, R65, T86 y K89, K137 y K139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 64 y residuos 137 y/o 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 65 y residuos 137 y/o 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 86 y residuos 137 y/o 139. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende residuo 89 y residuos 137 y/o 139. En una modalidad, los residuos de aminoácidos dentro de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 que se implica en la ligación del polipéptido TLR3 a ARNDs, y/o residuos adyacentes a los mismos, se seleccionan del grupo que consiste en los residuos 41, 43, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 86, 88, 89, 108, 110, 112, 113, 114, 132, 134, 137 y residuo 139 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos se ligan a un epítipo que comprende 1, 2, 3 o, 4 de los residuos 112, 113 y 137 de SEQ ID NO: 1. En una modalidad, los residuos de aminoácidos dentro de la cadena principal de la porción N-terminal del polipéptido TLR3 humano se seleccionan del grupo que consiste en los residuos 91, 92, 93, 96, 97, 117, 120 y 121 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, los anticuerpos no se ligan, o no se

ligan principalmente, en la superficie lateral que contiene glicano de la porción N-terminal del polipéptido TLR3 humano.

Opcionalmente, en cualquier modalidad, los anticuerpos se pueden caracterizar opcionalmente además por no ligarse sustancialmente a uno, dos, tres, o más residuos en el segmento que corresponde a los residuos 174 a 191 residuos 465-619, o a los residuos 116, 145 y/o 182, del polipéptido maduro TLR3 de SEQ ID NO: 1. En otra modalidad, los anticuerpos se ligan a, u opcionalmente no se ligan a, un epítipo que comprende uno o más residuos en el segmento que corresponde a los residuos 177 a 191, 224 a 243, 280 a 286, 295 a 374, 379 a 391, 428 a 459, 461 a 487, 524 a 529, 533 a 542, 546 a 569, 575 a 581, 583 a 605, 607 a 623, 641 a 657 y/o 670 a 705 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1.

La sección de Ejemplos en la presente describe la construcción de una serie de polipéptido TLR3 mutantes humanos. La ligación del anticuerpo anti-TLR3 a las células transfectadas con los mutantes TLR3 se midió y se comparó con la capacidad del anticuerpo anti-TLR3 para ligarse al polipéptido TLR3 de tipo natural (SEQ ID NO:1). Una reducción en la ligación entre un anticuerpo anti-TLR3 y un polipéptido TLR3 mutante como se utiliza en la presente significa que existe una reducción en la afinidad de ligación (por ejemplo, como es medida por los métodos conocidos tales como la prueba FACS de las células que expresan un mutante particular, o por la prueba Biacore para la ligación a los polipéptidos mutantes) y/o una reducción en la capacidad de ligación total del anticuerpo anti-TLR3 (por ejemplo, como es evidenciado por una disminución en Bmax en una gráfica de concentración de anticuerpos anti-TLR3 versus concentración de polipéptido). Una reducción significativa en la ligación indica que el residuo mutado se implica directamente en la ligación al anticuerpo anti-TLR3 o está en proximidad cercana a la proteína de ligación cuando el anticuerpo anti-TLR3 se liga a TLR3. Un epítipo de anticuerpo incluirá de manera preferente de esta manera tal residuo y puede incluir residuos adicionales adyacentes a tal residuo.

En algunas modalidades, una reducción significativa en la ligación significa que la afinidad de ligación y/o capacidad entre un anticuerpo TLR3 y un polipéptido TLR3 mutante se reduce por mayor que 40%, mayor que 50%, mayor que 55%, mayor que 60%, mayor que 65%, mayor que 70%, mayor que 75%, mayor que 80%, mayor que 85%, mayor que 90% o mayor que 95% relativo con la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural (por ejemplo, el polipéptido mostrado en SEQ ID NO:1). En ciertas modalidades, la ligación se reduce por debajo de los límites detectables. En algunas modalidades, una reducción significativa en la ligación es evidenciada cuando la ligación de un anticuerpo anti-TLR3 a un polipéptido TLR3 mutante es menor que 50% (por ejemplo, menor que 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% o 10%) de la ligación observada entre el anticuerpo anti-TLR3 y un polipéptido TLR3 de tipo natural (por ejemplo, el dominio extracelular mostrado en SEQ ID NO:1). Tales mediciones de ligación se pueden hacer utilizando una variedad de ensayos de ligación conocidos en el campo. Un ejemplo específico de uno de tal ensayo se describe en la sección de ejemplos.

En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos anti-TLR3 que muestran significativamente menor ligación para un polipéptido TLR3 mutante en el cual un residuo en el polipéptido TLR3 de tipo natural (por ejemplo, SEQ ID NO:1) se sustituye. En la anotación abreviada utilizada en la presente, el formato es: residuo de tipo natural: Posición en el polipéptido: residuo mutante, con la numeración de los residuos como se indica en SEQ ID NO: 1.

Opcionalmente, los anticuerpos tienen ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una sustitución en los residuos 41, 43, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 86, 88, 89, 91, 92, 93, 96, 97, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 120, 121, 132, 134, 137 y/o residuo 139 de SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti-TLR3 se liga a un polipéptido TLR3 de tipo natural que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 pero tiene ligación disminuida a un polipéptido TLR3 mutante que tiene cualquiera de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las siguientes mutaciones: R64Q, R65Q, T86S, K89Q, K117Q, A120V, K137S y/o K139A (con referencia a SEQ ID NO:1). De manera preferente la ligación al TLR3 mutante se reduce significativamente comparada con la ligación al TLR3 de tipo natural.

En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de inhibir la secreción de citoquinas (por ejemplo, IP-10) en las células dendríticas mieloides (MddC). En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de internalizarse en una célula que expresa TLR3 rápida y eficientemente. En otra modalidad, los anticuerpos son capaces de internalizarse sin inducir o requerir la modulación por decremento de hTLR3.

Secuencias CDR de Anticuerpo

En un aspecto de cualquiera de las modalidades de la invención, un anticuerpo puede comprender una cadena pesada y/o ligera que tiene secuencias CDR1, 2 y/o 3 de acuerdo con la fórmula respectiva seleccionada de las Fórmulas (I) a (VII). En cualquier modalidad en la presente, una LCDR1 particular o -2 o HCDR-1 o 2 se pueden especificar por tener una secuencia de las Fórmulas (I) a (VII). En cualquier modalidad en la presente, una HCDR1-3 o LCDR1-3 particular se puede especificar por tener una secuencia de Fórmulas (I) a (VII). En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende las tres LCDRs y una cadena pesada que comprende las tres HCDRs. Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones

variables de cadena ligera y/o pesada se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4.

En una modalidad, LCDR1 comprende una secuencia de la Fórmula (I):

Xaa₁-A-S-E- Xaa₂-I- Xaa₃- Xaa₄-Xaa₅-L-A (I) (SEQ ID NO: 58),

en donde Xaa₁ a Xaa₅ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₁ puede ser Leu o Gln, y/o Xaa₂ puede ser Asp o Gly, y/o Xaa₃ puede ser Ser o Tyr, y/o Xaa₄ puede ser Asn o Ser, y/o Xaa₅ puede ser Asp, Tyr o Gly.

En una modalidad, LCDR2 comprende una secuencia de la Fórmula (II):

A-A- Xaa₆-R-L- Xaa₇-D (II) (SEQ ID NO: 59),

en donde Xaa₆ a Xaa₇ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₆ puede ser Ser o Asn y/o Xaa₇ puede ser Glu o Gln.

En una modalidad, LCDR3 comprende una secuencia de la Fórmula (III):

Xaa₈-Q-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-P-Xaa₁₃-T (III) (SEQ ID NO: 60),

en donde Xaa₈ a Xaa₁₃ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₈ puede ser Leu o Gln, y/o Xaa₉ puede ser Ser, Asn o Gly, y/o Xaa₁₀ puede ser Tyr, Ser o Val, y/o Xaa₁₁ puede ser Lys o Glu, y/o Xaa₁₂ puede ser Phe o Tyr, y/o Xaa₁₃ puede ser Asn, Tyr, Leu o Val.

En una modalidad, HCDR1 comprende una secuencia de la Fórmula (IV):

Xaa₁₄- Xaa₁₅-Y- Xaa₁₆- Xaa₁₇ (IV) (SEQ ID NO: 61),

en donde Xaa₁₄ a Xaa₁₇ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₁₄ puede ser Tyr o Ser, y/o Xaa₁₅ puede ser Thr o Asn, y/o Xaa₁₆ puede ser Met o Ile, y/o Xaa₁₇ puede ser Tyr o His.

En una modalidad, HCDR1 comprende una secuencia de la Fórmula (V):

G-Y-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Xaa₂₁ (V) (SEQ ID NO: 62),

en donde Xaa₁₈ a Xaa₂₁ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₁₈ puede ser Thr o Asn, y/o Xaa₁₉ puede ser Phe o Ile, y/o Xaa₂₀ puede ser Arg, Trp o Thr, y/o Xaa₂₁ puede ser Tyr o Ser.

En una modalidad, HCDR2 comprende una secuencia de la Fórmula (VI):

Xaa₂₂-I- Xaa₂₃-P- Xaa₂₄- Xaa₂₅-G (VI) (SEQ ID NO: 63),

en donde Xaa₂₂ a Xaa₂₅ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₂₂ puede ser Arg o Trp, y/o Xaa₂₃ puede ser Asp o Phe, y/o Xaa₂₄ puede ser Ala o Gly, y/o Xaa₂₅ puede ser Asn o Asp. Opcionalmente HCDR de la Fórmula VI comprende además una secuencia- Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈, en donde Xaa₂₆ a Xaa₂₈ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₂₆ puede ser Asp o Asn, y/o Xaa₂₇ puede ser Thr o Ser, y/o Xaa₂₈ puede ser Asn o Ile.

En una modalidad, HCDR3 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 21, 32, 43 o 54, o de la Fórmula (VII):

G-Xaa₂₉-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Y-F-D (VII) (SEQ ID NO: 64),

en donde Xaa₂₉ a Xaa₃₁ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora o una supresión o inserción, de manera preferente, en donde Xaa₂₉ puede ser una supresión o Glu, y/o Xaa₃₀ puede ser Phe o Asp, y/o Xaa₃₁ puede ser Asp o Trp.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención puede comprender una cadena ligera que comprende:

a. una secuencia de aminoácidos CDR1 de cadena ligera (LCDR1) seleccionada de SEQ ID NOS: 22, 33, 44, 55 y 58; y/o

b. una secuencia de aminoácidos CDR2 de cadena ligera (LCDR2) seleccionada de SEQ ID NOS: 23, 34, 45, 56 y 59; y/o

c. una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena ligera (LCDR3) seleccionada de SEQ ID NOS: 24, 35, 46, 57 y 60.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención puede comprender una cadena pesada que comprende:

a. una secuencia de aminoácidos CDR1 de cadena pesada (HCDR1) seleccionada de SEQ ID NOS: 16-18, 27-29, 38-40, 49-51 y 61-62; y/o

b. una secuencia de aminoácidos CDR2 de cadena pesada (HCDR2) seleccionada de SEQ ID NOS: 19, 20, 31, 31, 41, 42, 52, 53 y 63; y/o

c. una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada (HCDR3) seleccionada de SEQ ID NOS: 21, 32, 43, 54, y 64.

Anticuerpo 11E1

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 11E1 se lista como SEQ ID NO:3, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se lista como SEQ ID NO: 4. En una modalidad específica, la invención proporciona un anticuerpo que se liga esencialmente al mismo epítipo o determinante como los anticuerpos monoclonales 11E1; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de ligación a antígeno del anticuerpo 11E1. En cualquiera de las modalidades en la presente, el anticuerpo 11E1 se puede caracterizar por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 11E1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 11E1. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDRs de la región variable de cadena pesada de 11E1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 11E1 o una, dos o tres de las CDRs de la región variable de cadena ligera de 11E1. Opcionalmente cualquiera de una o más de las CDRs de cadena ligera o pesada puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprenden en parte o todo de la región de ligación a antígeno del anticuerpo 11E1 se fusiona a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otra modalidad preferida el anticuerpo es 11E1.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un polinucleótido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 5, 6 o 7, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 8 o 9, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 10, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 11, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:12, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 13, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se liga a TLR3 humano, que comprende:

a. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

b. la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

c. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3, en donde uno, dos, tres o más de aminoácidos se puede sustituir por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

d. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 5-10, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

e. las secuencias de aminoácido CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 11-13, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

f. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 5-10, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 11-13, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

g. la región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

h. la región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, cualquiera de las CDRs 1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras se puede caracterizar por tener una secuencia de aminoácidos que comparte por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDRs listadas en la SEQ ID NO correspondiente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite para la ligación a TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), en lo anterior.

Anticuerpo 31F6

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 31F6 se lista como SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se lista como SEQ ID NO: 15. En una modalidad específica, la invención proporciona un anticuerpo que se liga esencialmente al mismo epítipo o determinante como los anticuerpos monoclonales 31F6; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de ligación a antígeno del anticuerpo 31F6. En cualquiera de las modalidades en la presente, el anticuerpo 31F6 se puede caracterizar por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 31F6. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 31F6. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDRs de la región variable de cadena pesada de 31F6. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 31F6 o una, dos o tres de las CDRs de la región variable de cadena ligera de 31F6. Opcionalmente cualquiera de una o más de las CDRs de cadena ligera o pesada puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprende en parte o todo de la región de ligación a antígeno del anticuerpo 31F6 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otra modalidad preferida, el anticuerpo es 31F6.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un polinucleótido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 16, 17 o 18, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 19 o 20, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; un región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 21, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 22, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 23, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 24, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se liga a TLR3 humano, que comprende:

a. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

b. la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

c. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, en donde uno, dos, tres o más de aminoácidos se puede sustituir por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

d. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 16-21, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

e. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 22-24, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

f. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 16-21, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 22-24, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

g. la región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

h. la región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de estos aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, cualquiera de las CDRs 1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras se puede caracterizar por tener una secuencia de aminoácidos que comparte por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDRs listadas en la SEQ ID NO correspondiente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite para la ligación a TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), en lo anterior.

Anticuerpo 32C4

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 32C4 se lista como SEQ ID NO: 25, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se lista como SEQ ID NO: 26. En una modalidad específica, la invención proporciona un anticuerpo que se liga esencialmente al mismo epítipo o determinante como los anticuerpos monoclonales 32C4; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de ligación a antígeno del anticuerpo 32C4. En cualquiera de las modalidades en la presente, el anticuerpo 32C4 se puede caracterizar por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 32C4. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 32C4. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDRs de la región variable de cadena pesada de 32C4. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 32C4 o una, dos o tres de las CDRs de la región variable de cadena ligera de 32C4. Opcionalmente cualquiera de una o más de dichas CDRs de cadena ligera o pesada puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprende parte o todo de una región de ligación a antígeno del anticuerpo 32C4 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otra modalidad preferida el anticuerpo es 32C4.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un polinucleótido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 27, 28 o 29, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 30 o 31, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 32, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos

como se expone en SEQ ID NO: 33, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 34, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 35, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se liga a TLR3 humano, que comprende:

a. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

b. la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

c. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 26, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

d. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 27-32, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

e. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 33-35, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

f. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 27-32, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 33-35, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

g. la región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

h. la región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, cualquiera de las CDRs 1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras se puede caracterizar por tener una secuencia de aminoácidos que comparte por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDRs listadas en la SEQ ID NO correspondiente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite para la ligación a TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), en lo anterior.

Anticuerpo 37B7

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 37B7 se lista como SEQ ID NO:36, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se lista como SEQ ID NO: 37. En una modalidad específica, la invención proporciona un anticuerpo que se liga esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 37B7; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de ligación a antígeno del anticuerpo 37B7. En cualquiera de las modalidades en la presente, anticuerpo 37B7 se puede caracterizar por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 37B7. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 37B7. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDRs de la región variable de cadena pesada de 37B7. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 37B7 o una, dos o tres de las CDRs de la región variable de cadena ligera de 37B7. Opcionalmente cualquiera de una o más de dichas CDRs de cadena ligera o pesada puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprende parte o todo de una región

de ligación a antígeno del anticuerpo 37B7 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otra modalidad preferida el anticuerpo es 37B7.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un polinucleótido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 38, 39 o 40, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 41 o 42, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 43, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 44, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 45, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 46, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se liga a TLR3 humano, que comprende:

a. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

b. la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

c. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

d. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 38-43, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

e. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 44-46, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

f. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 38-43, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 44-46, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

g. la región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

h. la región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, cualquiera de las CDRs 1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras se puede caracterizar por tener una secuencia de aminoácidos que comparte por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDRs listadas en la SEQ ID NO correspondiente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite para la ligación a TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), en lo anterior.

Anticuerpo 7G11

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7G11 se lista como SEQ ID NO: 47, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se lista como SEQ ID NO: 48. En una modalidad específica, la invención proporciona un anticuerpo que se liga esencialmente al mismo epítipo o determinante como

los anticuerpos monoclonales 7G11; opcionalmente el anticuerpo comprende una región de ligación a antígeno del anticuerpo 7G11. En cualquiera de las modalidades en la presente, anticuerpo 7G11 se puede caracterizar por su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En una modalidad preferida, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 7G11. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 7G11. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDRs de la región variable de cadena pesada de 7G11. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 7G11 o una, dos o tres de las CDRs de la región variable de cadena ligera de 7G11. Opcionalmente cualquiera de una o más de las CDRs de cadena ligera o pesada puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada que comprende parte o todo de una región de ligación a antígeno del anticuerpo 7G11 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1 o IgG4 humano. En otra modalidad preferida el anticuerpo es 7G11.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un polinucleótido purificado que codifica un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región VHCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 49, 50 o 51, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 52 o 53, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VHCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 54, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 55, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 56, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región VLCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 57, en donde uno o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se liga a TLR3 humano, que comprende:

a. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 47, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

b. la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 48, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

c. la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 47, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 48, en donde uno, dos, tres o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

d. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 49-54, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

e. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 55-57, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

f. las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 49-54, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; y las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3) como se muestra en SEQ ID NOS: 55-57, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

g. la región variable de cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; o

h. la región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos CDRs 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) que son cada uno por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% idénticas a las CDRs 1, 2 y 3 de la región variable que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.

En otro aspecto de cualquiera de las modalidades en la presente, cualquiera de las CDRs 1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras puede ser caracterizada por tener una secuencia de aminoácidos que comparte por lo menos

50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con la CDR particular o conjunto de CDRs listadas en la SEQ ID NO correspondiente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite para la ligación a TLR3 con un anticuerpo monoclonal de (a) a (h), en lo anterior.

Las secuencias CDR para los anticuerpos 7G11 y 32C4 se derivan de las redistribuciones de genes VL y VH de los genes IGKV12s30*01 y IGHV1s6*01 de rata para las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente. Las secuencias CDR para la cadena pesada del anticuerpo 31F6 también se derivan de una redistribución de gen VH del gen IGHV1s6*01 de rata mientras que la secuencia CDR de cadena ligera se deriva de una redistribución de gen VL del gen IGKV12s8*0 de rata. En un aspecto de la invención, la cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se obtiene o se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos derivada de una redistribución del gen VL seleccionado de IGKV12s30*01 y IGKV12s8*0 para el gen V. En un aspecto de la invención, la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se obtiene o se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos derivada de una redistribución del gen VH seleccionado de IGHV1s6*01 para el gen V.

En cualquiera de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, la región variable especificada y las secuencias CDR pueden comprender modificaciones de secuencia conservadoras. Modificaciones de secuencia conservadora se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de ligación del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la invención por técnicas estándares conocidas en el campo, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas típicamente en las cuales un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con similares propiedades fisicoquímicas. La región variable especificada y las secuencias CDR pueden comprender una, dos, tres, cuatro o más inserciones, supresiones, o sustituciones de aminoácidos. Donde se hacen sustituciones, las sustituciones preferidas serán modificaciones conservadoras. Las familias de los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención se puede reemplazar con otros residuos de aminoácidos para la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado se puede someter a prueba para función retenida (*es decir*, las propiedades expuestas en la presente) utilizando los ensayos descritos en la presente.

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

Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la coincidencia más larga entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad se describen en los programas de computadora públicamente disponibles. Los métodos de programa de computadora preferidos para determinar la identidad entre las dos secuencias incluyen el paquete de programa GCG, incluyendo GAP (Devereux y colaboradores, Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul y colaboradores, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX es públicamente disponible de National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y colaboradores NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y colaboradores, supra). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido también se puede utilizar para determinar la identidad.

Las secuencias de las CDRs de los anticuerpos de acuerdo con la invención, de acuerdo con AbM (definición de software de Modelación de anticuerpo AbM de Oxford Molecular), los sistemas de definiciones de Kabat y Chothia, se han resumido en las Tablas 1 y 2 a continuación. Las secuencias de aminoácidos descritas en la presente se numeran de acuerdo con los sistemas de numeración Abm, Kabat y Chothia. Mientras que cualquier sistema de numeración adecuado se puede utilizar para designar las regiones CDR, en ausencia de cualquiera de otra

indicación, se puede utilizar la numeración Abm. Tal numeración se ha establecido utilizando las siguientes indicaciones: CDR-L1: Inicio: aproximadamente 24 residuos, antes del residuo: siempre un Cys, después del residuo: siempre un Trp (típicamente Trp-Tyr-Gln, pero también, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu), longitud: 10 a 17 residuos; CDR-L2: Inicio: siempre 16 residuos después del extremo de L1, Antes de los residuos: generalmente Ile-Tyr (pero también, Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe), Longitud: siempre 7 residuos; CDR-L3, Inicio: siempre 33 residuos después del extremo de L2, Antes del residuo: siempre Cys, Después de los residuos: siempre Phe-Gly-Xaa-Gly, Longitud: 7 a 11 residuos; CDR-H1, Inicio: aproximadamente 26 residuos (siempre 4 después de un Cys) (definición de Chothia / AbM, la definición de Kabat comienza 5 residuos después), Antes de los residuos: siempre Cys-Xaa-Xaa-Xaa, Después de los residuos: siempre un Trp (típicamente Trp-Val, pero también, Trp-Ile, Trp-Ala), Longitud: 10 a 12 residuos (definición de AbM, definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos); CDR-H2, Inicio: siempre 15 residuos después del extremo de la definición de Kabat / AbM de CDR-H1, Antes de los residuos: típicamente Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (pero un número de variaciones, después de los residuos Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala), Longitud: definición de Kabat 16 a 19 residuos; definición de AbM (y Chothia) termina 7 residuos antes; CDR-H3, Inicio: siempre 33 residuos después del extremo CDR-H2 (siempre 2 después de un Cys), Antes de los residuos: siempre Cys-Xaa-Xaa (típicamente Cys-Ala-Arg), Después de los residuos: siempre Trp-Gly-Xaa-Gly, Longitud: 3 a 25 residuos.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgG1 humano o ratón. En otra modalidad, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgG4 humano. En una modalidad, los anticuerpos de la invención son fragmentos de anticuerpos que retienen sus propiedades de ligación y/o funcionales.

