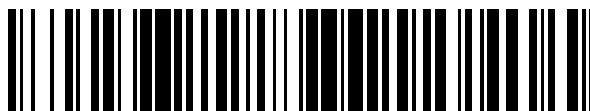


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 996**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015** **PCT/JP2015/055860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015** **WO15129858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015** **E 15754783 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 3112462**

54 Título: **Nuevo anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano**

30 Prioridad:

**28.02.2014 JP 2014038438**

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

**22.04.2019**

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)**  
**5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome**  
**Chuo-kuTokyo 103-8411, JP**

72 Inventor/es:

**TAKEUCHI, SATOSHI;**  
**SATO, MASAHIITO;**  
**SUZUKI, JOTAROU;**  
**SOGA, SHINJI;**  
**TAKASAKI, JUN;**  
**AOYAMA, KOJI y**  
**OKUYAMA, CHIE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 709 996 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

Nuevo anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y TLR4 humano.

**Antecedentes de la técnica**

- 10 El receptor tipo Toll 2 (TLR2, de sus siglas en inglés) y el receptor tipo Toll 4 (TLR4, de sus siglas en inglés) son proteínas transmembrana únicas que se expresan en un amplio espectro de células y tejidos que incluyen células inmunocompetentes tales como macrófagos y neutrófilos, células endoteliales vasculares y células intrínsecas renales tales como células epiteliales tubulares renales (Folia Biol (Praha)., 2005, Vol. 51, n.º 6, págs. 188-197). El
- 15 TLR2 forma un complejo con el TLR1 o TLR6, y reacciona con componentes bacterianos tales como peptidoglicanos o lipoproteínas. Mientras tanto, el TLR4 forma un complejo con una proteína del factor de diferenciación mieloide 2 (MD2, de sus siglas en inglés), una proteína CD14 o similar, y reacciona con componentes bacterianos tales como lipopolisacáridos tipificados por lipopolisacáridos (LPS). Además, estos receptores se activan al unirse a los patrones moleculares asociados al daño (DAMP, de sus siglas en inglés), que son un factor de daño tisular endógeno, y
- 20 transmiten señales a las células. La activación del TLR2 y el TLR4 induce la expresión de citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , de sus siglas en inglés) y la interleucina 6 (IL-6) y provoca una respuesta inflamatoria, por ejemplo, a través de la activación de un factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, de sus siglas en inglés) que es un factor de transcripción (Nat. Immunol., 2010, Vol. 11, n.º 5, págs. 373-384).
- 25 Se sabe que dicha activación mediada por el TLR2 y el TLR4 de diversas células está implicada en enfermedades inflamatorias inmunitarias tales como sepsis, insuficiencia renal aguda, enfermedad renal crónica, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, esclerodermia, pancreatitis aguda y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- 30 En asociación con la sepsis, se ha informado que animales genéticamente deficientes en TLR2 (ratones knock-out) en un modelo de infección por *Salmonella*, que es un modelo de sepsis, muestran una mejora en la tasa de supervivencia, los ratones deficientes en TLR4 en un modelo de infección por *Escherichia coli* muestran una mejora en la tasa de supervivencia, y los ratones con una doble deficiencia en TLR2 y TLR4 en cada modelo muestran una tasa de supervivencia significativamente mejorada en comparación con los ratones con una única deficiencia en TLR2 o TLR4 (J. Exp. Med., 2008, Vol. 205, págs. 1747-1754). Además, se ha informado que la tasa de
- 35 supervivencia no mejora con la administración de un anticuerpo anti-TLR2 (T2.5) o un anticuerpo anti-TLR4 (1A6) solo en los dos modelos anteriores, mientras que la tasa de supervivencia mejora con la administración combinada de ambos anticuerpos (J. Exp. Med., 2008, Vol. 205, págs. 1747-1754).
- 40 En asociación con la pancreatitis aguda, se ha informado de que los ratones deficientes en TLR4 en un modelo de pancreatitis inducida por taurocolato muestran disminución de la amilasa sanguínea, mieloperoxidasa pancreática y daño en tejido pancreático (Inflamm. Res., 2011, Vol. 60, págs. 1093-1098). Además, se ha informado de que el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en el páncreas aumenta en un modelo de pancreatitis inducida por caerleína (Pancreas, 2013, Vol. 42, págs. 114-122).
- 45 Como un anticuerpo que se une al TLR2 humano, se han informado un anticuerpo T2.5 monoclonal de ratón (Documento de patente 1), un anticuerpo 11G7 monoclonal de ratón (Documento de patente 2) y un anticuerpo OPN305 monoclonal humanizado (Documento de patente 3) de T2.5. Entre ellos, 11G7 inhibe las señales TLR2/TLR1 pero no inhibe las señales TLR2/TLR6, mientras que OPN305 se ha informado que inhibe ambas señales. Específicamente, se ha informado de que en experimentos que utilizan una célula THP-1 que es una célula
- 50 monocítica humana, OPN305 tiene una actividad neutralizante contra la estimulación de Pam3CSK4 (agonista de TLR2/TLR1) y la estimulación de FSL-1 (agonista de TLR2/TLR6), e inhibe la elevación de una concentración de citocinas inflamatorias en suero de ratón inducida por la administración de Pam3CSK4 (Documento de patente 3).
- 55 Como un anticuerpo que se une al TLR4 humano, se han informado un anticuerpo HTA125 monoclonal de ratón (Documento de patente 1), los anticuerpos 18H10, 16G7, 15C1 y 7E3 monoclonales de ratón (Documento de patente 4), un anticuerpo hu15C1 de 15C1 monoclonal humanizado (Documento de patente 5), y los anticuerpos 1A6 y 1E11.C2E3 monoclonales humanizados y similares descubiertos por mutaciones aleatorias en la región determinante de complementariedad de hu15C1 (Documento de Patente 6). Entre ellos, con respecto a los anticuerpos monoclonales de ratón, se ha demostrado que 15C1 tiene la mayor actividad neutralizante de los
- 60 resultados experimentales con sangre humana (Documento de patente 4), y se ha confirmado que el anticuerpo hu15C1 de 15C1 monoclonal humanizado tiene una actividad neutralizante mediante experimentos con la misma sangre humana (Documento de patente 5). Además, se ha informado que el anticuerpo 1E11.C2E3 monoclonal humanizado tiene una actividad neutralizante superior a la hu15C1 en experimentos con sangre humana (Documento de patente 6).
- 65 Además, se ha informado que, en un sistema de evaluación de la producción de IL-6 para la estimulación de

*Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* sometidas a un tratamiento térmico con sangre humana, el anticuerpo anti-TLR2 humano (T2.5) inhibe débilmente la producción de IL-6 y el anticuerpo anti-TLR4 humano (15C1) inhibe aproximadamente el 50 % de la producción de IL-6, mientras que la adición combinada de ambos anticuerpos inhibe casi completamente la producción de IL-6 (Documento de patente 7).

Sin embargo, hasta el momento no se ha informado de un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y TLR4 humano.

Técnica anterior

Documento de patente

Documento de patente 1: Documento WO 2005/028509  
Documento de patente 2: Documento WO 2005/019431  
Documento de patente 3: Documento WO 2011/003925  
Documento de patente 4: Documento WO 2005/065015  
Documento de patente 5: Documento WO 2007/110678  
Documento de patente 6: Documento WO 2013/149111  
Documento de patente 7: Documento WO 2006/077471

Documento no de patente

Documento no de patente 1: "The Journal of Experimental Medicine", (EE.UU.), 1999, Vol. 189, n.º 11, págs. 1777-1782

## Divulgación de la invención

Problemas que deben resolverse por la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo biespecífico para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria inmunitaria mediante la unión tanto al TLR2 humano como al TLR4 humano para inhibir los efectos inflamatorios inmunitarios mediados por el TLR2 humano y el TLR4 humano.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios inventivos de manera extensiva y repetida sobre la preparación de un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano. Como consecuencia, los presentes inventores han preparado un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende 1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6; y 2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4 (