Tabla 1							
mAb	Definición de la CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
11E1	Kabat	5	NYWMN	8	MIDPSDSETHYNQ MFKD	10	GASSDYFFDY
	Chotia	6	GYTFTN	9	MIDPSDSETH		GASSDYFFDY
	Abm	7	GYTFTNY WMN		MIDPSDSETH		GASSDYFFDY
31F6	Kabat	16	YTYMH	19	RIDPANGDSIYGED FKT	21	GEFDYFDY
	Chotia	17	GYNIRY	20	RIDPANGDSI		GEFDYFDY
	Abm	18	GYNIRYT YMH		RIDPANGDSI		GEFDYFDY
32C4	Kabat	27	STYIY	30	RIDPANGNTIYAEK FKT	32	GDHGGYVMD A
	Chotia	28	GYNIWS	31	RIDPANGNTI		GDHGGYVMD A
	Abm	29	GYNIWST YIY		RIDPANGNTI		GDHGGYVMD A
37B7	Kabat	38	SNYMH	41	WIFPGDGDNTYNQ KFNG	43	SDGDWYFDF
	Chotia	39	GYTFTS	42	WIFPGDGDNTN		SDGDWYFDF
	Abm	40	GYTFTSN YMH		WIFPGDGDNTN		SDGDWYFDF
7G11	Kabat	49	YTYMH	52	RIDPANGNTIYGEK FKN	54	GEFDYFDH

	Chotia	50	GYNITY	53	RIDPANGNTI		GEFDYFDH
	Abm	51	GYNITYTY MH		RIDPANGNTI		GEFDYFDH

Tabla 2							
mAb	Defi- nición de la CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
11E1	Abm Chotia Kabat	11	ITSTDIHDDIN	12	EGNTLRP	13	LQSDNLPRT
31F6	Abm Chotia Kabat	22	LASEGISNDL A	23	AASRLQD	24	QQNYKYPLT
32C4	Abm Chotia Kabat	33	LASEDIYSYL A	34	AANRLED	35	LQGSEFPYT
37B7	Abm Chotia Kabat	44	QASEDIYSGL A	45	AASRLQD	46	QQGVKYPNT
7G11	Abm Chotia Kabat	55	LASEDISNDL A	56	AASRLED	57	QQSYKYPVT

Tabla 3		
Porción de anticuerpo	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos de región variable
11E1 VH	3	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWMNWVK QRPQGGLIEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDKATLTVDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGASSDYYYFDYWGGGTT LTVSSASTK
11E1 VL	4	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIHDDINWYQQKPG EPPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDVFVTIENMLSED VADYYCLQSDNLPRTFGGGTKLEIKRT
31F6 VH	14	EVQLQQSGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIRYTYMHWVNQ RPGKGLEWIGRIDPANGDSIYGEDFKTKATLTADTSSNTA YMQLSQLKSDDTAIYFCAMGEFDYFDYWGGQGMVTVSSA STK
31F6 VL	15	DIQMTQSPPSLSASLGETVSIETCLASEGISNDLAWYQQRS

		GKSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQP EDEADYFCQQNYKYPLTFGSGTKLEIK
32C4 VH	25	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIWSTYIYWVNQ RPGKGLEWIGRIDPANGNTIYAEKFKTKATLTADTSSNTAY MQLSQLKSDDTAIYFCAMGDHGGYVMDAWGQGASVTVSS
32C4 VL	26	DIQMTQSPGSLASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKP GKSPQLLIYAANRLEDGVPSRFSGSGSGGTQYSLKISGMQP EDEGDYFCLQGSEFPYTFGTGKLELK
37B7 VH	36	QVQLQQSGTELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNYMHWIRQL PNGLEWIGWIFPGDGTNYNQKFNGKATLTADKSSSTA YMQLSLTSSEYAVYFCARSDGDWYFDWGPGMTVTVSS
37B7 VL	37	DIQMTQSPGSLASLGETVTIQCQASEDIYSGLAWYQQKP RKSPQLLISAASRLQDGVPSRFSGSGSGGTQYSLKISSMQT EDEGVYFCQQGVKYPNTFGPGTKLELK
7G11 VH	47	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNITYTYMHWVNQ RPGKGLEWIGRIDPANGNTIYGEKFKNKATLTADTSSNTA YMQLSQLKSDDTAIYFCAMGEFDYFDHWGQGVMTVTVSS
7G11 VL	48	DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDISNDLAWYQQKS GKSPQVLIYAASRLLEDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQP EDEADYFCQQSYKYPVTFGSGTKLEIK

Fragmentos y Derivados de los presentes Anticuerpos Monoclonales

- Los fragmentos y derivados de los anticuerpos de esta invención (que son abarcados por el término “anticuerpo” o “anticuerpos” como se utiliza en esta solicitud, a menos que se establezca de otra manera o se contradiga claramente por el contexto), de manera preferente un anticuerpo similar a 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, se pueden producir por técnicas que son bien conocidas en el campo. “Fragmentos” comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de ligación a antígeno o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab') 2, y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia no interrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (referido en la presente como un “fragmento de anticuerpo de cadena individual” o “polipéptido de cadena individual”), incluyendo sin limitación (1) moléculas Fv de cadena individual, (2) polipéptidos de cadena individual que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDRs del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos de cadena individual que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDRs de la región variable de cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Se incluyen, *inter alia*, un nanocuerpo, anticuerpo de dominio, anticuerpo de dominio individual o un “dAb”.
- Los fragmentos de los presentes anticuerpos se pueden obtener utilizando métodos estándares. Por ejemplo, los fragmentos Fab o F (ab') 2 se pueden producir por la digestión de proteasa de los anticuerpos aislados, de acuerdo con las técnicas convencionales. Se apreciará que los fragmentos inmunoreactivos se pueden modificar utilizando métodos conocidos, por ejemplo, para eliminación lenta in vivo y obtener un perfil farmacocinético más deseable el fragmento se puede modificar con polietilenglicol (PEG). Los métodos para acoplar y conjugar específicamente en el sitio el PEG a un fragmento Fab' se describen en, por ejemplo, Leong y colaboradores, 16 (3): 106-119 (2001) y Delgado y colaboradores, Br. J. Cancer 73 (2): 175-182 (1996), las divulgaciones de las cuales se incorporan en la presente a manera de referencia.
- Alternativamente, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención, de manera preferente un anticuerpo similar a 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, se puede modificar para codificar un fragmento de la invención. El ADN modificado luego se inserta en un vector de expresión y se utiliza para transformar o transfectar una célula apropiada, que luego expresa el fragmento deseado.
- En ciertas modalidades, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo de esta invención, de manera preferente un anticuerpo similar a 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7 se puede modificar antes de la inserción en un

vector de expresión, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias no humanas homólogas (por ejemplo, Morrison y colaboradores, PNAS pp. 6851 (1984)), o al unir covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de ligación del anticuerpo original. Típicamente, tales polipéptidos no de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención.

De esta manera, de acuerdo con otra modalidad, el anticuerpo de esta invención, de manera preferente un anticuerpo similar a 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, se humaniza. Las formas “humanizadas” de los anticuerpos de acuerdo con esta invención son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F (ab')₂, u otras subsecuencias de ligación antígenos de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina de murino o rata. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo recipiente) en el cual los residuos de una región de determinación complementaria (CDR) de recipiente se reemplazan por los residuos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donador) mientras que mantiene la especificidad deseada, afinidad, y capacidad del anticuerpo original.

En algunos casos, los residuos de la estructura Fv de la inmunoglobulina humana se pueden reemplazar por residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en ya sea el anticuerpo recipiente o en las secuencias CDR o de estructura importadas. Estas modificaciones se hacen para definir adicionalmente y optimizar el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los cuales todo o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas del anticuerpo original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales ver Jones y colaboradores, *Nature*, 321, pp. 522 (1986); Reichmann y colaboradores, *Nature*, 332, pp. 323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2, pp. 593 (1992); Verhoeyen et *Science*, 239, pp. 1534; y la Patente de E.U.A. No. 4,816,567, las divulgaciones completas de las cuales se incorporan en la presente a manera de referencia). Los métodos para humanizar los anticuerpos de esta invención son bien conocidos en el campo.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizan en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el así llamado método “mejor adaptado”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de esta invención se clasifica contra la biblioteca completa de las secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a aquella de ratón luego se acepta como la estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y colaboradores, *J. Immunol.* 151, pp. 2296 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, pp. 901). Otro método utiliza una estructura particular de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y colaboradores, PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta y colaboradores, *J. Immunol.*, 151, p. 2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para los receptores TLR3 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parenterales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parenterales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales son comúnmente disponibles y están familiarizados con aquellas personas expertas en el campo. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidato al ligarse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar de las secuencias consenso y de importación de modo que la característica del anticuerpo deseado, tal como afinidad incrementada para el antígeno(s) objetivo, se logra. En general, los residuos CDR se implican directamente y más sustancialmente en influir la ligación del antígeno.

Otro método para preparar anticuerpos monoclonales “humanos” es utilizar un XenoMouse (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón utilizado para la inmunización. Un XenoMouse es un hospedero de murino de acuerdo con esta invención que ha tenido sus genes de inmunoglobulina reemplazados por los genes de inmunoglobulina humanos funcionales. De esta manera, los anticuerpos producidos por este ratón o en los hibridomas preparados de las células B de este ratón, son humanos (o ya humanizados). El XenoMouse se describe en la Patente de E.U.A. No. 6,162,963, que se incorpora en la presente en su totalidad a manera de referencia.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir de acuerdo con varias otras técnicas, tal como al utilizar, para inmunización, otros animales transgénicos que se han diseñado para expresar un repertorio de anticuerpos humanos (Jakobovitz et *Nature* 362 (1993) 255), o por la selección de repertorios de anticuerpos que utilizan

métodos de expresión en fago. Tales técnicas son conocidas por la persona experta y se pueden implementar comenzando desde los anticuerpos monoclonales como se describen en la presente solicitud.

Los anticuerpos de la presente invención, de manera preferente un anticuerpo similar a 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 o 37B7, también pueden estar derivatizados a anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en la cual una porción de la cadena(s) pesada/ligera es idéntica con u homologa a las secuencias correspondientes en el anticuerpo original, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica con u homologa a las secuencias correspondientes a los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada y la especificidad de ligación (Cabilly y colaboradores, supra; Morrison y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., pp. 6851 (1984)).

Regímenes de dosificación

Basado en los datos de eficacia recolectados durante los experimentos in vivo utilizando anticuerpos anti-TLR3, los inventores han establecido que una dosis tan baja como 100µg/ratón produce un efecto terapéutico. Tales dosificaciones son equivalentes a 4 mg/kg en el ratón y por lo tanto 0.5 mg/kg en un sujeto humano. Por lo tanto, en los métodos de la invención, el anticuerpo anti-TLR3 se puede administrar en una dosificación comprendida entre 0.05 y 20 mg/kg en un humano, de manera preferente 0.1 y 10 mg/kg, además de manera preferente entre 0.5 y 5 mg/kg (por ejemplo, una dosis unitaria de entre aproximadamente 25 mg y 500 mg).

Un régimen de tratamiento ejemplar incluye la administración dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 2 a 3 meses, o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación ejemplares para un anticuerpo anti-TLR3 incluye entre 0.05 y 20 mg/kg (de manera preferente 0.1 y 10 mg/kg, además de manera preferente entre 0.5 y 5 mg/kg) de peso corporal a través de la administración intravenosa o inyección subcutánea, con el anticuerpo que se administra utilizando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) dosis de carga de aproximadamente cada 1, 2, 3 de 4 semanas (por ejemplo, para 2-4 dosificaciones), luego cada uno a tres meses; (ii) una vez al mes o una vez por período de dos meses; (iii) cada una a dos semanas, o cualquier otra dosificación óptima.

El anticuerpo anti-TLR3 se administra opcionalmente en una dosis que es adecuada para inducir sustancialmente la saturación del receptor TLR3 completa (90%, opcionalmente 95% de saturación del receptor), por ejemplo, saturación del polipéptido TLR3 expresado en las células objetivo. Ya que el receptor TLR3 se cree que dimeriza antes de la señalización, una inhibición menor que la saturación completa en al menos 20%, 30%, 40%, 50% de saturación del receptor puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad. En una modalidad, una dosis de anticuerpo anti-TLR3 que da por resultado por lo menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 90% o 95% de saturación del receptor se administra de aproximadamente 2 veces a la semana a aproximadamente una vez al mes, o de aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada 2 meses. La dosis puede ser *por ejemplo*, administrada en por lo menos 3 veces, por lo menos 6 veces, o más. Por ejemplo, el método puede comprender administrar un anticuerpo anti-TLR3 en una dosis y una frecuencia de dosificación logrando por lo menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 90% o 95% de saturación del receptor TLR3 en las células objetivo durante por lo menos aproximadamente dos semanas, un mes, 6 meses, 9 meses o 12 meses. En una modalidad preferida, un régimen da por resultado una saturación del receptor sustancialmente completa sostenida. Una dosis de anticuerpo anti-TLR3 que da por resultado la saturación del receptor sustancialmente completa durante un período de por lo menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas o 1 mes es administrada.

La ocupación del receptor se puede evaluar en las muestras humanas donde las células objetivo están presentes (por ejemplo, sangre entera, cualquier tejido que sea el sitio de una inflamación, fluido sinovial). El porcentaje de saturación del receptor TLR3 se puede medir por el análisis FACS utilizando métodos conocido en el campo, a través de tinción intracelular puesto que el receptor TLR3 está presente en las células. Alternativamente, el porcentaje de saturación se puede determinar utilizando una prueba de perfil de secreción de inhibición de citoquinas en respuesta a un ligando TLR3 tal como ARNDs (es decir poliAU) en las células mononucleares (PBMCs preferibles) obtenidas de un paciente. Una inhibición de citoquinas eficientes se correlaciona con un efecto terapéutico eficiente y la dosificación luego se puede adaptar para cada paciente. Las citoquinas que se pueden medir en este ensayo son por ejemplo, IP-10 o IL-6. En otra modalidad, la saturación del receptor se evalúa como la ocupación del receptor, por ejemplo, al conducir ensayos de sitio libre y de sitio ligado. Resumiendo, los niveles del receptor TLR3 libres y ligados se evalúan en las células objetivo de una muestra biológica obtenida de un individuo tratado con el anticuerpo anti-TLR3, donde un ensayo de sitio libre evalúa el TLR3 no ligado por la tinción con la forma conjugada con PE del anticuerpo anti-TLR3 administrado a un individuo. Un ensayo de sitio ligado evalúa los polipéptidos TLR3 ocupados por el anticuerpo anti-TLR3 por la tinción con un anticuerpo monoclonal IgG4 anti-humano de ratón conjugado con PE (cuando el anticuerpo anti-TLR3 es de isotipo IgG4 humano) que reconoce el anticuerpo anti-TLR3 ligado a los polipéptidos TLR3. En una modalidad, la invención proporciona además un método para tratar un individuo que comprende: (a) administrar un anticuerpo anti-TLR3 a un individuo y (b) determinar la saturación del receptor TLR3 en el individuo, opcionalmente determinar adicionalmente una dosificación del anticuerpo anti-TLR3 que se administra al individuo.

Formas de dosificación

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas utilizados de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mediante el mezclado del antagonista que tiene el grado deseado de pureza con los portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Para información general con respecto a las formulaciones, ver, por ejemplo, Gilman y colaboradores (eds.), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8ª Ed. (Pergamon Press, 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edition (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990); Avis y colaboradores (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* (Dekker, Nueva York, 1993); Lieberman y colaboradores (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (Dekker, Nueva York, 1990); Lieberman y colaboradores (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* (Dekker, Nueva York, 1990); y Walters (ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, Vol 119 (Dekker, Nueva York, 2002).

Los portadores, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos a los recipientes en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservadores (tal como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menores que aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero; gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como ácido etilenediaminetetraacético (EDTA); azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa, o sorbitol; contra-iones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteínas); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN^{MR}, PLURONICS^{MR}, o PEG.

Las formulaciones de anticuerpos ejemplares se describen, por ejemplo, en WO 1998/56418, que describe una formulación de múltiples dosis líquida para un anticuerpo anti-CD20, que comprende 40 mg/mL de rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, 0.9% de alcohol bencilico y 0.02% de polysorbate20^{MR} en pH 5.0 que tiene una vida de anaquel mínima de dos años de almacenamiento a 2-8°C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/mL de rituximab en 9.0 mg/mL de cloruro de sodio, 7.35 mg/mL de dihidrato de citrato de sodio, 0.7 mg/mL de polysorbate80^{MR}, y Agua Estéril para Inyección, pH 6.5.

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen, por ejemplo, en la Patente de E.U.A. No. 6,267,958 (Andya y colaboradores). Tales formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado a una concentración de proteína alta y la formulación reconstituida se puede administrar subcutáneamente al mamífero que se trata en la presente.

Las formas cristalizadas del antagonista también se contemplan. Ver, por ejemplo, US 2002/0136719A1 (Shenoy y colaboradores).

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo (un segundo medicamento como es indicado en lo anterior), de manera preferente a aquellos con actividades complementarias que no afectan adversamente entre sí. El tipo y las cantidades efectivas de tales medicamentos dependen, por ejemplo, de la cantidad y tipo de antagonista de células B presente en la formulación, y los parámetros clínicos de los sujetos. Los segundos de tales medicamentos preferidos se indican en lo anterior.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o 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. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, supra, por ejemplo.

Se pueden preparar formulaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, las matrices que están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas y microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilacturos (Patente de E.U.A. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como Lupron Depot^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuporelina), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se utilizan para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de las membranas de filtración estériles. Los portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato

de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales albúmina de suero humano, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezcla de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato de hidrógeno de disodio, fosfato de hidrógeno de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los anticuerpos de esta invención se pueden emplear en un método para modular, por ejemplo, inhibir la actividad de las células que expresan TLR3 en un paciente. Este método comprende la etapa de poner en contacto un paciente con dicha composición (por ejemplo, administrar dicha composición al paciente). Tal método será útil para tanto profilaxis como propósitos terapéuticos.

Las formulaciones se pueden adaptar a las vías nasales o de inhalación. Una formulación puede comprender un portador nasal farmacéuticamente aceptable. Para la administración nasal, cualquiera de los métodos de suministro bien conocidos tales como gotas, un rocío nasal, un líquido nasal o un aerosol en polvo, una cápsula o un inserto nasal se puede utilizar. Para administración de aerosol, cualquiera de los métodos de suministro bien conocidos tales como nebulizadores, inhaladores, atomizadores, formadores de aerosoles, productor de neblina, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medida, rociador de dosis medida, productor de neblina de dosis medida, atomizador de dosis medida u otro dispositivo de administración adecuados se puede utilizar.

Los aspectos y ventajas adicionales de esta invención se divulgarán en las siguientes secciones experimentales, que se debe considerar como ilustrativa y no limitante del alcance de esta solicitud.

Tratamiento de la enfermedad

La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, que comprende administrar al individuo un anticuerpo anti-TLR3 de la invención. El anticuerpo puede estar comprendido en una composición que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones también son referidas como "composiciones de anticuerpos" de la invención. En una modalidad, las composiciones de anticuerpo de esta invención comprenden un anticuerpo divulgado en las modalidades de anticuerpos en lo anterior.

La invención proporciona además un método para modular la actividad de células que expresan TLR3 en un paciente en necesidad del mismo, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una composición de acuerdo con la invención. El método se dirige más específicamente a disminuir la actividad de células TLR3 en pacientes que tienen una enfermedad en la cual la actividad de células TLR3 disminuida es benéfica (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedad infecciosa, infección viral), o que es provocada o caracterizada por la actividad de células TLR3 excesiva. En una modalidad, la actividad de células que expresan TLR3 se inhibe, en donde el paciente tiene una enfermedad o trastorno en donde tal inhibición puede promover, mejorar, y/o reducir un efecto terapéutico (o promueve, mejora, y/o reduce tal efecto en por lo menos una proporción sustancial de pacientes con la enfermedad o trastorno y las características sustancialmente similares en cuanto al paciente, como se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos clínicos).

Las enfermedades y afecciones en las cuales los presentes métodos se pueden utilizar incluyen todas las enfermedades donde la modulación de TLR3 puede ser benéfica, incluyendo por ejemplo, enfermedades mediadas o exacerbadas total o parcialmente por la señalización TLR3 o por citoquinas producidas tras dicha señalización TLR3. En particular, cuando se utilizan los anticuerpos que inhiben la señalización TLR3, tales trastornos incluyen cualquiera de los trastornos mediados o exacerbados parcial o totalmente por la señalización TLR3 o por las citoquinas producidas tras dicha señalización TLR3, incluyendo, *inter alia* trastornos inmunitarios tales como enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Más específicamente, los métodos de la presente invención se utilizan para el tratamiento de una variedad de trastornos inmunitarios y otras enfermedades incluyendo, pero no limitado a autoinmunidad, inflamación, alergia, asma, infecciones (por ejemplo, infección crónica, infección viral) y sepsis. Ejemplos de enfermedades que se pueden tratar con los anticuerpos que inhiben la señalización TLR3 incluyen, pero no se limitan a artritis, lupus eritematoso sistémico, sepsis, asma, osteoporosis, autoinmunidad a antígenos del sistema nervioso central, diabetes autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, carditis autoinmune y hepatitis autoinmune.

En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-TLR3 de la invención que inhibe la señalización por un polipéptido TLR3 se utiliza para el tratamiento o prevención de enfermedad de injerto versus hospedero (GvHD), por ejemplo, en trasplantes o transfusiones. Particularmente, después del trasplante de médula ósea, las células T se presentan en el injerto, ya sea como contaminantes o introducidos intencionalmente en el hospedero, atacan los tejidos del recipiente del trasplante después de percibir tejidos hospederos como antigénicamente extraños. Las células T producen un exceso de citoquinas, incluyendo TNF- α e interferón-gama (IFN γ). Los anticuerpos anti-TLR3 se pueden administrar antes, durante o después de un trasplante o transfusión, por ejemplo, trasplante de médula ósea alogénica, particularmente en el tratamiento de cáncer, por ejemplo, leucemias. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-TLR3 que inhibe la señalización de un polipéptido TLR3. Puesto que el GvHD se cree que se conduce en gran medida por las células que presentan antígenos, anticuerpos anti-TLR3 que inhiben la señalización TLR3 en la DC se creen que son particularmente útiles.

Otros trastornos inmunitarios tratables utilizando los anticuerpos que inhiben la señalización TLR3 de acuerdo con la invención incluyen, *inter alia*, trastornos autoinmunitarios y trastornos inflamatorios, incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de Crohn, enfermedad Celiaca, colitis ulcerativa, síndrome del intestino irritable, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), enfermedad de Addison, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS), anemia aplásica, hepatitis autoinmune, Diabetes mellitus, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), enfermedad de Hashimoto, lupus eritematoso, afecciones desmielinizantes, esclerosis Múltiple, Myasthenia gravis, síndrome de opsoclonus mioclonus (OMS), neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, cirrosis, psoriasis, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, anemia hemolítica autoinmune caliente, granulomatosis de Wegener, apendicitis, arteritis, artritis, blefaritis, bronquiolitis, bronquitis, bursitis, cervicitis, colangitis, colecistitis, corioamnionitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dacrioadenitis, dermatitis, dermatomiositis, encefalitis, endocarditis, endometritis, enteritis, enterocolitis, epicondilitis, epididimitis, fascitis, fibrositis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, hepatitis, hidradenitis supurante, ileitis, iritis, laringitis, mastitis, meningitis, mielitis, miocarditis, miositis, nefritis, omfalitis, omforitis, orquitis, osteitis, otitis, pancreatitis, parotitis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, flebitis, pneumonitis, proctitis, prostatitis, poliolonefritis, rinitis, salpingitis, sinusitis, estomatitis, sinovitis, tendónitis, tonsilitis, uveítis, vaginitis, vasculitis, y vulvitis.

Un aspecto de la invención es proporcionar una composición que sea capaz de tratar una SIRS, una sepsis, una sepsis grave o un choque séptico. Otro aspecto de la invención es proporcionar un método para el tratamiento profiláctico de pacientes quienes están en riesgo de desarrollar una sepsis. Por ejemplo, los pacientes que se les ha removido su bazo quirúrgicamente, los pacientes con un sistema inmune deteriorado (es decir, tratamiento de quimioterapia, inmunodepresión) pero también otras causas tales como medicación de esteroides a largo plazo, diabetes, SIDA, o cirrosis, quemaduras grandes o lesiones graves, infecciones tales como neumonía, meningitis, peritonitis, apendicitis, celulitis, infección del tracto urinario o infecciones que se presentan después de un acto quirúrgico mayor.

En una modalidad, el individuo tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria que se ha declarado por un período de tiempo prolongado (por ejemplo, más de un año), tiene signos de inflamación en curso o activa, tiene signos físicos de enfermedad (por ejemplo, hinchamiento de articulaciones, lesiones, síntomas neurológicos, etc.), tiene enfermedad crónica, tiene enfermedad grave (como es evaluada por criterios aplicables, por ejemplo, criterios de DAS o ACR en artritis reumatoide) o tiene enfermedad en progresión.

En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria establecida, que comprende administrar al individuo un anticuerpo anti-TLR3. En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de fases agudas, o de un ataque, crisis, exacerbación o recrudecimiento, de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias que utilizan un anticuerpo TLR3 (o composiciones relacionadas), en donde de manera preferente el anticuerpo se administra a un individuo durante una fase aguda o durante un ataque, crisis, exacerbación o recrudecimiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. En una modalidad, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis idiopática Juvenil, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o rectocolitis, Lupus eritematoso, hepatitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) o asma, espondilitis anquilosante y enfermedades relacionadas. En una modalidad, la enfermedad se caracteriza por la presencia de un ligando TLR3 (por ejemplo, ARNds extracelular). En una modalidad, la enfermedad se caracteriza por la presencia de niveles detectables de una enzima proteolítica, un mediador inflamatorio, un marcador de inflamación en curso o una citoquina pro-inflamatoria (por ejemplo, TNF- α y/o interleucina-1 (IL-1)). De manera preferente el anticuerpo inhibe la señalización por el polipéptido TLR3, opcionalmente además en condiciones ácidas y con alta afinidad de ligación, opcionalmente en una célula dendrítica humana.

El tratamiento implica generalmente la administración de una cantidad efectiva de una composición que comprende un anticuerpo anti-TLR3 con el propósito de prevenir cualquiera de los síntomas o estado de enfermedad que se desarrolla o empeora, o con el propósito de prevenir (por ejemplo, prevenir o posponer la progresión), facilitar, mejorar, o erradicar (curar) tales síntomas o estados de enfermedad ya desarrollados. La diagnosis de la enfermedad, evolución y clasificación (o estadificación) se puede definir por criterios médicos estándares para el tipo particular de la enfermedad a fin de determinar si un individuo tiene la enfermedad que se establece, está en una fase aguda, está progresando, es crónica, tiene síntomas físicos, o es de un cierto nivel de gravedad. Del mismo modo, ataque, crisis, exacerbación o recrudecimientos se pueden identificar por cualquiera de los criterios médicos adecuados.

En una modalidad, la invención comprenderá una etapa para conducir una etapa de evaluación o de prueba para evaluar la presencia, etapa, evolución o clasificación de la enfermedad. De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente, que comprende: (a) conducir una evaluación de la enfermedad en el paciente; y (b) si dicho paciente tiene una enfermedad adecuada para el tratamiento con un anticuerpo anti-TLR3 de la invención, administrar a dicho paciente una dosis efectiva del anticuerpo anti-TLR3. Opcionalmente tal etapa de evaluación puede implicar obtener una muestra biológica de un paciente sospechoso de tener una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Los métodos para evaluar la enfermedad (por ejemplo, diagnosis, estadificación, etc.) se puede lograr mediante cualquier técnica adecuada conocida en el campo, por ejemplo, al llevar a cabo una prueba basada en laboratorio. Ejemplos de

técnicas adecuadas incluyen conducir un ensayo basado en PCR o RT-PCR (por ejemplo, para detectar los ácidos nucleicos o genes asociados a la enfermedad, frecuentemente referidos como “marcadores” o “biomarcadores”), biopsia, endoscopia, estudios de heces, cualquiera de las pruebas de laboratorio no invasivas (por ejemplo, anemia e infección, pruebas de función de hígado para clasificar el hígado y los problemas del conducto biliar, pruebas para infecciones bacterianas, virales y parasíticas), ultrasonido, CT, MRE, MRI y otras técnicas de formación de imágenes, análisis cromosómicos, técnicas de detección de inmunoensayo/inmunocitoquímicas (por ejemplo, presencia de autoanticuerpos), ensayos histológicos y/o histopatológicos, electroforesis de proteínas en suero, citometría de flujo (por ejemplo, detección de células inmunes, células T, etc.) análisis de gas de sangre arterial (ABG) (en asma o COPD), y técnicas de examinación física (por ejemplo, para síntomas físicos, números de articulaciones con sinovitis, etc.). En una modalidad, los métodos comprenden detectar la presencia de autoanticuerpos, por ejemplo, detectar el factor reumatoide (RhF), anticuerpos de péptidos citrulinados anti-cíclicos, anti-ARNss, anti-ARNds, anti-Smith, anti-fosfolípido, anticuerpos anti-nucleares y/o anti-actina. En una modalidad, los métodos comprenden evaluar los niveles de una enzima proteolítica, un mediador inflamatorio, un marcador de inflamación en curso o una citoquina pro-inflamatoria. En una modalidad, los métodos comprenden determinar el nivel de proteína c-reactiva (CRP) y/o velocidades de sedimentación de eritrocitos. Una determinación que un individuo tiene resultados anormales (indicativo de la enfermedad, exacerbación, inflamación en curso, etc.), por ejemplo, niveles anormales de ABG, autoanticuerpos, CRP, cualquier enzima proteolítica, mediador inflamatorio o marcador de inflamación en curso indica que el individuo es adecuado para el tratamiento con un anticuerpo anti-TLR3.

La administración de los anticuerpos anti-TLR3 a un sujeto (ya sea por administración directa o expresión de un ácido nucleico en la misma, tal como de un vector de transferencia de gen viral pox que comprende la secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-TLR3)) y practicar los otros métodos de la invención se pueden utilizar para reducir, tratar, prevenir, o de otra manera mejorar cualquier aspecto adecuado de enfermedad o progresión de la enfermedad. Los métodos de la invención pueden ser particularmente útiles en la reducción y/o mejora de la inflamación y/o daño el tejido, y cualquier parámetro o síntoma asociado con el mismo (por ejemplo, la presencia de un marcador de inflamación, número de células pro-inflamatorias en la circulación o en un tejido particular).

Los anticuerpos anti-TLR3 se pueden utilizar ventajosamente para tratar la enfermedad establecida. “Enfermedad establecida” se refiere a una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria que se ha declarado durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, por más de un año. Dependiendo de la enfermedad específica, la enfermedad establecida también significa una enfermedad que no se controla, por ejemplo, que está aún progresando o por la cual el paciente no experimenta remisión, en presencia o en ausencia de un tratamiento. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente, que comprende: (a) determinar si dicho paciente tiene una enfermedad establecida; y (b) si dicho paciente tiene enfermedades establecidas, administrar a dicho paciente una dosis efectiva del anticuerpo anti-TLR3.

Los anticuerpos anti-TLR3 también se pueden utilizar ventajosamente para tratar una enfermedad crónica. “Enfermedad crónica” se refiere a una enfermedad que persiste durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, una enfermedad crónica puede ser una enfermedad que dura 3 meses o más, como se define por U.S. National Center for Health Statistics. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente que comprende: (a) determinar si dicho paciente tiene una enfermedad crónica; y (b) si dicho paciente tiene enfermedades crónicas, administrar a dicho paciente una dosis efectiva del anticuerpo anti-TLR3.

Los anticuerpos anti-TLR3 también se pueden utilizar ventajosamente para tratar individuos que tienen un ataque, crisis, exacerbación o recrudecimiento. Los términos “ataque”, “crisis”, “exacerbación” y “recrudecimiento”, designan una evolución más rápida en nuevos síntomas o empeoramiento de síntomas antiguos relacionados con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria. Tales fases duran más de un período de horas o días, como es opuesto a una progresión lenta de la enfermedad que se presenta durante meses y años. Durante tales ataques, el paciente experimenta fiebre, dolor, síndrome inflamatorio (síndrome similar a gripe). En RA, las articulaciones del paciente se hinchan y son dolorosas. El paciente puede experimentar síndromes similares a gripe. Una crisis puede durar de algunas horas a muchas semanas. En esclerosis múltiple, los recrudecimientos pueden caracterizar un nuevo síntoma o el empeoramiento de un síntoma existente, pero debe durar por lo menos 24 horas para ser considerado una exacerbación real, un recrudecimiento indica nuevas lesiones que se forman en el cerebro o medula espinal que alteran la transmisión neural. La mayoría de recrudecimientos duran algunos días o semanas, pero pueden durar durante varios meses. Los efectos, por ejemplo, pueden ser: dificultades de movimiento o espasmos, desequilibrio y problemas de coordinación; problemas de visión, movimiento de los ojos no coordinados, visión borrosa o visión doble, ceguera parcial durante un recrudecimiento; síntomas de la vejiga e intestinos; problemas sexuales, cambios en la función mental: pérdida de memoria, poca atención o juicio deficiente o depresión. En COPD, una exacerbación se puede definir como “un evento en el curso natural de la enfermedad caracterizado por un cambio en la disnea de línea base del paciente, tos, y/o esputo que está más allá de las variaciones diarias normales, es agudo en el inicio y puede justificar un cambio en la medicación en un paciente con COPD subyacente”. El paciente que experimenta una exacerbación tiene uno de los siguientes síntomas: tos y producción de esputo incrementada, cambio en el color y/o espesor del esputo, jadeo, opresión en el pecho, fiebre. La enfermedad de Crohn o

rectocolitis, un recrudecimiento es principalmente la exacerbación de síntomas de la enfermedad de Crohn usuales: diarrea, dolor abdominal con calambres, pérdida de apetito. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente que comprende: (a) determinar si dicho paciente está experimentando un ataque, crisis, exacerbación o recrudecimiento; (b) si dicho paciente experimenta un ataque, crisis, exacerbación o recrudecimiento, administrar a dicho paciente una dosis efectiva de anticuerpo anti-TLR3.

Los anticuerpos anti-TLR3 también se pueden utilizar ventajosamente para tratar individuos que tienen una recaída. El término "recaída" se refiere a la mejora o estabilización en los síntomas de un paciente. Una enfermedad es recidivante cuando la salud o afección del paciente mejora. En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un paciente que comprende: (a) determinar si dicho paciente está experimentando una recaída, crisis, exacerbación o recrudecimiento; (b) si dicho paciente experimenta una recaída, administrar a dicho paciente una dosis efectiva de anticuerpo anti-TLR3.

Opcionalmente, una etapa de evaluación se puede llevar a cabo, que comprende evaluar la expresión de un polipéptido TLR3 en las células (por ejemplo, células pro-inflamatorias, células dendríticas, células T, etc.) de un paciente antes del tratamiento con un anticuerpo anti-TLR3. Generalmente, en esta etapa, una muestra de células se toma de un paciente, típicamente como una biopsia, y se somete a prueba, por ejemplo, utilizando inmunoensayos para determinar la expresión y prominencia opcionalmente relativa del polipéptido TLR3 en las células. En un aspecto, una determinación de que un paciente tiene células que expresan prominentemente el polipéptido TLR3 indica que el anticuerpo anti-TLR3 (y opcionalmente cualquier agente terapéutico adicional) es adecuado para dicho paciente. En una etapa adicional, el paciente luego se puede tratar con el anticuerpo anti-TLR3.

Opcionalmente, en una modalidad, una etapa de detección de ligando TLR3 se puede llevar a cabo, que comprende detectar la presencia de un ligando TLR3 en un paciente, antes del tratamiento con un anticuerpo anti-TLR3. Generalmente, en esta etapa, la muestra biológica se toma de un paciente, por ejemplo, una muestra de fluido sinovial, por ejemplo, en un paciente que tiene artritis reumatoide. La muestra biológica se evalúa para la presencia de un ligando TLR3, tal como la presencia de ARNds extracelular. Si la muestra biológica es positiva para la presencia de un ligando TLR3, el paciente luego se puede tratar ventajosamente con el anticuerpo anti-TLR3, de manera preferente con un anticuerpo que inhibe la señalización TLR3 en una célula que expresa TLR3 en presencia de un ligando ARNds TLR3.

El anticuerpo anti-TLR3 administrado a un individuo que tiene una enfermedad puede ser cualquier anticuerpo monoclonal, que liga específicamente un polipéptido TLR3, de manera preferente cualquier anticuerpo inhibe la señalización por el polipéptido TLR3, como se describe en la presente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TLR3 es un anticuerpo que liga específicamente TLR3, en donde el anticuerpo tiene una K_D para ligarse a un polipéptido TLR3 humano de menor que $10^{-9}M$ bajo condiciones ácidas, y opcionalmente además también una K_D de menor que $10^{-9}M$ bajo condiciones neutras.

En una modalidad, el anticuerpo anti-TLR3 se utiliza como monoterapia (el único agente terapéutico).

De acuerdo con otra modalidad, los métodos del tratamiento de esta invención pueden comprender además el tratamiento de un individuo con un anticuerpo anti-TLR3 y un segundo agente terapéutico, incluyendo agentes normalmente utilizados para el propósito terapéutico particular por el cual el anticuerpo está siendo administrado. El anticuerpo anti-TLR3 y el segundo agente terapéutico se pueden administrar separadamente, juntos o secuencialmente, o en un coctel. El segundo agente terapéutico normalmente se administrará en cantidades típicamente utilizadas para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular que se trata. En una modalidad, el segundo agente terapéutico se administra en una dosis menor que la dosis eficaz generalmente aceptada; por ejemplo, en varias modalidades, la composición comprende una dosificación que es menor que aproximadamente 10% a 75% de la dosis eficaz generalmente aceptada que se administra. En una modalidad, el segundo agente terapéutico es un corticosteroide, por ejemplo, un corticosteroide seleccionado del grupo que consiste en dexametasona, hidrocortisona (Cortisol), acetato de cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, deflazacort, betametasona, triamcinolona, beclometasona, parametasona, fluticasona, acetato de fludrocortisona, acetato de desoxicorticosterona (DOCA), fluprednisolona, propionato de fluticasona, budesonido, dipropionato de beclometasona, flunisolido y acetonido de triamcinolona. De manera preferente, el segundo agente terapéutico es un agente que reduce las enzimas proteolíticas, un mediador inflamatorio, o una citoquina pro-inflamatoria tal como TNF- α y/o interleucina-1 (IL-1). De manera preferente, el segundo agente terapéutico es DMARD o un DMD, opcionalmente además en donde el segundo agente terapéutico es metotrexato (Rheumatrex^{MR}, Trexall^{MR}), hidroxiquina (Plaquenil^{MR}), sulfasalazina (Azulfidine^{MR}), leflunomida (Arava^{MR}), un inhibidor del factor de necrosis tumoral (por ejemplo, etanercept (Enbrel^{MR}, adalimumab (Humira^{MR}), e infliximab (Remicade^{MR})), un agente de bloqueo co-estimulador de células T (por ejemplo, abatacept (Orencia^{MR})), un agente de agotamiento de células B (por ejemplo, rituximab (Rituxan^{MR})), una terapia de antagonista de interleucina-4 (IL-4) (por ejemplo, anticuerpos anti-IL4 o anticuerpos receptores anti-IL4), una terapia antagonista de interleucina-5 (IL-5) (por ejemplo, anticuerpos anti-IL5 o anticuerpos receptores anti-IL5), una terapia antagonista de interleucina-6 (IL-6) (por ejemplo, anticuerpos anti-IL6 o anticuerpos receptores anti-IL6), una terapia de antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-

1) (anakinra (Kineret^{MR})), un anticuerpo anti-BlyS (Benlysta^{MR}), oro intramuscular, u otro agente inmunomodulador o citotóxico (por ejemplo, azatioprina (Imuran^{MR}), ciclofosfamida, o ciclosporina A (Neoral^{MR}, Sandimmune^{MR})). En una modalidad, cuando se trata la enfermedad respiratoria el segundo agente terapéutico es un inhibidor de PDE-4.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TLR3 se administra antes de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TLR3 se puede administrar aproximadamente de 0 a 30 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-TLR3 se administra de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a 1 día, o de aproximadamente 1 a 5 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TLR3 se administra concurrentemente con la administración de los agentes terapéuticos. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TLR3 se administra después de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TLR3 se puede administrar aproximadamente de 0 a 30 días después de la administración del segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-TLR3 se administra de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a 1 día, o de aproximadamente 1 a 5 días después de la administración del segundo agente terapéutico.

Para el uso en la administración a un paciente, la composición se formulará para la administración al paciente. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar oralmente, parenteralmente, por rocío de inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginalmente o a través de un depósito implantado. Lo utilizado en la presente incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Los presentes anticuerpos se pueden incluir en kits. Los kits pueden contener opcionalmente además cualquier número de anticuerpos y/u otros compuestos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o cualquier otro número de anticuerpos terapéuticos y/o compuestos (por ejemplo, segundo agente(s) terapéutico). Se apreciará que esta descripción de los contenidos de los kits no es limitante de ninguna manera. Por ejemplo, el kit puede contener otros tipos de compuestos terapéuticos. De manera preferente, los kits también incluyen instrucciones para utilizar los anticuerpos, por ejemplo, detallar los métodos descritos en la presente.

Aspectos y ventajas adicionales de esta invención se divulgarán en la siguiente sección experimental, que se debe considerar como ilustrativa y no limitante del alcance de esta solicitud.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Materiales

Células de Riñón Embrionicas Humanas 293T (#CRL-1573) se adquirieron de ATCC. Anticuerpos (antígeno, proveedor, referencia): IgG Anti-Ratón de Cabra de Fragmento F(ab')₂ acoplado a AP (H+L), Jackson ImmunoResearch, ref. 115-056-003, IgG Fc anti-ratón de cabra acoplado a PE, Beckman Coulter, IM0551 Instrumentation: citómetro de flujo FACSCanto II^{MR} (BD Biosciences). Ligandos TLR3 (nombre, proveedor, referencia): poly(IC) HMW, InvivoGen, ref. tlr-pic. PoliAU, también referido como IPH3102, es una molécula por lo menos parcialmente de doble hebra fabricada de ácido(s) poliadenilico y ácido(s) poliuridílico, preparado como se describe en WO2009/130616 (Innate Pharma), la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia. El PoliAU fue un poliAU de peso molecular alto que tiene un M_n (también referido como "peso molecular promedio en número" o "peso molecular medio") superior a 2000 kD, un PI de 1.4 - 1.6, y estabilidad térmica: 62.3-63.2°C, hipercromicidad de 53-60%. El anticuerpo 31C3 se describe en la solicitud de PCT No. WO2011/004028, la divulgación de la cual se incorpora en la presente a manera de referencia.

Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

Los procedimientos General Biacore T100. Las mediciones SPR se llevaron a cabo en un aparato Biacore T100 (Biacore GE Healthcare) a 25°C. En todos los experimentos Biacore la solución amortiguadora de HBS-EP+ o HBS-P (Biacore GE Healthcare) sirvió como solución amortiguadora de corrida y los sensogramas se analizaron con el software de Evaluación Biaevaluation 4.1 y Biacore T100.

Para la medición de afinidad bivalente, a menos que se indique de otra manera, la proteína TLR3-His se inmovilizó sobre un Sensor Chip CM5 (capa de dextrano carboximetilado) por acoplamiento de aminas. Los anticuerpos anti-TLR3 se diluyeron a una serie de concentraciones (0.01 to 100 nM) en la solución amortiguadora de corrida HBS-

EP+ (para afinidad en pH neutro) o acetato 10mM pH5.6, NaCl 150 mM (para afinidad en pH ácido), se inyectó sobre el antígeno inmovilizado durante dos minutos en una velocidad de flujo de 40 µl/min y se dejó desasociar durante 3 minutos antes de la regeneración por una inyección de 5 a 30s de NaCl de 0.5M, solución amortiguadora de NaOH de 10mM. Los sensogramas resultantes se analizaron por ajuste global utilizando el modelo apropiado.

Ensayo de reporteros de Luciferasa

Un ensayo del gen reportero que utiliza como promotor ISRE (elemento de respuesta estimulado por IFN) y como gen reportero y ajustó a la luciferasa de proteína. Una línea de células 293T (ATCC, #CRL-1573) se transfectó establemente con plásmido pISRE-luc (#219089 – Stratagene), seleccionado adicionalmente mediante clonación como ya que induce la respuesta óptima a la estimulación de IFN-alfa y es referido como un 293T-ISRE de control. Esta línea de células se transfectó establemente además con el plásmido pUNO-humanoTLR3 (#puno-hltr3 – InVivogen) y es referido como 293T-TLR3-ISRE.

El ensayo de eficacia se llevó a cabo como se describe: en el día 0, las células se sembraron a 4x10⁵ células/mL en medio de cultivo completo en una placa de cultivo de 96 pocillos (100µl/pocillo). Las células primero se incubaron a 37°C durante 20 horas, luego 50 µL del medio se descartó y las células se activaron con 25 µl/pocillo final de cantidades fijas de poliAU junto con concentraciones de incremento de anticuerpos anti-TLR3. Las células incubadas con medios resientes se utilizaron como la actividad de luciferasa de fondo (50µl/pocillo). Las células se incubaron a 37°C durante 6 horas. 100 µL de Steady Glo recientemente descongelado (Promega) se agregaron a cada pocillo, las placas se incubaron 10 min a RT en la oscuridad y la luz emitida en cada pocillo se cuantificó como Count Per Second (CPS) en un aparato contador gama (TopCount).

Generación de constructos TLR3 mutantes K145E, D116R, K182E, N196A y E171A

La generación de los mutantes TLR3 K145E, D116R, K182E, N196A y E171A se llevó a cabo utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange^{MR} de Stratagene de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados se listan en la Tabla 4A. La mutagénesis se llevó a cabo en el TLR3 humano de tipo natural insertado en un vector pcADN3.1. Después de la secuenciación, los vectores que contienen las secuencias mutadas se prepararon como Maxiprep utilizando el Sistema Maxiprep de Plásmidos Promega PureYield^{MR}. Los vectores luego se utilizaron para la transfección de células HEK-293T utilizando Lipofectamina 2000 de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 4A	
Nombre del Oligonucleótido	Secuencia
K145E delantero	5' GAA AAT TAA AAA TAA TCC CTT TGT CGA GCA GAA GAA TTT AAT CAC ATT AG 3' (SEQ ID NO: 65)
K145E inverso	5' CT AAT GTG ATT AAA TTC TTC TGC TCG ACA AAG GGA TTA TTT TTA ATT TTC 3' (SEQ ID NO: 66)
D116R delantero	5' CAA TGA GCT ATC TCA ACT TTC TCG TAA AAC CTT TGC CTT CTG CAC 3' (SEQ ID NO: 67)
D116R inverso	5' GTG CAG AAG GCA AAG GTT TTA CGA GAA AGT TGA GAT AGC TCA TTG 3' (SEQ ID NO: 68)
K182E delantero	5' CAA GAG CTT CTA TTA TCA AAC AAT GAG ATT CAA GCG CTA AAA AGT GAA G 3' (SEQ ID NO: 69)
K182E inverso	5' C TTC ACT TTT TAG CGC TTG AAT CTC ATT GTT TGA TAA TAG AAG CTC TTG 3' (SEQ ID NO: 70)
N196A delantero	5' GAA GAA CTG GAT ATC TTT GCC GCT TCA TCT TTA AAA AAA TTA GAG TTG 3' (SEQ ID NO: 71)
N196A inverso	5' CAA CTC TAA TTT TTT TAA AGA TGA AGC GGC AAA GAT ATC CAG TTC TTC 3' (SEQ ID NO: 72)

E171A delantero	5' GGA ACT CAG GTT CAG CTG GCC AAT CTC CAA GAG CTT CTA TTA TCA 3' (SEQ ID NO: 73)
E171A inverso	5' TGA TAA TAG AAG CTC TTG GAG ATT GGC CAG CTG AAC CTG AGT TCC 3' (SEQ ID NO: 74)

Generación de los constructos TLR3 mutantes N-terminal 1-19

- 5 La generación de los mutantes TLR3 (constructos V5-TLR3-CD32) se generaron por PCR (ver Tabla 4B a continuación). Todos los cebadores Mx-R se utilizaron con el siguiente cebador 5' ACCCAAGCTGGCTAGCATGAGACAGACTTTGCCTTG (SEQ ID NO: 121). Todos los cebadores Mx-F se utilizaron con el siguiente cebador 3' AGCACAGTGGCGGCCGCTTAGTTACTGTTGACATGG (SEQ ID NO: 122). Las
- 10 secuencias amplificadas se ejecutaron en un gel de agarosa luego se purificaron utilizando el kit de Extracción del Gel Qiagen. Los dos productos de PCR generados para cada mutante luego se ligaron en un vector pcADN3.1, se digirieron con la enzima de restricción NheI y NotI, con el sistema InFusion (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 15 Después de la secuenciación, los vectores que contienen las secuencias mutadas se prepararon como Maxiprep utilizando el Sistema Maxiprep de Plásmido Promega PureYield^{MR}. Los vectores luego se utilizaron para la transfección de células HEK-293T utilizando Lipofectamina 2000 de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 4B		
Mutantes	Cebadores Inversos	Cebadores Delanteros
Número 1 Q44H + V45I	M1-R 5'-gggtatatgagtcacttcaggtggctg-3' (SEQ ID NO: 75)	M1-F 5'-tgactcatatacccgatgatctaccc-3' (SEQ ID NO: 76)
Número 2 R64Q + R65Q	M2-R-R 5'-taattgttgagttgattgggtaagg-3' (SEQ ID NO: 77)	M2-F 5'-caactccaacaattaccagccgccaacttc-3' (SEQ ID NO: 78)
Número 3 T86S + K89Q	M3-R.2 5' – ctccagttgtgagat ggagttaaatcctac atccaagc – 3' (SEQ ID NO: 79)	M3-F.2 5' – atctcacaactggagccagaattgtgccag aaactt c - 3' (SEQ ID NO: 80)
Número 4 K97I + M100L	M4-R 5'-taacaagggaagtatctggcacaattctggctcc-3' (SEQ ID NO 81)	M4-F 5'-atactccctgtttaaagtttgaacctcc-3' (SEQ ID NO 82)
Número 5 K117Q + A120V	M5-R 5'-gaagacaaaggttgatcagaaagttgagatagctc-3' (SEQ ID NO: 83)	M5-F 5'-caaaccttgtctctgcacgaatttgact-3' (SEQ ID NO: 84)
Número 6 Q136H	M6-R 5'-gtggattgagttggacatgagatgg-3' (SEQ ID NO: 85)	M6-F 5'-tccaactcaatccacaaaataaaataatccc-3' (SEQ ID NO: 86)
Número 7 N140S	M7-R 5'-attagatttaatttctggattgagttgg-3' (SEQ ID NO: 87)	M7-F 5'-aaaattaaatctaattcccttgtcaagcag-3' (SEQ ID NO: 88)

Número 8 V144K + K145N	M8-R 5'-ctgattcttaaagggattatttttaatttc-3' (SEQ ID NO: 89)	M8-F 5'-ccctttaagaatcagaagaatttaacacattag-3' (SEQ ID NO: 90)
Número 9 K147-A147	M9-R 5'-tgtgattaaattcgctgcttgacaaagggatt-3' (SEQ ID NO: 91)	M9-F 5'-gcgaatttaacacattagatctg-3' (SEQ ID NO: 92)
Número 10 K163-A163	M10-R 5'-agttcctaattgctgtagatgacaagcc-3' (SEQ ID NO: 93)	M10-F 5'-acagcattaggaactcaggttcag-3' (SEQ ID NO: 94)
Número 11 Q167G	M11-R 5'-ttccagctgaacccagttcctaattttgtag-3' (SEQ ID NO: 95)	M11-F 5'-gggggttcagctggaaaatctcc-3' (SEQ ID NO: 96)
Número 12 Q184L + K187R	M12-R 5'-acttcgtagcgctagaattttattgttgataatag-3' (SEQ ID NO: 97)	M12-F 5'-ctagcgctacgaagtgaagaactggatattc-3' (SEQ ID NO: 98)
Número 13 Q184L + K187Q	M13-R 5'-actttgtagcgctagaattttattgttgataatag-3' (SEQ ID NO: 99)	M13-F 5'-ctagcgctacaaagtgaagaactggatattc-3' (SEQ ID NO: 100)
Número 14 D192E + A195G	M14-R 5'-attgccaaagatctccagttctcacttttagcg-3' (SEQ ID NO: 101)	M14-F 5'-gagatctttggcaattcatcttaaaaaa-3' (SEQ ID NO: 102)
Número 15 Q208P + I209L	M15-R 5'-ctctttaagtgattcgatgacaactct-3' (SEQ ID NO: 103)	M15-F 5'-aatccacttaagagttttctccag-3' (SEQ ID NO: 104)
Número 16 H218Q	M16-R 5'-tcttccaattgcctgaaaacacccctggagaaaactc-3' (SEQ ID NO: 105)	M16-F 5'-caggcaattggaagattatttg-3' (SEQ ID NO: 106)
Número 17 A219T	M17-R 5'-tcttccaattgtgtgaaaacacccctggagaaaactc-3' (SEQ ID NO: 107)	M17-F 5'-cacacaattggaagattatttg-3' (SEQ ID NO: 108)
Número 18 G234N + S236H	M18-R 5'-aagggtgggattcagctggacattgttcag-3' (SEQ ID NO: 109)	M18-F 5'-ctgaatccccaccttacagagaagctatgtttg-3' (SEQ ID NO: 110)
Número 19 L243W + A246S	M19-R 5'-gtttgataattccaacatagcttctctgtaagg-3' (SEQ ID NO: 111)	M19-F 5'-tggaattatcaaacacaagcattcggaatctg-3' (SEQ ID NO: 112)
Número 23 S112A + Q113S+ S115A	<u>M23-R:</u> 5'- tagctcattgtgctggagggttc -3' (SEQ ID NO: 119)	<u>M23-F:</u> 5'- aaaacctttgccttctgcac -3' (SEQ ID NO: 120)
Número 24 K137S +	<u>M24a-R:</u> 5'- tgcaattgactggattgagttggacatgagatggag-3'	<u>M24a-F:</u> 5'- atccagtcaattgcaataatccctttgtcaagcag-3'

K139A	(SEQ ID NO: 113)	(SEQ ID NO: 114)
-------	------------------	------------------

Generación de constructos de superficie celular TLR3

La secuencia TLR3 de tipo natural o mutante madura se fusionó a la transmembrana CD32 y los dominios intracelulares como se describe por De Bouteiller y colaboradores (2005) *J. Biol. Chem.* 280(46): 38133-38145. Una primera ronda de PCR se llevó a cabo para introducir una etiqueta V5 en la posición N-terminal de la proteína de fusión TLR3-CD32 y una segunda ronda – utilizando la primera PCR como una plantilla – para introducir el péptido líder TLR3 en el constructo. Los cebadores usados para estas etapas se resumieron en la siguiente tabla (Tabla 5). El producto de PCR se clonó en TA en el vector pGEMTeasy para secuenciación y se clonó finalmente en el vector pcADN3.1 utilizando los sitios de restricción NheI y NotI.

Tabla 5	
Nombre del Oligonucleótido	Secuencia
V5 Tag Delantero	5' AA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG AAG TGC ACT GTT AGC cat gaa G (SEQ ID NO: 115)
V5 Tag Inverso	3' AA GCG GCC GC TTA GTT ATT ACT GTT GAC ATG GTC G (SEQ ID NO: 116)
Péptido líder TLR3 Delantero	5' AA GCT AGC ATG AGA CAG ACT TTG CCT TGT ATC TAC TTT TGG GGG GGC CTT TTG CCC TTT GGG ATG CTG TGT GCA TCC TCC ACC ACC GGT AAG CCT ATC CCT AAC CC (SEQ ID NO: 117)
Péptido líder TLR3 Inverso	3' AA GCG GCC GC TTA GTT ATT ACT GTT GAC ATG GTC G (SEQ ID NO: 118)

Titulación en las células que expresan TLR3+ en su superficie

La línea de células HEK293T se transfectó transitoriamente con el constructo TLR3 ECD-CD32 de tipo natural o mutante utilizando lipofectamina 2000 y se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con un intervalo de dosis de 11E1 o 31C3. Los mAbs ligados se revelaron por la adición de un anticuerpo IgG Fc anti-ratón de cabra acoplado con PE durante 20 minutos adicionales a 4°C. Después de dos ciclos de lavado, la célula MFI se analizó en un citómetro FACS Canto II. Con el objetivo de estudiar el efecto del pH en la afinidad del mAb, la tinción se llevó a cabo en solución amortiguadora de tinción (0.2% de BSA, EDTA 2mM, 0.02% de Azoture de Sodio) pH7.4 o en solución amortiguadora de tinción de ácido cítrico-acidificada pH 5.6.

EJEMPLO 1 - GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HUMANOS DE RATÓN Y RATA MONOCLONALES ESPECÍFICOS DE TLR3

Se llevó a cabo una serie de inmunizaciones a fin de generar diferentes anticuerpos que bloquean el TLR3 humano con eficacia mejorada sobre los anticuerpos previos. Las clasificaciones primarias y secundarias fueron como sigue.

Inmunización #1.

Clasificación primaria. Para obtener anticuerpos TLR3 anti-humanos, ratones Balb/c (3 animales) se inmunizaron con una proteína recombinante de dominio extracelular TLR3 etiquetada con His humana recombinante (R&D systems, #1487-TR-050). Los ratones se inmunizaron, las células del bazo se fusionaron y se cultivaron en presencia de células de bazo irradiadas. Los ratones recibieron una primo-inmunización con una emulsión de 50 µg de proteína TLR3 y Adyuvante de Freund Completo, intraperitonealmente, una 2^{da} inmunización con una emulsión de 50 µg de proteína TLR3 y Adyuvante de Freund Incompleto, intraperitonealmente, y un refuerzo con 10 µg de proteína TLR3, intravenosamente. Los hibridomas se colocaron en placas de cultivo y los sobrenadantes (SN) se evaluaron en una primera clasificación para la ligación de TLR3 utilizando un ELISA desarrollado para la detección de la ligación a TLR3. Brevemente, la proteína TLR3 recombinante etiquetada con His (R&D systems, #1487-TR) se recubrió en placas ELISA Maxisorp^{MR} (Nunc). El sobrenadante de las placas de cultivo de hibridoma se recolectaron y se incubaron sobre placas de ELISA en presencia de un anticuerpo anti-TLR3 que inhibe TLR3 y se liga dentro de la porción C-terminal, y la presencia de la Ig de ligación a TLR3 se reveló con IgG Anti-Ratón de Cabra de fragmento F(ab')₂ acoplado a AP (H+L). 358 hibridomas de 3840 se seleccionaron para clasificación secundaria.

Clasificación secundaria; selección de hibridomas de interés. 358 sobrenadantes se retuvieron y se sometieron a prueba en una clasificación adicional por tinción de FACS utilizando un TLR3 mutado con D116R que expresan transcientemente la línea de células 293T para identificar los anticuerpos que no pierden la ligación al TLR3 mutante en la posición de aminoácidos 116. 151 hibridomas en 358 no perdieron la ligación a D116R. La actividad antagonista de los hibridomas también se sometió a prueba en un ensayo reportero de gen de ISRE-luciferasa en células 293T-huTLR3. Los pocillos de los sobrenadantes que tienen un efecto inhibitor superior a 60% se seleccionaron para clonación adicional. 28 hibridomas tuvieron actividad antagonista y 25 clones tuvieron tanto actividad antagonista como ligación a D116R.

Clonación de hibridomas de interés potencial. Los hibridomas potencialmente de interés de la clasificación inicial se clonaron al limitar las técnicas de dilución en placas de 96 pocillos, y los clones se sometieron a prueba en la misma serie de clasificaciones secundarias como para los hibridomas. Los clones de 13 hibridomas tuvieron tanto actividad antagonista como ligación a D116R.

Con el objetivo de comparar estos 13 hibridomas a los mAbs anti-TLR3 de referencia de los inventores (notablemente 31C3), los 13 hibridomas se amplificaron y sus sobrenadantes se purificaron. Los mAbs purificados se sometieron a prueba en un ensayo de gen-reportero. Los hibridomas se seleccionaron para caracterización adicional basado en la eficiencia del bloqueo de la señalización TLR3 en comparación con los mAbs anti-TLR3 de referencia.

2 hibridomas se evaluaron adicionalmente para la ligación de epítomos al TLR3 K145E y K182E mutantes (ver también Ejemplo 6). Ambos anticuerpos no mostraron ninguna pérdida de ligación a la variante K145E de TLR3 pero uno de ellos mostró pérdida en la ligación al mutante K182E. Clon 11E1 se ligó a TLR3 aún en presencia de la mutación K145E o K182E.

Inmunización #2.

Ratas LOU/c se inmunizaron con TLR3 humano etiquetado con His recombinante, proteína recombinante de dominio extracelular sin portador (R&D systems, #1487-TR). Las ratas recibieron, en el día 0, una primo-inmunización con una emulsión de 50 µg de TLR3 humano diluido en PBS y Adyuvante de Freund Completo, intraperitonealmente, una 2^{da} inmunización en el día 14 con una emulsión de 50 µg de TLR3 humano diluido en PBS y Adyuvante de Freund Incompleto, intraperitonealmente, y un refuerzo con 25 µg de TLR3 humano diluido en PBS, intravenosamente. Células del bazo inmunes se fusionaron con células B inmortalizadas X63.Ag8.653, y se cultivaron en presencia de células del bazo irradiadas.

La clasificación secundaria se llevó a cabo como en la inmunización #1, en lo anterior. Los hibridomas potencialmente de interés se clonaron mediante técnicas de dilución limitante en placas de 96 pocillos, y los clones se sometieron a prueba en la misma serie de clasificaciones secundarias como para los hibridomas. Con el objetivo de comparar los hibridomas a los mAbs anti-TLR3 de referencia de los inventores, los hibridomas se amplificaron y sus sobrenadantes se purificaron. Los mAbs purificados se sometieron a prueba en un ensayo de gen-reportero. Los hibridomas se seleccionaron para caracterización adicional basado en la eficiencia del bloqueo de la señalización TLR3 en comparación con los mAbs anti-TLR3 de referencia 31C3. Los hibridomas se evaluaron adicionalmente para la ligación al epítipo a los polipéptidos TLR3 mutantes que tienen K145E y K182E. Los clones 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 se ligaron a TLR3 aún en presencia de la mutación K145E o K182E.

EJEMPLO 2 – GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RATÓN DE RATA MONOCLONAL ESPECÍFICOS DE TLR3

Clasificación primaria. Para obtener los anticuerpos anti-TLR3, ratas LOU/c se inmunizaron con un TLR3 de ratón etiquetado con His recombinante, proteína recombinante de dominio extracelular sin portador (R&D systems, #3005-TR) y TLR3 humano etiquetado con His recombinante, proteína recombinante de dominio extracelular sin portador (R&D systems, #1487-TR). Las ratas recibieron, en el día 0, una primo-inmunización con una emulsión de 50 µg de TLR3 de ratón + 50 µg de TLR3 humano diluido en PBS y Adyuvante de Freund Completo, intraperitonealmente, una 2^{da} inmunización en el día 14 con una emulsión de 50 µg de TLR3 de ratón + 50 µg de TLR3 humano diluido en PBS y Adyuvante de Freund Incompleto, intraperitonealmente, y un refuerzo con 25 µg de TLR3 de ratón + 25 µg de TLR3 humano diluido en PBS, intravenosamente. Las células del bazo inmunes se fusionaron con células B inmortalizadas X63.Ag8.653, y se cultivaron en presencia de células del bazo irradiadas.

40 placas de cultivo se obtuvieron y se evaluaron en una primera clasificación para la ligación a TLR3 de ratón utilizando un ELISA desarrollado para la detección de la ligación a TLR3. Brevemente, la proteína TLR3 de ratón recombinante etiquetada con His (R&D systems, #1487-TR-050) se recubrió en placas de 96 pocillos Ni-NTA (Qiagen). El sobrenadante (SN) de las placas de cultivo de hibridoma se incubaron en las placas TLR3, y la presencia de Ig de ligación a TLR3 se reveló con la IgG-HRP F(ab) anti-ratón de cabra.

Clasificación secundaria: selección de hibridomas de interés. 181 sobrenadantes se retuvieron y se sometieron a prueba en una clasificación adicional en una prueba de inhibición en células 293T-mTLR3. Los pocillos de los

sobrenadantes que tienen un efecto inhibitor superior a 95% se seleccionaron para clonación adicional al limitar la dilución.

La clonación de hibridomas de interés potencial. 27 hibridomas potencialmente interesantes seleccionados de la clasificación inicial se clonaron al limitar las técnicas de dilución en placas de 96 pocillos, y 370 subclones se evaluaron en una clasificación para la ligación a TLR3 de ratón utilizando un ELISA como lo anterior. Los 178 clones positivos se sometieron a prueba en una clasificación adicional en una prueba de inhibición en las células 293T-TLR3 como en lo anterior. Entre ellas estuvo el sobrenadante del pocillo G7 de la placa 28 (28G7).

EJEMPLO 3 – LIGACIÓN AL TLR3 DE SUPERFICIE CELULAR

Para investigar la posibilidad de que el TLR3 se cicla a la superficie celular y que el TLR3 de superficie celular contribuye a la internalización y eficacia de los anticuerpos anti-TLR3 inhibidores, la ligación al TLR3 de superficie celular se sometió a prueba, en comparación con el anticuerpo de referencia 31C3. Adicionalmente, la ligación (por ejemplo, afinidad) al TLR3 de superficie celular en pH neutro puede diferir de aquel del TLR3 endosómicamente expresado en pH ácido. Los anticuerpos se sometieron a prueba para la ligación a las células que expresan TLR3 humano solamente en la superficie celular (células 293T que expresan TLR3/CD32), en condiciones de pH neutros puestos que el pH podría afectar potencialmente la conformación de TLR3. Los resultados para el pH neutro se muestran en las Figuras 1A, 1B, 1C y 1D para los anticuerpos 11E1, 7G11, 32C4 y 31F6, respectivamente. Los valores EC₅₀ se muestran en la Tabla 6. Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6 y 32C4 tuvieron cada uno ligación potente al TLR3 humano expresado sobre la superficie en pH neutro. La afinidad de los anticuerpos para TLR3 fue más potente que el anticuerpo de referencia 31C3 en pH neutro.

Tabla 6	
mAb	EC ₅₀ (µg/ml)
31C3	0.413
11E1	0.016
7G11	0.021
32C4	0.037
31F6	0.026

EJEMPLO 4 - AFINIDAD BIVALENTE EN PH ENDOSÓMICO Y NEUTRO

Las propiedades de ligación del anticuerpo 11E1 se determinaron utilizando los métodos descritos para SPR, artículo c). La ligación a TLR3 en condiciones neutras (pH 7.2) y ácidas (pH 5.6), y valores K_D se calcularon. En pH neutro, 11E1 mostró afinidad bivalente potente (K_D) para el TLR3 humano recombinante (K_D media (M) en pH 7.2 de 8.75×10^{-11}). La afinidad de ligación en pH 5.6 de alguna manera fue menor para el anticuerpo 11E1 que la afinidad en pH 7.2, ya que la K_D media (M) en pH 5.6 fue 1×10^{-9} .

Similarmente, la ligación de los anticuerpos TLR3 anti-ratón al TLR3 de ratón se determinó en condiciones neutras (pH 7.2) y ácidas (pH 5.6), y los valores K_D se calcularon. En pH neutro y ácido, pH, mAb 32D4, 28G7 y 13D1 mostraron afinidad bivalente potente y similar (K_D) para TLR3 de ratón recombinante mejor que 500 picomolar. La afinidad (media de 2 o 3 experimentos) de mAb 28G7 fue 7.05×10^{-13} en pH neutro (K_D media (M) en pH 7.2) y 1.26×10^{-13} en pH ácido (K_D media (M) en pH 5.6).

EJEMPLO 5 – ENSAYO REPORTERO HUMANO

Los anticuerpos se sometieron a prueba para la inhibición de la señalización TLR3 en una actividad de gen reportero basado en luciferasa (293T-TLR3-ISRE). El acoplamiento del receptor TLR3 utilizando agonistas TLR3 tal como poli (I:C) se ha reportado para activar la ruta de tipo IFN que incluye el promotor ISRE (Wietek y colaboradores J. Biol. Chem., 278 (51), p50923, 2003). Brevemente, los agonistas ARNs TLR3 se utilizaron para inducir la señalización TLR3 en el ensayo reportero en presencia de anticuerpos anti-TLR3, y la señalización TLR3 se evaluó. Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 fueron más potentes en este ensayo que el anticuerpo 31C3. Los resultados mostrados en las Figuras 2A, 2B, 2C, 2D y 2E para los anticuerpos 11E1, 7G11, 32C4, 31F6 y 37B7, respectivamente, que muestran inhibición dependiente de dosis de la señalización TLR3 utilizando un ensayo de luciferasa TLR3 humano 293T con los anticuerpos anti-TLR3 humanos. Cada anticuerpo se compara con el anticuerpo de referencia 31C3.

Similarmente, los anticuerpos TLR3 anti-ratón de rata se evaluaron similarmente en experimentos separados por su capacidad de inhibir la señalización TLR3 en una actividad de gen reportero basado en luciferasa TLR3 de murino (293T-mTLR3-ISRE). El anticuerpo 28G7 mostró inhibición dependiente de dosis de la señalización TLR3 con una IC₅₀ de 2.6 µg/ml.

EJEMPLO 6 - MAPEO DE EPÍTOPOS

El mapeo de epítomos en pH. Los ensayos de competición se condujeron por el ensayo FACS en células HEK293T-WT TLR3 ECD /CD32. Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 compitieron con el anticuerpo previamente obtenido 31C3 para la ligación a TLR3 puesto que la ligación por un anticuerpo deterioró la ligación a TLR3 del otro anticuerpo. El anticuerpo 31C3 se liga por lo menos en parte a una región de TLR3 que corresponde a los residuos 102 a 204 del polipéptido TLR3 maduro (particularmente residuos 174 a 191 y residuo 182) y compiten entre sí para la ligación al TLR3 humano. Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 compitieron cada uno con 31C3, pero el grado de competición varió, sugiriendo que los epítomos de 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 estuvieron en la misma región, pero teniendo diferencias entre sí. El anticuerpo 11E1 compitió con cada uno de los anticuerpos 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7. Basado en los perfiles de competición entre los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 y el anticuerpo 31C3, por lo menos tres contenedores de epítomos diferentes se determinaron puesto que por lo menos 11E1, 37B7 parecieron diferir entre sí y de 7G11, 31F6, 32C4.

EJEMPLO 7 - MAPEO DE EPÍTOPOS POR LIGACIÓN A LOS MUTANTES TLR3

Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 compiten para la ligación a TLR3 con el anticuerpo 31C3. El 31C3 se ha determinado que se liga dentro del extremo N-terminal del TLR3 humano, teniendo un epítipo principal del anticuerpo que incluye el residuo 182 pero no los residuos K145, D116, K182, E171 o N196. Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 se sometieron a prueba por lo tanto para la ligación a los mutantes TLR3. Los polipéptidos mutantes TLR3 que tienen mutaciones K145E, D116R, K182E, N196A y E171A (referencia a SEQ ID NO: 1) se prepararon como se describe en la presente en los Materiales y Métodos y la tinción del anticuerpo anti-TLR3 a las células que expresan polipéptidos mutantes TLR3 se evaluaron por FACS. Los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 no mostraron ninguna pérdida de ligación al TLR3 de tipo natural (WT) no mutado ni a cualquiera de K145E, D116R, E171A, K182E o N196A. El epítipo principal de los anticuerpos 11E1, 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 mientras se situó en la región N-terminal por lo tanto no incluyó los residuos K145, D116, K182, E171 o N196.

Los anticuerpos después se sometieron a prueba para la ligación al conjunto adicional de mutantes en la porción N-terminal de TLR3 para identificar nuevos epítomos. Los anticuerpos por lo tanto se sometieron a prueba para determinar la ligación a los mutantes TLR3. Los polipéptidos mutantes TLR3 que tienen mutaciones en las posiciones Q44H y V45I, R64Q y R65Q, T86S y K89Q, K97I y M100L, K117Q y A120V, Q136H, N140S, V144K y K145N, K147A, K163A, Q167G, Q184L y K187R, Q184L y K187Q, D192E y A195G, Q208P y I209L, H218Q, A219T, G234N y S236H, L243W y A246S, S112A, Q113S, y S115A, y K137S y K139A (referencia a SEQ ID NO: 1) se prepararon como se describe en la presente en los Materiales y Métodos y la tinción del anticuerpo anti-TLR3 a las células que expresan polipéptidos mutantes TLR3 se evaluó por FACS. El anticuerpo 11E1 mostró pérdida de ligación a los mutantes que tienen las sustituciones R64Q y R65Q, y a menor grado posiblemente los mutantes adyacentes T86S y K89Q. Los anticuerpos 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 mostraron pérdida de ligación a los mutantes que tienen las sustituciones K117Q y A120V pero no a cualquiera de los otros mutantes. Los anticuerpos 11E1 y 37B7 mostraron pérdida completa de ligación a los mutantes que tienen las sustituciones K137S y K139A, mientras que los anticuerpos 7G11, 31F6 y 32C4 mostraron pérdida parcial de ligación a los mutantes que tienen las sustituciones K137S y K139A. Adicionalmente, todos los anticuerpos 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 mostraron pérdida completa de ligación a los mutantes que tienen las sustituciones S112, Q113 y S115. Los anticuerpos 11E1 y 31C3 no mostraron pérdida de ligación a los mutantes que tienen las sustituciones S112, Q113, y S115. El epítipo principal del anticuerpo 11E1 incluye por lo tanto los residuos R64 y R65 y posiblemente (a menor grado) los residuos adyacentes T86 y K89, así como los residuos K137 y K139. El epítipo principal de los anticuerpos 7G11, 31F6, 32C4 y 37B7 incluye por lo tanto los residuos K117 y/o A120, así como S112, Q113 y/o S115. Adicionalmente, para el anticuerpo 37B7 el epítipo principal incluye además los residuos K137 y K139 mientras que para los anticuerpos 7G11, 31F6 y 32C4 los residuos K137 y K139 también pueden estar dentro del epítipo. Los residuos R64Q y R65Q en particular están dentro de la región de ligación a ARNs N-terminal en la superficie lateral sin glicano de TLR3 y los residuos K117 y A120 aunque parcialmente en la cadena principal de la molécula TLR3, están adyacentes a la región de ligación a ARNs N-terminal. Los residuos expuestos en la superficie adyacentes a estos residuos mutados pueden también contribuir a los epítomos de los anticuerpos, incluyendo por ejemplo, residuos 41, 43, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 88, 91, 92, 93, 96, 97, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 121, 132, 134, 137 y/o 139 (referencia a SEQ ID NO: 1) situados en la superficie de TLR3 en la región de la región de ligación a ARNs N-terminal. Los anticuerpos pueden como tales competir con la ligación de ARNs a TLR3. Los anticuerpos pueden ligarse dentro y/o adyacentes al sitio de ligación a ARNs N-terminal, incluyendo los residuos de expansión opcionalmente adicionales en la cadena principal de la proteína TLR3.

Las Figuras 2F, 2G, y 2H muestran la vista del extremo N-terminal del polipéptido TLR3, que muestra los residuos de aminoácidos mutados indicados en negro (Q44, V45, R64, R65, T86, K89, K97, M100, K117, A120, Q136, N140, V144, K145, K147, K163, Q167, Q184, K187, Q184, K187, D192, A195, Q208, I209, H218, A219, G234 y S236, L243 y A246). También se muestran en gris los residuos adyacentes a los residuos 86, 89, 117 y 120 (residuos 41, 43, 60, 61, 62, 67, 68, 88, 91, 92, 93, 96, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 121, 132, 134, 137 y 139); tales residuos adyacentes también se pueden ligar por los anticuerpos indicados. La Figura 2F muestra una vista de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3; la Figura 2G muestra una vista de la superficie lateral que contiene glicano

del polipéptido TLR3 y la cadena principal, con el extremo N-terminal del polipéptido TLR3 en el primer plano (a la izquierda de la imagen). La Figura 2H muestra una vista de la superficie lateral sin glicano del polipéptido TLR3 y la cadena principal, con el extremo N-terminal del polipéptido TLR3 en primer plano (a la derecha de la imagen).

5 EJEMPLO 8 – MODELO DE EFICACIA IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DEL AJUSTE PREVENTIVO RA

Brevemente, 20 ratones se inmunizaron en el día 0 con 100µg de colágeno emulsionado en CFA complementado con Mycobacter tuberculosis (2mg/ml) y se inyectaron intradérmicamente (ID) en la base de la cola. En el día 17, los animales se clasificaron (signos clínicos a menudo aparecen antes del refuerzo), se eligieron al azar en 2 grupos de 8 o 9 ratones de acuerdo con la suma del registro clínico de las 4 extremidades y se trataron. En los días 21, la inmunización de colágeno se reforzó por la administración ID de colágenos solo (100µg en 50µl).

Se constituyeron los siguientes grupos:

15 -grupo 1 (PBS, n=9): tratados con 200µl dos veces / semana IP

-grupo 2 (28G7, n=8): tratados con 500µg/ratones dos veces / semana IP

20 El registro de las cuatro extremidades del animal se evaluó tres veces a la semana durante 3 a 4 semanas. El registro se evaluó de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 7	
Registro	Nivel de inflamación
0	Sin evidencia de eritema e hinchamiento
1	Eritema e hinchamiento leve confinados a los tarsos o articulación del tobillo
2	Eritema e hinchamiento leve que se extienden desde el tobillo hasta los tarsos
3	Eritema e hinchamiento moderado que se extienden desde el tobillo hasta las articulaciones del metatarso
4	Eritema e hinchamiento grave que abarca el tobillo, pies y dedos, o anquilosis de la extremidad

25 Los resultados se reportan en la Figura 3A. El presente experimento indica que los anticuerpos anti-TLR3 son estadísticamente eficaces (* $p > 0.05$, ** $p > 0.005$, en la prueba de Dunnett) en el tratamiento curativo de Artritis Reumatoide (RA) en comparación con PBS.

EJEMPLO 9 – MODELO DE EFICACIA IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DEL AJUSTE CURATIVO RA

Experimento #1: 28G7, PBS, MTX

30 Brevemente, 30 ratones se inmunizaron en el día 0 con inyección intradérmica de 100µg de colágeno emulsionado en CFA complementado con Mycobacter tuberculosis (2mg/ml) en la base de la cola. 21 días después, la inmunización de colágeno se reforzó por la administración ID de colágeno solo (100µg en 50µl/ratón). En el día 24, los animales se eligieron al azar en 3 grupos de 10 ratones de acuerdo con la suma del registro clínico de las 4 extremidades y el tratamiento comenzó.

Grupo 1 (PBS, n=10): tratado con 200µl dos veces / semana IP.

40 Grupo 2 (Metotrexato – MTX, n=10): tratado con 2.5 mg/kg dos veces / semana IP.

Grupo 3 (28G7, n=10): tratado con 500µg/ratón dos veces / semana IP.

El registro de las cuatro extremidades de los animales se evaluó tres veces a la semana durante 3 a 4 semanas. El registro se evaluó de acuerdo con la Tabla 7.

45 Los resultados se reportan en la Figura 3B. El presente experimento indica que los anticuerpos anti-TLR3 son estadísticamente efectivos en el tratamiento de una Artritis Reumatoide establecida (RA) en comparación con PBS y Metotrexato (* $p > 0.05$, en la prueba de Dunnett). MTS que tiene un mecanismo diferente de acción que el anticuerpo anti-TLR3, una combinación de los dos fármacos podría ser benéfica.

50

Experimento #2: 28G7, PBS, anti-TNF α Humira^{MR}

Brevemente, 35 ratones se inmunizaron en el día 0 con inyección intradérmica de 100 μ g de colágeno emulsionado en CFA complementado con Mycobacter tuberculosis (2mg/ml) en la base de la cola. 21 días después, la inmunización de colágeno se reforzó por la administración ID de colágeno solo (100 μ g en 50 μ l/ratón). En el día 24, los animales se eligieron al azar en 4 grupos de acuerdo con la suma del registro clínico de las 4 extremidades y el tratamiento comenzó.

Grupo 1 (PBS, n=9): tratado con 200 μ l dos veces / semana IP.

Grupo 2 (control Ig anticuerpo, n=9): tratado con 500 μ l dos veces / semana IP.

Grupo 3 (28G7, n=9): tratado con 500 μ g/ratón dos veces / semana IP.

Grupo 4 (Humira^{MR}, n=6): tratado con 100 μ l dos veces / semana IP.

El registro de las cuatro extremidades de los animales se evaluó tres veces a la semana durante 3 a 4 semanas. El registro se evaluó de acuerdo con la Tabla 7.

Los resultados se reportan en la Figura 3C. El presente experimento indica que los anticuerpos anti-TLR3 son eficaces en el tratamiento de una Artritis Reumatoide establecida (RA) en comparación con PBS y el anticuerpo anti-TNF α Humira^{MR}. El anti-TNF α que tiene un mecanismo diferente de acción que el anticuerpo anti-TLR3, una combinación de los dos fármacos podría ser benéfico.

EJEMPLO 10 – MODELO DE EFICACIA IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DE COLITIS

Cuatro grupos de 10 ratones machos (Balb/c) se utilizaron para el modelo de colitis inducida por TNBS y un grupo extra de 8 ratones sin colitis se evaluó como control (sin dosificación, instilación intracolónica de solución salina).

Los grupos tratados se dividieron como sigue:

Grupo 1: 10 ratones recibieron anticuerpo 28G7 (ip, 500 μ g/ratón).

Grupo 2: 10 ratones recibieron una administración de anticuerpo relevante de TLR3 (ip, 500 μ g/ratón).

Grupo 3: 10 ratones recibieron el anticuerpo TNF anti-ratón de rata (ip, 15mg/kg, Humira^{MR}).

Grupo 4: 10 ratones recibieron un PBS (ip, 200 μ g/ratón).

Una hora después en las inyecciones, la colitis se indujo por instilación intracolónica de ácido 2, 4, 6-trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) (2 mg/ratón en 40% de etanol de TNBS) en ratones Balb/C machos (de 5 a 6 semanas de edad). En los grupos 1, 2 y 3, otra inyección de ya sea 28G7 o anticuerpo no de TLR3 relevante o el anticuerpo anti-TNF se repitió 72 horas después de la primera inyección de anticuerpos.

Para todos los grupos, varios parámetros de la progresión de la enfermedad se evaluaron diariamente: peso corporal, presencia de sangre en las heces, presencia y gravedad de diarrea. Todos los animales se sacrificaron para la recolección de tejidos siete días después de la inducción de colitis. El registro del daño macroscópico, espesor de pared y actividad de mieloperoxidasa (índice de infiltración de granulocitos), se midieron en los tejidos colónicos. El registro del daño macroscópico se evalúa al observar la sangre fecal, diarrea, hemorragia, lesión, mucosidad, eritema, edema, úlcera y constricción.

La Figura 4 muestra los resultados del experimento. La Figura 4A muestra las mediciones del espesor de la pared para los ratones tratados con solución salina (puntos negros), con TNBS solamente (cuadros negros) con un anticuerpo anti-TNF α y TNBS (triángulos negros), con 28G7 y TNBS (puntos abiertos), y con un Ab de control y TNBS (cuadros abiertos). La Figura 4B muestra el registro de daño macroscópico para los ratones tratados con solución salina (puntos negros), con TNBS solamente (cuadros negros) con un anticuerpo anti-TNF α y TNBS (triángulos negros), con 28G7 y TNBS (puntos abiertos), y con un Ab de control y TNBS (cuadros abiertos).

EJEMPLO 11 – MODELO DE EFICACIA IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DE COPD (ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA)

A. Estudio de un solo agente

Tres grupos de 10 ratones macho se trataron como sigue:

- 1 grupo de 10 ratones con un vehículo.

- 1 grupo de 10 ratones con la administración del anticuerpo TLR3 28G7 anti-ratón (i.p., 500µg/por ratón) en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24.

5 - 1 grupo de 10 ratones con roflumilast de control positivo (aprobado como Daxas^{MR}; antagonista de PDE-4) (oral, 15mg/kg, cinco veces a la semana).

Todos los ratones se trataron en los días 0, 7, 14 y 21 con Elastina y LPS (i.n.), para inducir COPD. En el día 28 los ratones se sacrificaron para análisis.

10 Los infiltrados celulares en las vías áreas se midieron por el análisis del fluido del lavado broncoalveolar (BAL) por el conteo de células diferenciales en el día 28. La oxigenación de la sangre venosa se midió por gasometría en el día 28. El nivel de los mediadores inflamatorios en BALF, a través del análisis para los niveles de proteínas de TNF-alfa, IL-6, IL-17A e IP-10 se llevó a cabo por ensayos multiplex. Los resultados se muestran en la Figura 5. Las Figuras muestran que los anticuerpos anti-TLR3 fueron sumamente efectivos en tratar COPD, incluyendo en la disminución de la infiltración de la vía área de neutrófilos, saturación de oxígeno de sangre venosa y citoquinas pro-inflamatorias. El análisis estadístico se llevó a cabo en todos los datos utilizando una prueba t de Student: ** p<0.05; *** p<0.005; **** p<0.0005.

20 La Figura 5A muestra los conteos de células diferenciales BAL para macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos. Los anticuerpos anti-TLR3 disminuyeron en gran medida la infiltración de los neutrófilos en las vías aéreas, mientras que no afectan sustancialmente los macrófagos eosinófilos o linfocitos. COPD es mediado principalmente por los neutrófilos antes que los macrófagos o eosinófilos (ni linfocitos, utilizados en la presente como un control).

25 La Figura 5B muestra el oxígeno saturado de sangre venosa (en porciento) para cada una de LPS/elastasa sola y LPS/elastasa en combinación con anticuerpos anti-TLR3 o roflumilast. El porcentaje de saturación del oxígeno en la sangre arterial se disminuye en los pacientes con COPD comparados con los individuos sanos, mientras que la saturación de sangre venosa en el oxígeno se incrementa en los pacientes con COPD comparados con los individuos sanos. Una disminución en el porcentaje de O₂ en la sangre venosa por lo tanto es un indicador importante de una respuesta favorable en el tratamiento de la enfermedad (ver O'Connor y colaboradores Respiration 2011; 81:18–25). Se puede observar que los anticuerpos anti-TLR3 disminuyeron el porcentaje de O₂ sustancialmente en sangre venosa, aunque tanto como el roflumilast. Los anticuerpos anti-TLR3 por lo tanto son efectivos en tratar COPD. En la práctica médica, el análisis de gas de sangre arterial (ABG) se utiliza tanto en el ajuste agudo y para evaluar el estado del intercambio de gas del paciente durante periodos de estabilidad clínica. El análisis de gas de sangre, incluyendo el análisis ABG por lo tanto puede ser una herramienta particularmente útil para evaluar si los pacientes son adecuados para el tratamiento con anticuerpos anti-TLR3 y para evaluar o monitorear si el tratamiento con los anticuerpos anti-TLR3 es efectivo, durante una fase aguda o una fase de estabilidad clínica.

40 La Figura 5C muestra la IL17A en el fluido BAL (BALF). Los anticuerpos anti-TLR3 disminuyeron IL17A (pg/ml) sustancialmente, y tanto como el roflumilast. La Figura 5D muestra IP-10 en BALF. Los anticuerpos anti-TLR3 disminuyeron IP-10 (pg/ml) sustancialmente.

B. Estudio de combinación de fármaco

45 Cuatro grupos de ratones se trataron como sigue:

- 1 grupo de ratones con un vehículo (PBS, i.p., dos veces a la semana).

50 - 1 grupo de ratones con la administración del anticuerpo TLR3 28G7 anti-ratón (i.p., 500µg/por ratón, dos veces a la semana).

- 1 grupo de ratones con el roflumilast de control positivo (aprobado como Daxas^{MR}; antagonista de PDE-4) (3 mg/kg, oral, cinco veces a la semana).

55 - 1 grupo de ratones con tanto roflumilast como el anticuerpo 28G7, cada agente de acuerdo con el programa utilizado como un solo agente.

Todos los ratones se trataron con Elastina y LPS (i.n.), para inducir COPD y se sacrificaron como en el Estudio A.

60 Los infiltrados celulares en las vías aéreas se midieron por el análisis del fluido del lavado broncoalveolar (BAL) por el conteo de células diferenciales en el estudio A.

65 La Figura 5E muestra los conteos de células diferenciales BAL para macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Los anticuerpos anti-TLR3 disminuyen en gran medida la infiltración de neutrófilos en las vías aéreas, y se observó también disminución en los macrófagos y linfocitos. El COPD es mediado principalmente por neutrófilos antes que macrófagos o eosinófilos (ni linfocitos, utilizados en la presente como control). El roflumilast también provocó

infiltración disminuida de neutrófilos en las vías aéreas, junto con disminuciones en los macrófagos. De manera interesante, la combinación de anticuerpos anti-TLR3 y roflumilast provocó infiltración disminuida de neutrófilos en las vías aéreas sustancialmente a nivel observado en los ratones de tipo silvestre, una disminución muy por aquella que se observó por cualquier agente solo.

EJEMPLO 12 – MODELO DE EFICACIA IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DE SEPSIS - LIGADURA Y PUNCIÓN CECAL (CLP) – AJUSTE CURATIVO

Brevemente, 30 ratones se operaron: la cirugía consiste en ligadura y punción cecal. Por esta vía el contenido del lumen cecal se extrae de la cavidad abdominal conduciéndola a la peritonitis y en consecuencia a un choque séptico. El CLP es de grado leve, por ejemplo, la ligadura se lleva a cabo aproximadamente en la mitad del ciego.

Los ratones se trataron con 28G7 (100µg/ratón, ip), un anticuerpo de control sin especificidad TLR3 (“control”, 100µg/ratón, ip) o el PBS (300µl/ratón, ip) 6 horas y 24 horas después de la operación. La supervivencia se evaluó en las horas 24, 28, 32, 48, 52, 56, 72, 76, 80, 96, 100, 104, 120, 124, 128, 144, 148, 152, 168, 172, 176, 192, 196, 200, 216, 220, 224, 240, 244, 248, 264, 270, 274, 288, 292, 296, 312, 316, 320 y 336. Después de 336 horas, los ratones que habían sobrevivido habían eliminado la infección de fase aguda. El experimento se detuvo y los ratones se sacrificaron.

La Figura 6 muestra los resultados del experimento. El grupo tratado con 28G7 tuvo un 80% de supervivencia mientras que el grupo no tratado experimentó un 40% de supervivencia. Estos resultados muestran que los anticuerpos TLR3 son eficientes para el tratamiento de ratones en un modelo de ratón CLP. En este modelo agudo, los ratones experimentan infección aguda, imitando el choque séptico. Los ratones que sobreviven han eliminado eficientemente la infección aguda. Por lo tanto, los anticuerpos anti-TLR3 son agentes adecuados para tratar a un paciente que experimenta una infección aguda grave tal como una SIRS, una sepsis, una sepsis grave, o choque séptico.

EJEMPLO 13 – PRODUCCIÓN DE IP-10 IN VITRO POR LA PBMCs DONADORES EN RESPUESTA A COMBINACIONES DE ARNDs Y FÁRMACOS

La producción de IP-10 se evaluó en donadores humanos en respuesta a pIC. PBMC reciente se aisló de sangre entera de donadores y se incubó en presencia de 0, 10 o 50 µg/ml de mAbs TLR3 anti-humano y un intervalo de dosis de dexametasona (0.2, 2 y 20 µg/ml) o Humira^{MR} (1, 0.1, 0.01 µg/ml). Las células se incubaron 30 minutos a 37°C antes de la adición de 30 µg/ml poli(I:C). Las células se incubaron durante 24 horas adicionales a 37°C. El sobrenadante luego se recolectó para cuantificar la producción IP10 por el ELISA.

Los resultados de las combinaciones de fármacos con mAbs TLR3 anti-humano en combinación con dexametasona o Humira^{MR} se muestran en las Figuras 7A y 7B respectivamente. Los anticuerpos reducen cada uno sustancialmente la producción de IP-10 en respuesta a poliIC y los anticuerpos reducen IP-10 aún más cuando se combina con dexametasona o Humira^{MR}. Los anticuerpos anti-TLR3 por lo tanto pueden proporcionar un efecto adicional cuando se utilizan en combinación con dexametasona o Humira. En particular, en respuesta a PoliIC los anticuerpos potencian los efectos de la dexametasona, el tratamiento de referencia en la artritis reumatoide. Adicionalmente, los anticuerpos anti-TLR3 parecieron que potenciar los efectos del Humira a 0.1 y 1 µg/ml de concentraciones. Los anticuerpos anti-TLR3 pueden operar o modular una ruta de señalización que es complementaria a aquellas moduladas por la dexametasona o Humira^{MR}, sin efectos antagonísticos, y por lo tanto se pueden utilizar ventajosamente en combinación con tales fármacos.

Todos los encabezados y subencabezados se utilizan en la presente a efectos de conveniencia únicamente y no se debe interpretar que limitan la invención de ninguna manera. Cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus posibles variaciones está englobada por la invención a menos que se indique lo contrario en la presente o el contexto lo contradiga claramente. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado comprendido en el intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente, y cada valor separado se incorpora en la presente divulgación como si se hubiera enumerado individualmente en la presente. A menos que se afirme lo contrario, todos los valores exactos que se proporcionan en la presente son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, todos los valores ilustrativos exactos que se proporcionan en la presente con respecto a un factor o medición particular se pueden considerar que también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por “aproximadamente” cuando sea apropiado).

Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente o el contexto lo contradiga claramente.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente se pretende meramente que aclare en mayor medida la invención y no impone una limitación al alcance de la invención a menos que se indique lo contrario. Ningún lenguaje de la presente solicitud se debe interpretar que

indica que cualquiera de los elementos es esencial para llevar a la práctica la invención a menos que esto se afirme de manera explícita.

5 La citación e incorporación de documentos de tipo patente a la presente solicitud se realiza únicamente a efectos de conveniencia y no refleja ninguna opinión sobre la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de tales documentos de tipo patente. La descripción en la presente de cualquier aspecto o modalidad de la invención utilizando términos tales como referencia a un elemento o elementos se pretende que proporcione apoyo para un aspecto o modalidad similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se afirme lo contrario o el contexto lo contradiga claramente (por ejemplo, 10 una composición que se describe en la presente que comprende ese elemento particular se debería sobreentender que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se afirme lo contrario o el contexto lo contradiga claramente).

15 La invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia recitada en los aspectos o reivindicaciones presentados en la presente hasta el alcance máximo permitido por la ley pertinente.

20 Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en la presente solicitud se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad de la misma manera que si se indicara individual y específicamente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora a modo de referencia.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo ilustrativo y de ejemplo para conseguir su esclarecimiento, será evidente fácilmente para un experto en la técnica tras la lectura de esta invención que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones a ella sin alejarse de la naturaleza o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INNATE PHARMA

<120> AGENTES DE LIGACIÓN A TLR3

<130> TLR3-4

<150> US 61/653,652

<151> 31-05-2012

<150> US 61/670,289

<151> 11-07-2012

<150> US 61/679,923

<151> 08-06-2016

<160> 122

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 900

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 695 151 T3

Lys Gln Lys Asn Leu Ile Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Thr Lys Leu Gly Thr Gln Val Gln Leu Glu Asn Leu Gln Glu Leu
 165 170 175
 Leu Leu Ser Asn Asn Lys Ile Gln Ala Leu Lys Ser Glu Glu Leu Asp
 180 185 190
 Ile Phe Ala Asn Ser Ser Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Ser Asn Gln
 195 200 205
 Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe
 210 215 220
 Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
 225 230 235 240
 Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser
 245 250 255
 Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys
 260 265 270
 Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val
 275 280 285
 Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe
 290 295 300
 Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly
 305 310 315 320
 Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln
 325 330 335
 Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln
 340 345 350
 Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro
 355 360 365
 Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu
 370 375 380
 Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr
 385 390 395 400

ES 2 695 151 T3

Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys
 405 410 415
 Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His
 420 425 430
 Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr
 435 440 445
 Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser
 450 455 460
 Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro
 465 470 475 480
 Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp
 485 490 495
 Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp
 500 505 510
 Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
 515 520 525
 Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg
 530 535 540
 Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
 565 570 575
 Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp
 580 585 590
 Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn
 595 600 605
 Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 610 615 620
 Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu
 625 630 635 640
 Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp

ES 2 695 151 T3

645										650					655				
Phe	Val	Asn	Trp	Ile	Asn	Glu	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Pro	Glu	Leu	Ser				
			660				665						670						
Ser	His	Tyr	Leu	Cys	Asn	Thr	Pro	Pro	His	Tyr	His	Gly	Phe	Pro	Val				
			675				680				685								
Arg	Leu	Phe	Asp	Thr	Ser	Ser	Cys	Lys	Asp	Ser	Ala	Pro	Phe	Glu	Leu				
			690				695				700								
Phe	Phe	Met	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Val				
			705				710				715			720					
Leu	Leu	Ile	His	Phe	Glu	Gly	Trp	Arg	Ile	Ser	Phe	Tyr	Trp	Asn	Val				
			725							730				735					
Ser	Val	His	Arg	Val	Leu	Gly	Phe	Lys	Glu	Ile	Asp	Arg	Gln	Thr	Glu				
			740				745						750						
Gln	Phe	Glu	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Ile	Ile	His	Ala	Tyr	Lys	Asp	Lys	Asp				
			755				760						765						
Trp	Val	Trp	Glu	His	Phe	Ser	Ser	Met	Glu	Lys	Glu	Asp	Gln	Ser	Leu				
			770				775						780						
Lys	Phe	Cys	Leu	Glu	Glu	Arg	Asp	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Phe	Glu	Leu				
			785				790			795						800			
Glu	Ala	Ile	Val	Asn	Ser	Ile	Lys	Arg	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Phe	Val				
			805				810						815						
Ile	Thr	His	His	Leu	Leu	Lys	Asp	Pro	Leu	Cys	Lys	Arg	Phe	Lys	Val				
			820				825						830						
His	His	Ala	Val	Gln	Gln	Ala	Ile	Glu	Gln	Asn	Leu	Asp	Ser	Ile	Ile				
			835				840						845						
Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	Tyr	Lys	Leu	Asn	His	Ala	Leu				
			850				855						860						
Cys	Leu	Arg	Arg	Gly	Met	Phe	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Leu	Asn	Trp	Pro				
			865				870			875						880			
Val	Gln	Lys	Glu	Arg	Ile	Gly	Ala	Phe	Arg	His	Lys	Leu	Gln	Val	Ala				
			885				890						895						
Leu	Gly	Ser	Lys																
			900																
<210> 2																			
<211> 904																			
<212> PRT																			
<213> Macaca fascicularis																			

ES 2 695 151 T3

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

ES 2 695 151 T3

Ile	Lys	Glu	Phe	Ser	Pro	Gly	Cys	Phe	His	Ala	Ile	Gly	Arg	Leu	Leu	210	215	220
Gly	Leu	Phe	Leu	Asn	Asn	Val	Gln	Leu	Gly	Pro	Arg	Leu	Thr	Glu	Lys	225	230	235
Leu	Cys	Leu	Glu	Leu	Ala	Asn	Thr	Ser	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	245	250	255
Asn	Ser	Gln	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Asn	Thr	Thr	Phe	Leu	Gly	Leu	Lys	260	265	270
Trp	Thr	Asn	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Asn	Leu	Asn	Val	275	280	285
Ile	Gly	Asn	Asp	Ser	Phe	Val	Trp	Leu	Pro	His	Leu	Glu	Tyr	Phe	Phe	290	295	300
Leu	Glu	Tyr	Asn	Asn	Ile	Gln	His	Leu	Leu	Ser	His	Ser	Leu	His	Gly	305	310	315
Leu	Phe	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Asn	Leu	Lys	Arg	Ser	Phe	Thr	Lys	Gln	325	330	335
Ser	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Ile	Asp	Asp	Phe	Ser	Phe	Arg	340	345	350
Trp	Leu	Thr	Cys	Leu	Glu	His	Leu	Asn	Met	Glu	Asp	Asn	Asp	Ile	Ser	355	360	365
Gly	Ile	Lys	Ser	Asn	Met	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Leu	Lys	Tyr	Leu	370	375	380
Ser	Leu	Ser	Asn	Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Thr	Asn	Glu	Thr	385	390	395
Phe	Val	Ser	Leu	Ala	His	Ser	Pro	Leu	His	Ile	Leu	Asn	Leu	Thr	Lys	405	410	415
Asn	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Ser	Gly	Ala	Phe	Ser	Trp	Leu	Gly	His	420	425	430
Leu	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Gly	Leu	Asn	Glu	Ile	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	435	440	445
Gly	Gln	Glu	Trp	Ser	Gly	Leu	Glu	Asn	Ile	Phe	Glu	Ile	Tyr	Leu	Ser	450	455	460

ES 2 695 151 T3

Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Lys Asn Ser Phe Ala Leu Val Arg
 465 470 475 480
 Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp
 485 490 495
 Cys Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Gly Asn Leu Thr Ile Leu Asp
 500 505 510
 Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
 515 520 525
 Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg
 530 535 540
 Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Val Tyr Phe Leu Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
 565 570 575
 Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Ser Glu Leu Lys Ile Ile Asp
 580 585 590
 Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asp Asn
 595 600 605
 Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 610 615 620
 Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Ser Asn Leu
 625 630 635 640
 Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp
 645 650 655
 Phe Val Asn Trp Ile Asn Lys Thr His Ala Asn Ile Pro Glu Leu Ser
 660 665 670
 Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val
 675 680 685
 Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu Leu
 690 695 700
 Phe Phe Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Leu Ile Phe Ile Phe Val Val
 705 710 715 720

ES 2 695 151 T3

Leu Leu Ile His Phe Glu Gly Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn Val
725 730 735

Ser Val His Arg Val Leu Gly Phe Lys Glu Ile Asp Arg Gln Thr Glu
740 745 750

Gln Phe Glu Tyr Ala Ala Tyr Ile Ile His Ala His Lys Asp Lys Asp
755 760 765

Trp Val Trp Glu His Phe Ser Ser Met Glu Lys Glu Asp Gln Ser Leu
770 775 780

Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Phe Glu Leu
785 790 795 800

Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe Ile
805 810 815

Ile Thr His His Leu Leu Lys Asp Pro Leu Cys Lys Arg Phe Lys Val
820 825 830

His His Ala Val Gln Gln Ala Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile
835 840 845

Leu Ile Phe Leu Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala Leu
850 855 860

Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp Pro
865 870 875 880

Val Gln Lys Glu Arg Ile Gly Ala Phe His His Lys Leu Gln Val Ala
885 890 895

Leu Gly Ser Lys Asn Ser Val His
900

<210> 3

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

ES 2 695 151 T3

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

<210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile His Asp Asp
20 25 30

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

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asn Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
1 5

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

<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met Asn
1 5 10

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

<400> 8
Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9
Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Gly Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

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

<400> 11
Ile Thr Ser Thr Asp Ile His Asp Asp Ile Asn
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 12
Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

ES 2 695 151 T3

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 14

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Asn Ile Arg Tyr Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Met Gln Leu Ser Gln Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Met Gly Glu Phe Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 15

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

Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser Asn Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Arg Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Asn Tyr Lys Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16
 Tyr Thr Tyr Met His
 1 5

<210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 17
 Gly Tyr Asn Ile Arg Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 18
 Gly Tyr Asn Ile Arg Tyr Thr Tyr Met His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 19
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Ser Ile Tyr Gly Glu Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Thr

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 20
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Ser Ile
 1 5 10

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 21
 Gly Glu Phe Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 22
 Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser Asn Asp Leu Ala
 1 5 10

ES 2 695 151 T3

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 23
 Ala Ala Ser Arg Leu Gln Asp
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 24
 Gln Gln Asn Tyr Lys Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 25
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Tyr Gly Ala Glu Leu Gly Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Asn Ile Trp Ser Thr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Gln Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Met Gly Asp His Gly Gly Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 26

ES 2 695 151 T3

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

Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Asn Arg Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 27

Ser Thr Tyr Ile Tyr
1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 28

Gly Tyr Asn Ile Trp Ser
1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 29

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

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 30

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

```

<400> 31
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile
1           5                      10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 32
Gly Asp His Gly Gly Tyr Val Met Asp Ala
1           5                      10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 33
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1           5                      10

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 34
Ala Ala Asn Arg Leu Glu Asp
1           5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 35
Leu Gln Gly Ser Glu Phe Pro Tyr Thr
1           5

<210> 36
<211> 118
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 36

```

ES 2 695 151 T3

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

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

Tyr Met His Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Asp Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 37

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Ala Ala Ser Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Met Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Glu Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Val Lys Tyr Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 38

Ser Asn Tyr Met His
1 5

<210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 39
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 1 5

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 40
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn Tyr Met His
 1 5 10

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 41
 Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Asn
 1 5 10 15

Gly

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 42
 Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn
 1 5 10

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 43
 Ser Asp Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Phe
 1 5

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 44
 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
 1 5 10

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 45
 Ala Ala Ser Arg Leu Gln Asp
 1 5

ES 2 695 151 T3

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 46
 Gln Gln Gly Val Lys Tyr Pro Asn Thr
 1 5

<210> 47
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 47
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Tyr Gly Ala Glu Leu Gly Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Asn Ile Thr Tyr Thr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Gly Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Gln Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Met Gly Glu Phe Asp Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Val Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn Asp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

ES 2 695 151 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Arg Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Lys Tyr Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 49

Tyr Thr Tyr Met His
1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 50

Gly Tyr Asn Ile Thr Tyr
1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 51

Gly Tyr Asn Ile Thr Tyr Thr Tyr Met His
1 5 10

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 52

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Gly Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 53

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile
1 5 10

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 54

Gly Glu Phe Asp Tyr Phe Asp His
1 5

<210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 55
 Leu Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn Asp Leu Ala
 1 5 10

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 56
 Ala Ala Ser Arg Leu Glu Asp
 1 5

<210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 57
 Gln Gln Ser Tyr Lys Tyr Pro Val Thr
 1 5

<210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 58
 Xaa Ala Ser Glu Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala
 1 5 10

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 59
Ala Ala Xaa Arg Leu Xaa Asp
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 60
Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (4)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 61
Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa
 1 5

<210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 62
Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 63
Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly
 1 5

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> rattus norvegicus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 64
Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp
 1 5

<210> 65
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 65
 gaaaatataa aataatccct ttgtcgagca gaagaattta atcacattag 50

<210> 66
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 66
 ctaatgtgat taaattcttc tgctcgacaa agggattatt ttaattttc 50

<210> 67
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 67
 caatgagcta tctcaacttt ctctgaaaac cttgccttc tgcac 45

<210> 68
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 68
 gtgcagaagg caaagggttt acgagaaagt tgagatagct cattg 45

<210> 69
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 69
 caagagcttc tattatcaaa caatgagatt caagcgctaa aaagtgaag 49

<210> 70
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 70
 cttcactttt tagcgcttga atctcattgt ttgataatag aagctcttg 49

<210> 71
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 71
 gaagaactgg atatctttgc cgcttcatct ttaaaaaaat tagagttg 48

<210> 72
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 72
 caactctaatt tttttaag atgaagcggc aaagatatcc agttcttc 48

<210> 73
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 73
 ggaactcagg ttcagctggc caatctccaa gagcttctat tatca 45

<210> 74
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

 <400> 74
 tgataataga agctcttgga gattggccag ctgaacctga gttcc 45

 <210> 75
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

 <400> 75
 gggtatatga gtcaactca ggtggctg 28

 <210> 76
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

 <400> 76
 ttgactcata taccgatga tctacc 27

 <210> 77
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

 <400> 77
 taattgttg agtgattat gggaagg 28

 <210> 78
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

 <400> 78
 caactccaac aattaccagc cgccaactc 30

 <210> 79
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

 <400> 79
 ctccagttgt gagatggagt taaatcctac atccaagc 38

<210> 80
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 80
 atctcacaac tggagccaga attgtgccag aaacttc 37

<210> 81
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 81
 taacaaggga agtatctggc acaattctgg ctcc 34

<210> 82
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 82
 atacttcctt tgttaaaagt ttgaacctc c 31

<210> 83
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 83
 gaagacaaag gttgatcag aaagtgaga tagctc 36

<210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 84
 caaaccttgg tcttctgcac gaatttgact 30

<210> 85
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 85
 gtggattgag ttggacatga gatgg 25

<210> 86
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 86
 tccaactcaa tccacaaaat taaaaataat ccc 33

<210> 87
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 87
 attagattta attttctgga ttgagttgg 29

<210> 88
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 88
 aaaattaaat ctaatccctt tgtcaagcag 30

<210> 89
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 89
 ctgattctta aagggattat ttttaatttt c 31

<210> 90
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 90
 ccccttaaga atcagaagaa tttaatcaca ttag 34

<210> 91
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 91
 tgtgattaaa ttcgcctgct tgacaaaggg att 33

<210> 92
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 92
 gcgaatttaa tcacattaga tctg 24

<210> 93
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 93
 agttcctaag gctgtagatg acaagcc 27

<210> 94
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 94
 acagcattag gaactcaggt tcag 24

<210> 95
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 95
 ttccagctga accccagttc ctaattttgt ag 32

<210> 96
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 96
 ggggttcagc tggaaaatct cc 22

<210> 97
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 97
 actcgttagc gctagaattt tattgttga taatag 36

<210> 98
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 98
 ctagcgctac gaagtgaaga actggatattc 30

<210> 99
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 99
 actttgtatc gctagaattt tattgtttga taatag 36

<210> 100
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 100
 ctagcgctac aaagtgaaga actggatattc 30

<210> 101
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 101
 attgccaaag atctccagtt cttcactttt tagcg 35

<210> 102
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 102
 gagatctttg gcaattcatc tttaaaaaa 30

<210> 103
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 103
 ctctttaagt ggattcgatg acaactct 28

<210> 104
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 104
 aatccactta aagagttttc tccag 25

<210> 105
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 105
 tcttccaatt gcctgaaaac accctggaga aaactc 36

<210> 106
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 106
 caggcaattg gaagattatt tgg 23

<210> 107
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 107
 tcttccaatt gtgtgaaaac accctggaga aaactc 36

<210> 108
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 108
 cacacaattg gaagattatt tgg 23

<210> 109
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 109
 aaggtgggga ttcagctgga cattgttcag 30

<210> 110
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 110
 ctgaatcccc accttacaga gaagctatgt ttg 33

<210> 111
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 111
 gtttgataat tccaacata gcttctctgt aagg 34

<210> 112
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 112
 tgggaattat caaacacaag cattcggaat ctg 33

<210> 113
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 113
 tgcaattgac tggattgagt tggacatgag atggag 36

<210> 114
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 114
 atccagtcaa ttgcaaataa tcccttgtc aagcag 36

<210> 115
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 115

aaggtaaaggc tatccctaac cctctcctcg gtctcgattc tacgaagtgc actgttagcc 60

atgaag 66

<210> 116
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 116
aagcgccgc ttagttatta ctgtgacat ggtag 35

<210> 117
<211> 106
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para hTLR3

<400> 117
aagctagcat gagacagact ttgccttgta tctacttttg ggggggcctt ttgccctttg 60

ggatgctgtg tgcacacctc accaccgga agcctatccc taaccc 106

<210> 118
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para hTLR3

<400> 118
aagcgccgc ttagttatta ctgtgacat ggtag 35

<210> 119
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 119
tagctcattg tgctggaggt tc 22

<210> 120
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 120
aaaaccttg ccttctgcac 20

<210> 121
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 121

acccaagctg gctagcatga gacagacttt gccttg 36

<210> 122

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para hTLR3 mutante

<400> 122

agcacagtgg cggccgctta gttattactg ttgacatgg 39

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que inhibe la señalización mediada por TLR3 en una célula que expresa TLR3, en donde el anticuerpo se liga a la superficie lateral sin glicano de la porción N-terminal del polipéptido TLR3, en donde dicho anticuerpo tiene una ligación reducida en más de un 40% a un polipéptido TLR3 mutante que comprende una mutación en los residuos 137 a 139 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1, respecto a la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1.
 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en el residuo 117 y 120 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1, respecto a la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1.
 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo tiene una ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en el residuo 112, 113 y 115 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1, respecto a la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1.
 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una ligación reducida a un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en el residuo 64 y 65 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1, respecto a la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1.
 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo compite con ARNs por la ligación a la porción N-terminal de un polipéptido TLR3 humano.
 6. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo no se liga sustancialmente a la superficie lateral que contiene glicano de la porción N-terminal del polipéptido TLR3.
 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo mantiene sustancialmente la ligación a (no tiene una reducción significativa en la ligación a) un polipéptido TLR3 que tiene una mutación en los residuos D116 y K145 del polipéptido TLR3 de SEQ ID NO: 1, respecto a la ligación entre el anticuerpo y un polipéptido TLR3 de tipo natural de SEQ ID NO: 1.
 8. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se liga específicamente a un polipéptido TLR3 humano e inhibe la señalización por el polipéptido TLR3 humano, en donde el anticuerpo comprende:
 - (i) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; y (b) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 4, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco de los aminoácidos en cualquiera de una o más de dichas CDR se pueden sustituir opcionalmente por un aminoácido diferente;
 - (ii) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 14; y (b) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco de los aminoácidos en cualquiera de una o más de dichas CDR se pueden sustituir opcionalmente por un aminoácido diferente;
 - (iii) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25; y (b) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 26, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco de los aminoácidos en cualquiera de una o más de dichas CDR se pueden sustituir opcionalmente por un aminoácido diferente;
 - (iv) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 36; y (b) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco de los aminoácidos en cualquiera de una o más de dichas CDR se pueden sustituir opcionalmente por un aminoácido diferente; o
 - (v) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 47; y (b) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos CDR 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 48, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco de los aminoácidos en cualquiera de una o más de dichas CDR se pueden sustituir opcionalmente por un aminoácido diferente,
- definiéndose las CDR según Kabat.

- 5 9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo compite para la ligación a un polipéptido TLR3 humano con el anticuerpo 11E1 que tiene una región variable de cadena pesada con SEQ.ID.NO.3 y una región variable de cadena ligera con SEQ.ID.NO.4, 31F6 que tiene una región variable cadena pesada con SEQ.ID.NO.14 y una región variable de cadena ligera con SEQ.ID.NO.15, 32C4 que tiene una región variable de cadena pesada con SEQ.ID.NO.25 y una región variable de cadena ligera con SEQ.ID.NO.26, 37B7 que tiene una región variable de cadena pesada con SEQ.ID.NO.36 y una región variable de cadena ligera con SEQ.ID.NO.37 o 7G11 que tiene una región variable de cadena pesada con SEQ.ID.NO.47 y una región variable de cadena ligera con SEQ.ID.48.
- 10 10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo es capaz de ser internalizado por una célula que expresa TLR3.
- 15 11. El anticuerpo de cualquiera las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo se conjuga o liga covalentemente a un resto tóxico.
12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario.
- 20 13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. La composición de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo está presente en una cantidad de entre aproximadamente 25 mg y 500 mg.

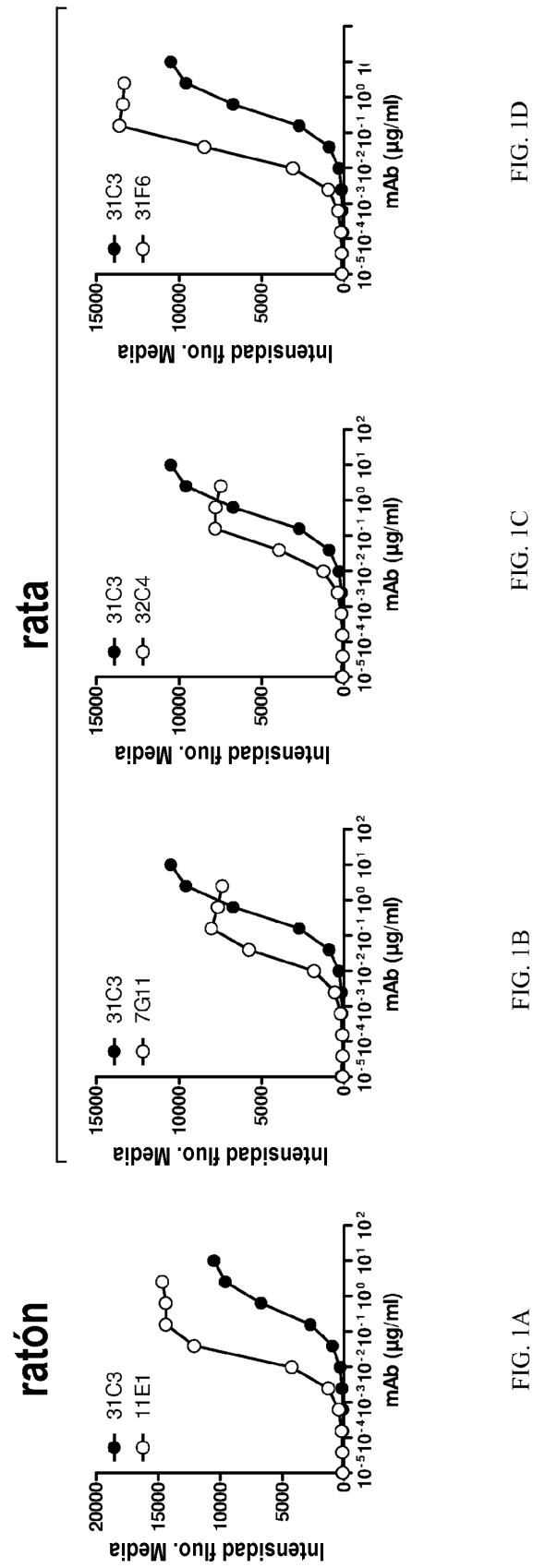


FIG. 1D

FIG. 1C

FIG. 1B

FIG. 1A

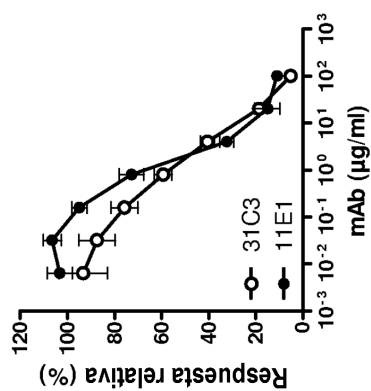


FIG. 2A

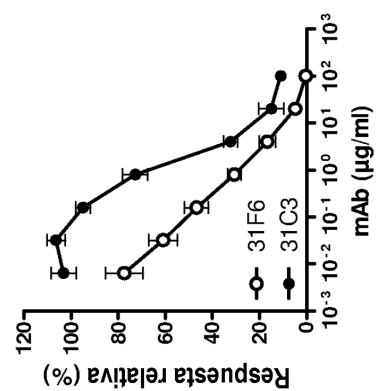


FIG. 2B

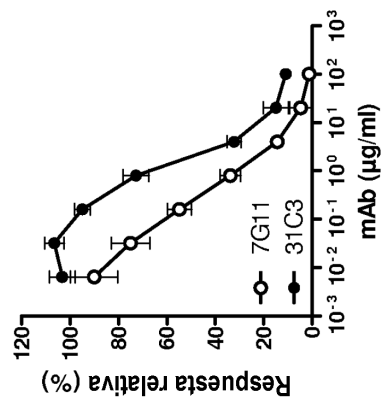


FIG. 2C

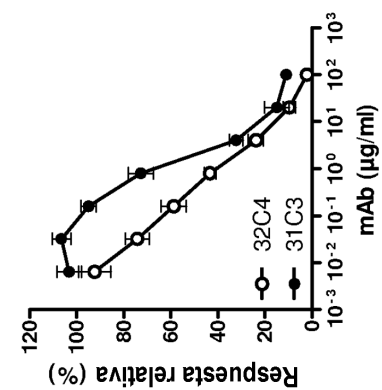


FIG. 2D

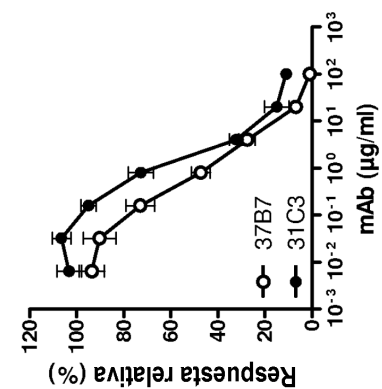
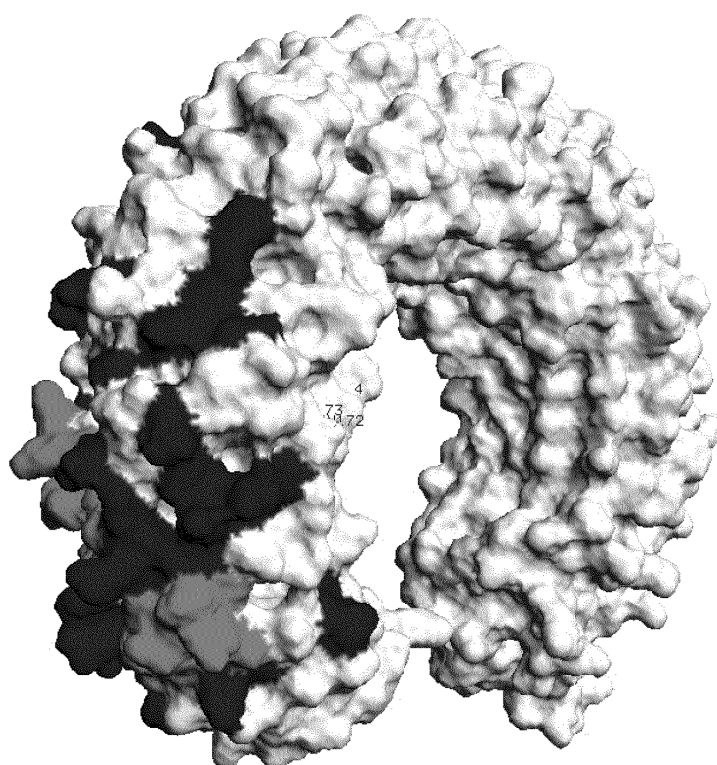
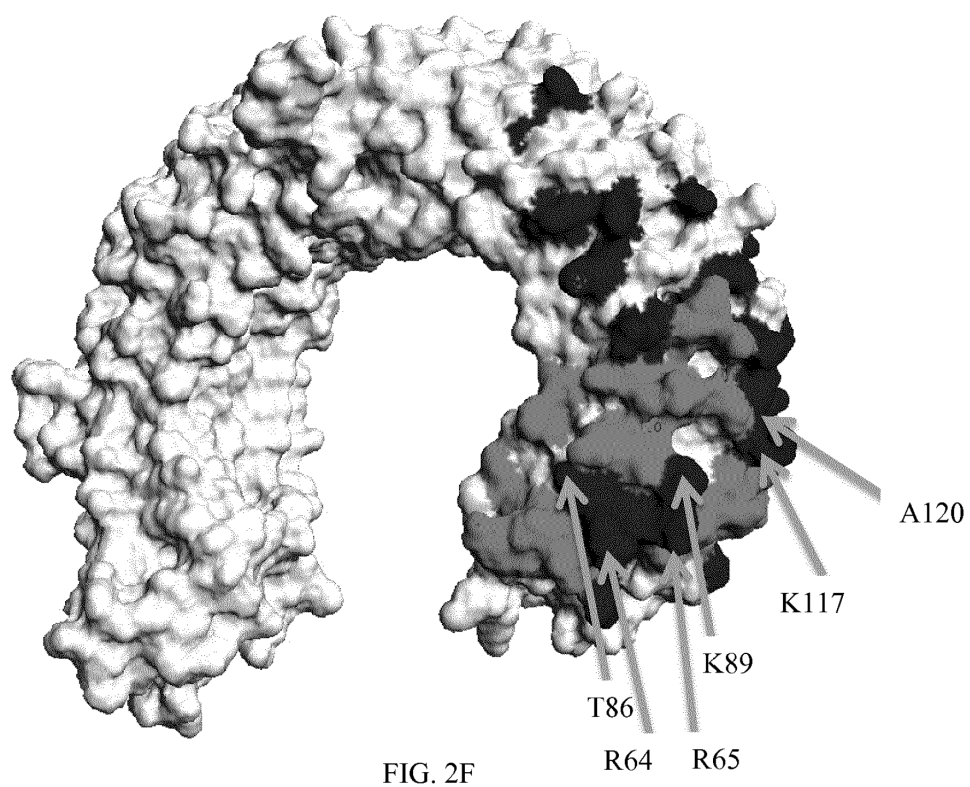


FIG. 2E



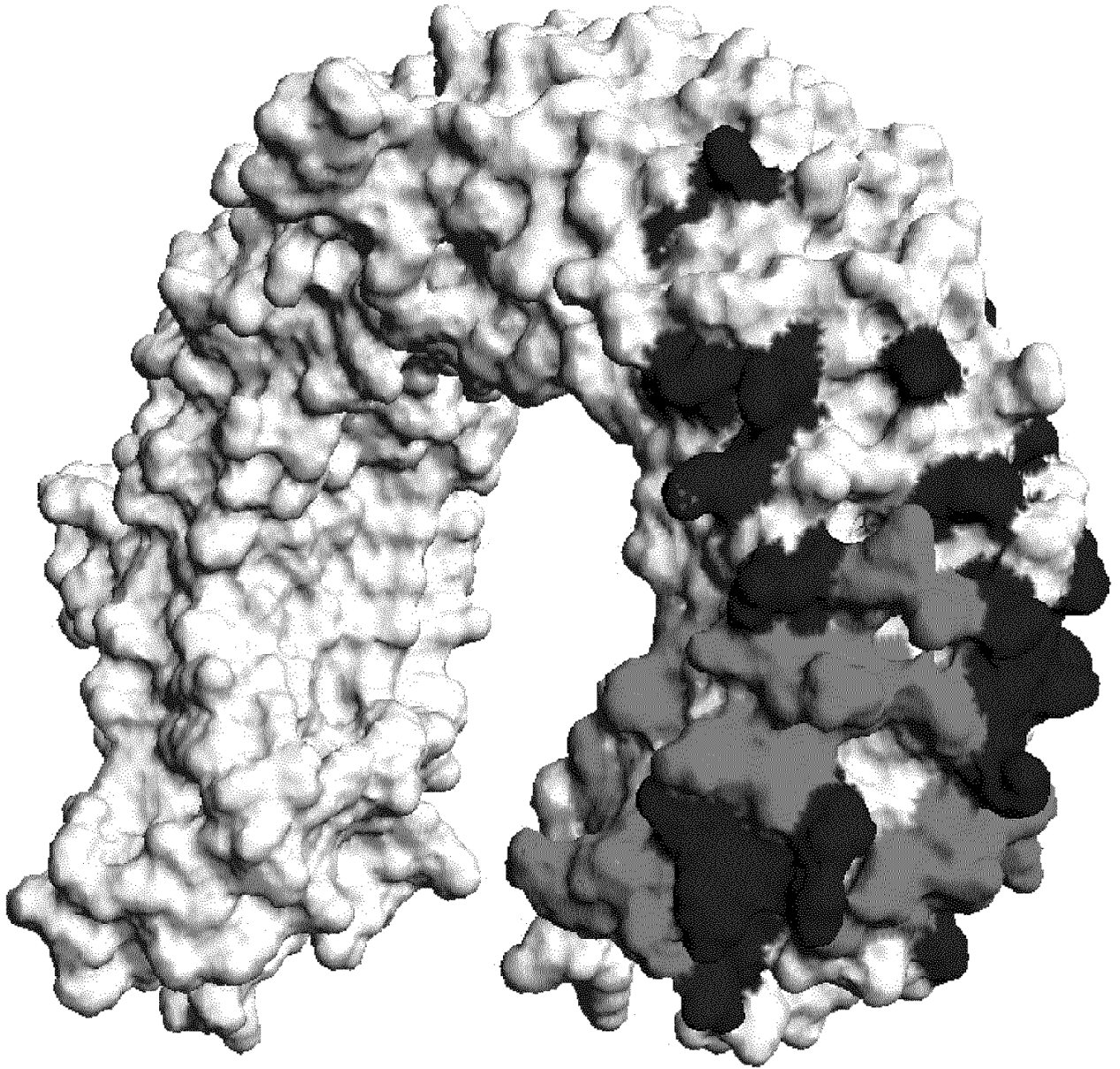


FIG. 2H

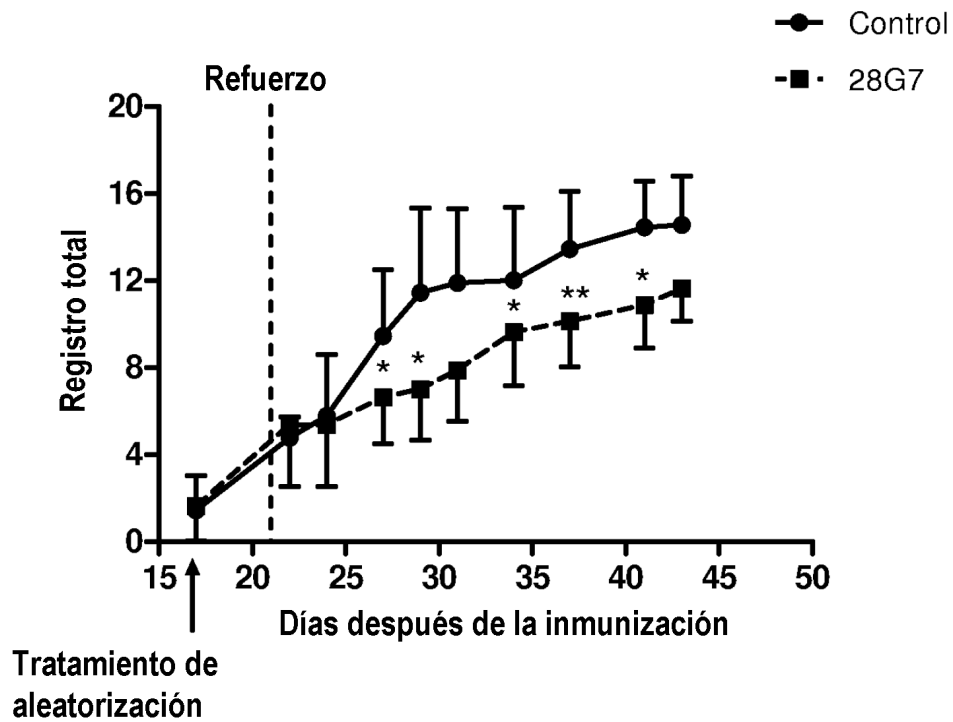


FIG. 3A

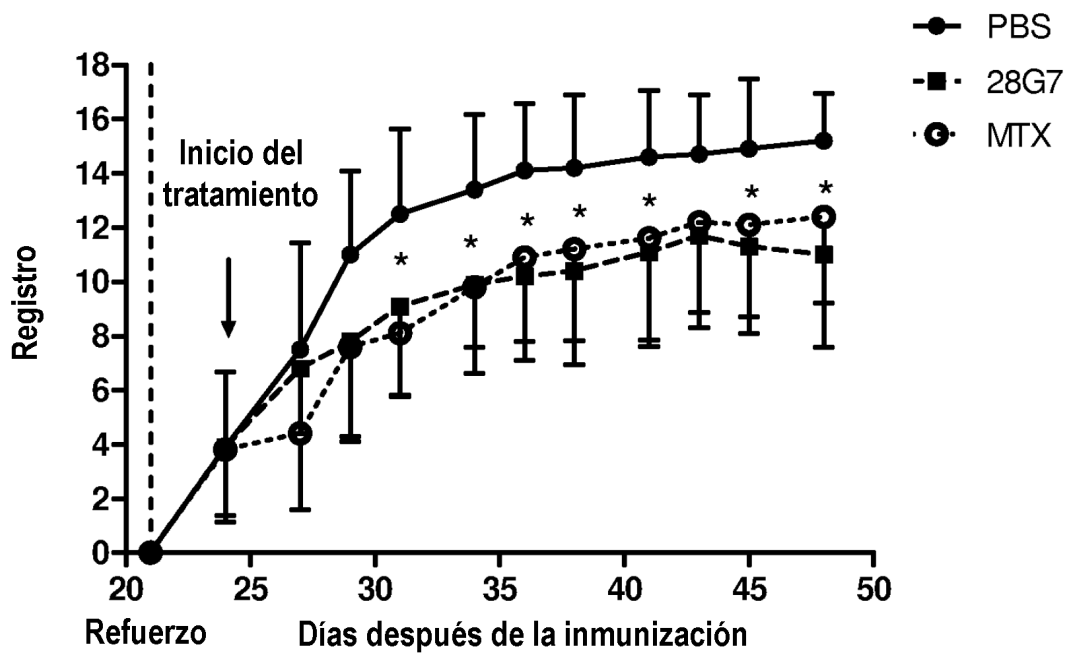


FIG. 3B

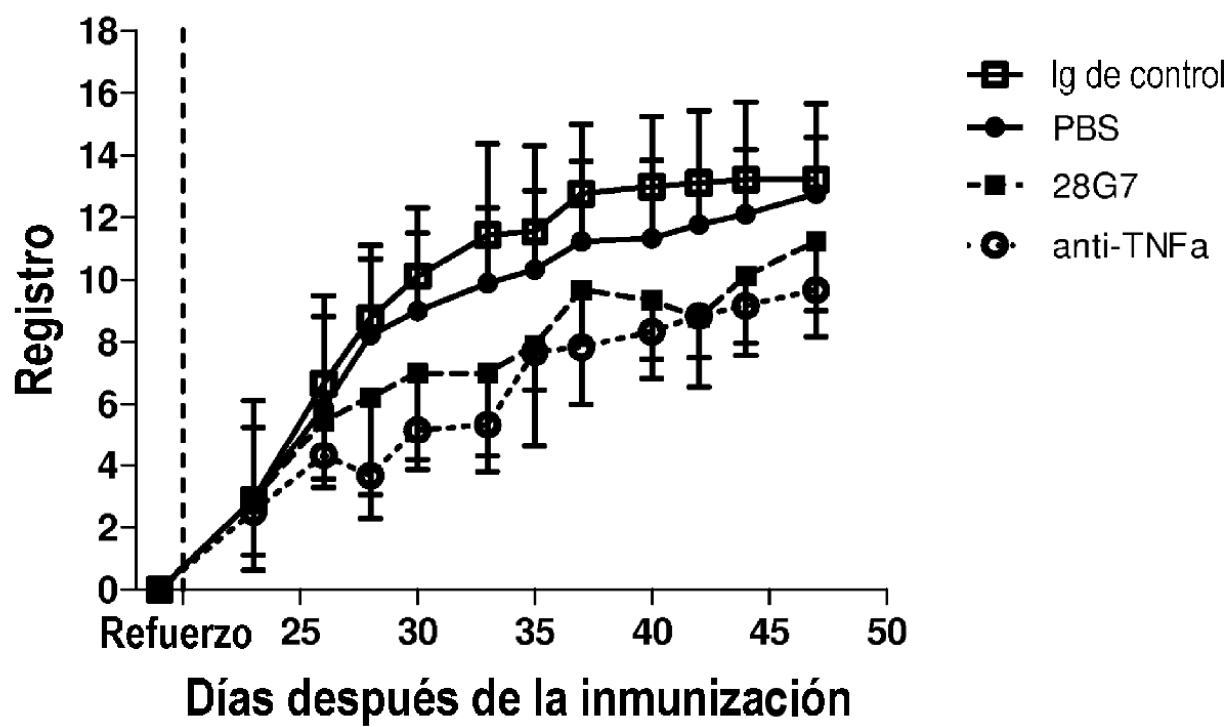


FIG. 3C

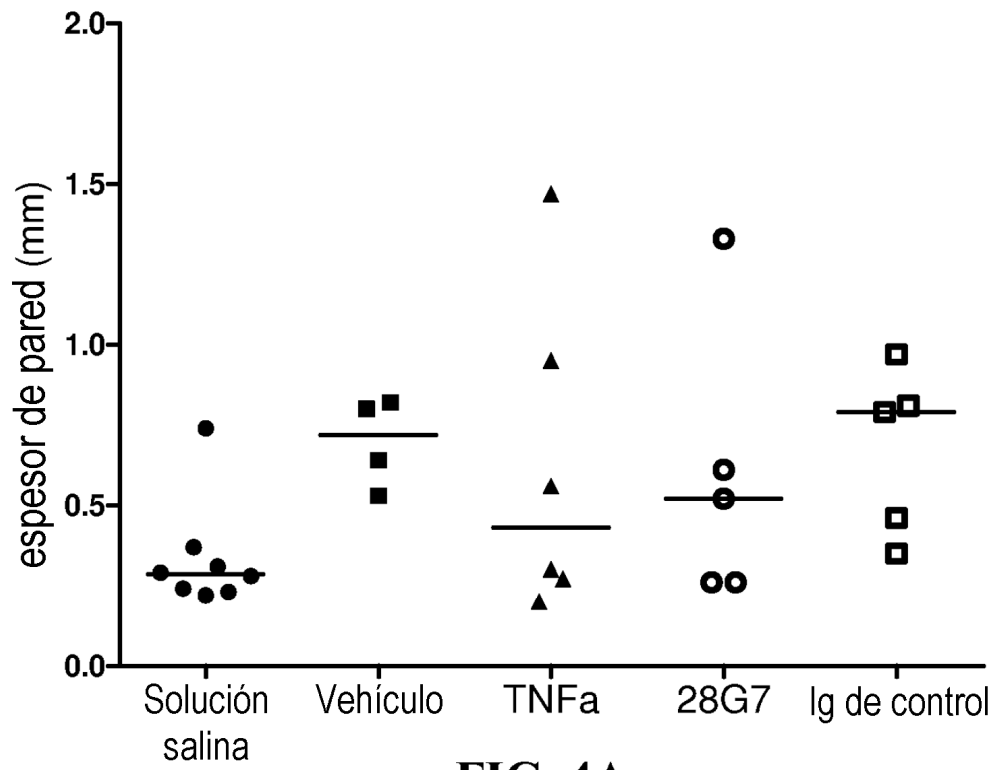


FIG. 4A

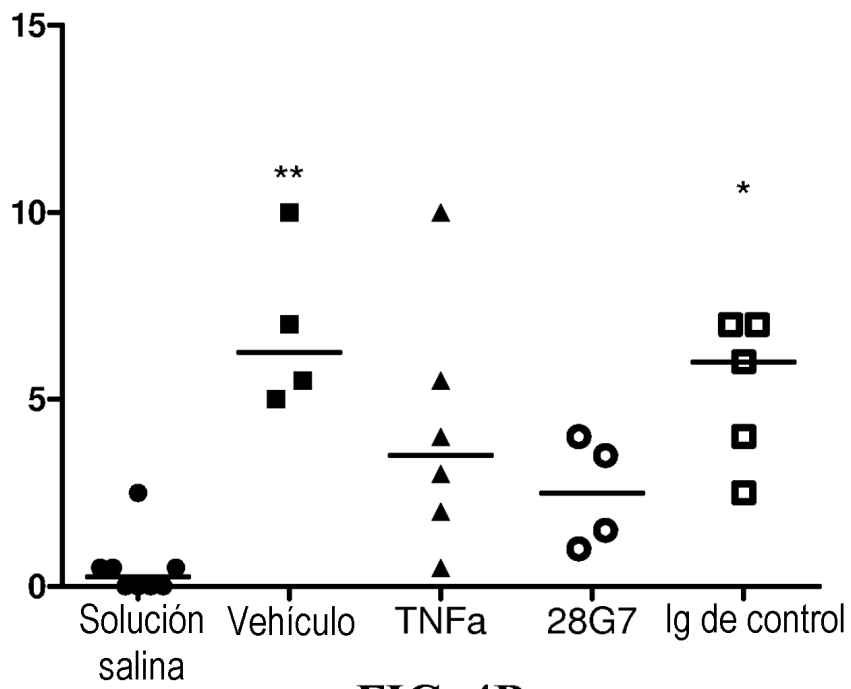


FIG. 4B

Conteos de células diferenciales en BAL

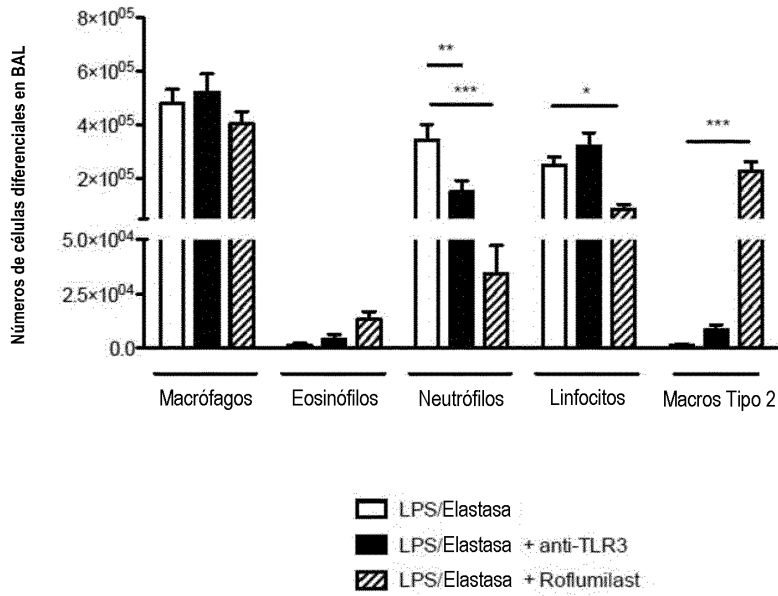


FIG. 5A

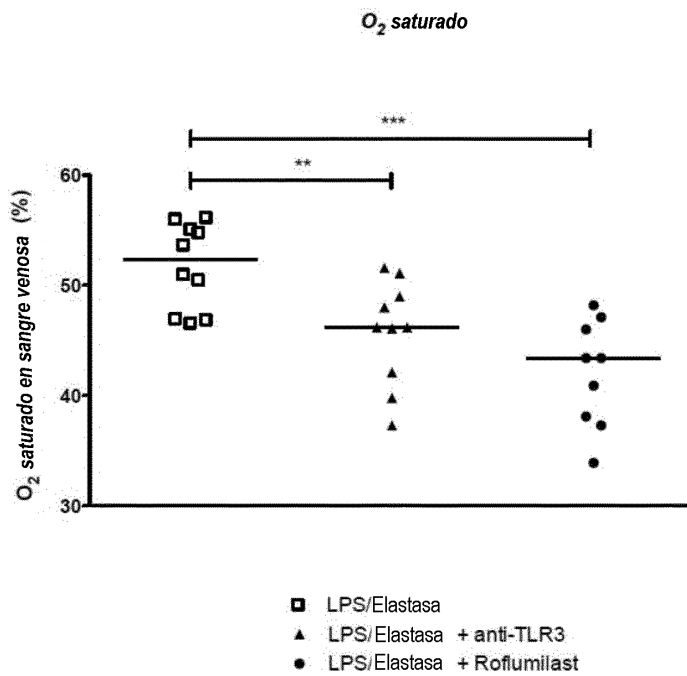


FIG. 5B

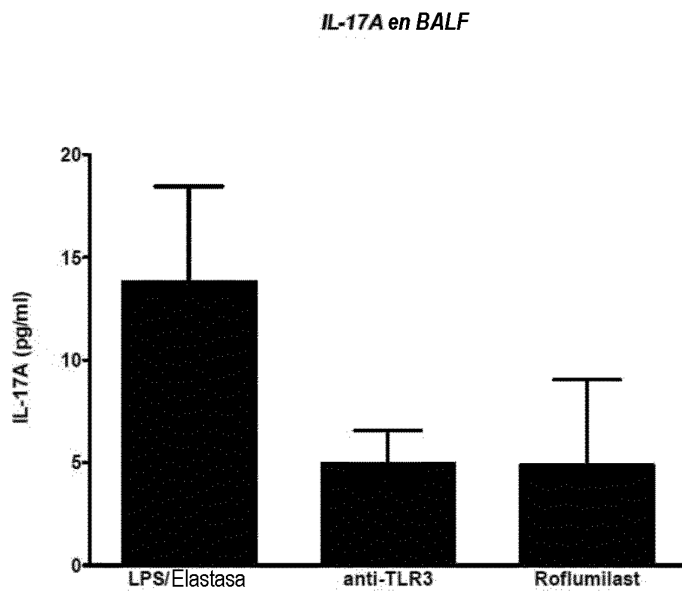


FIG. 5C

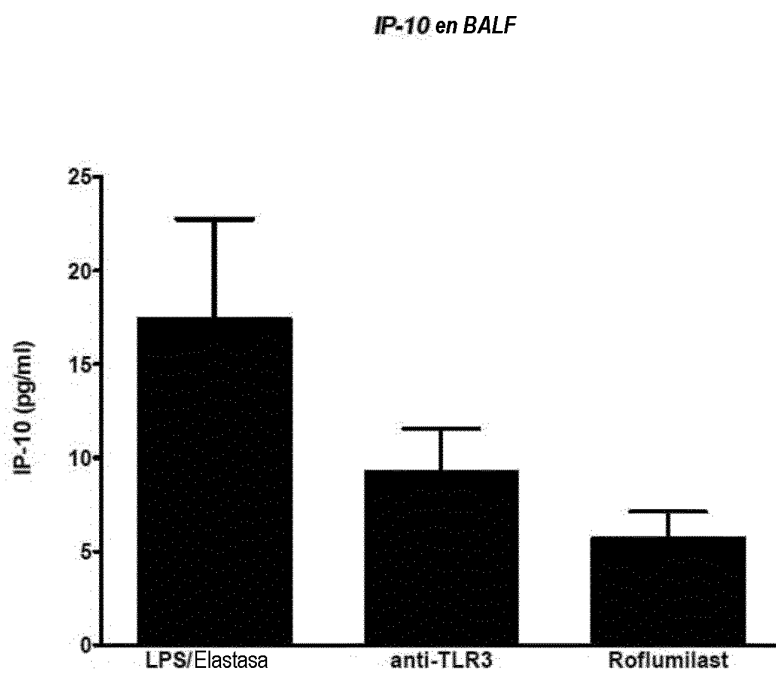


FIG. 5D

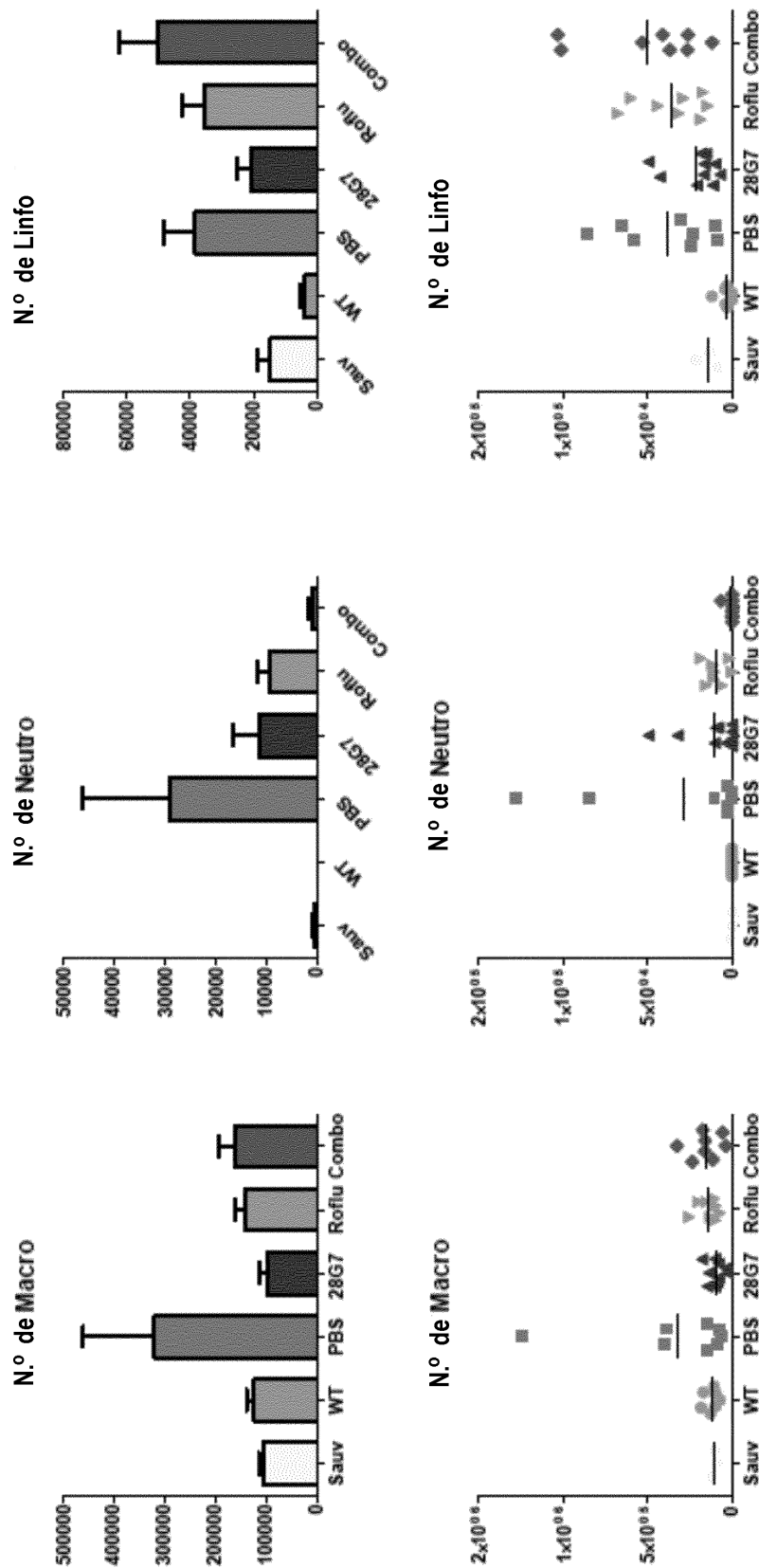


FIG. 5E

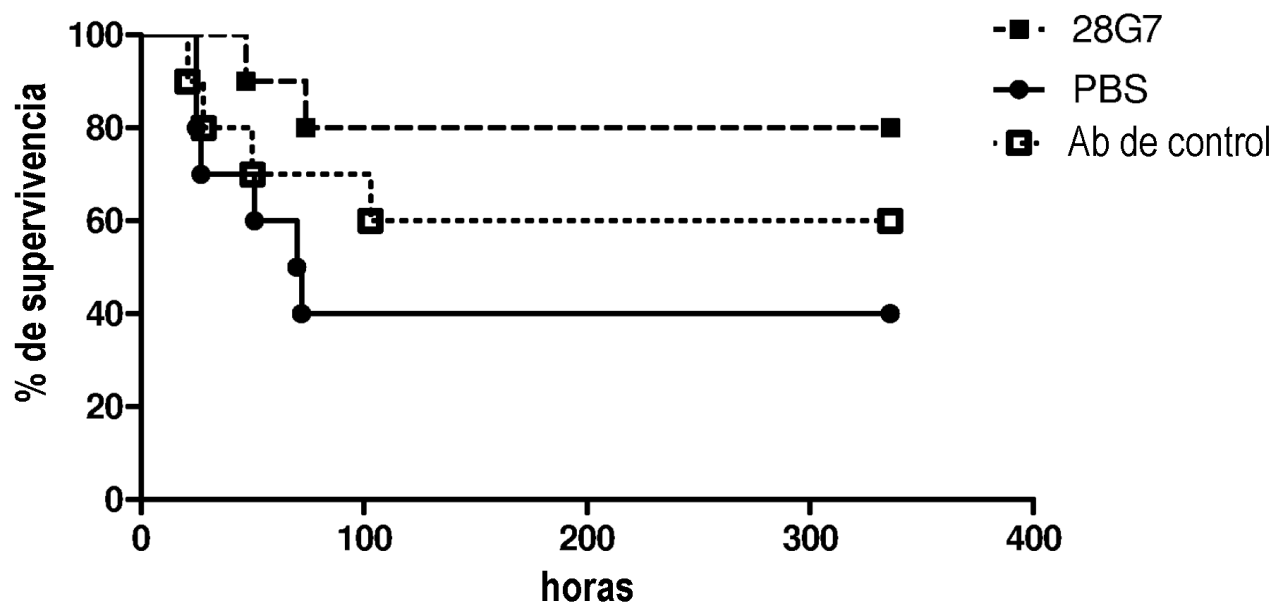


FIG. 6

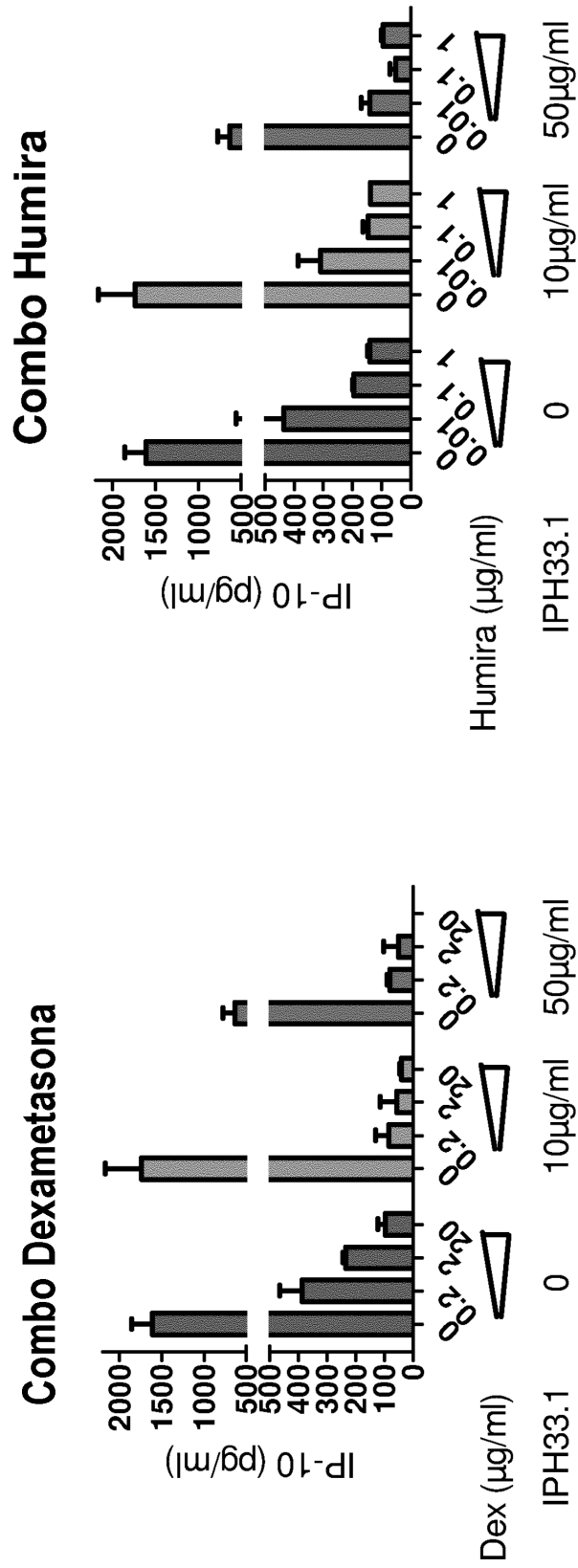


FIG. 7A

FIG. 7B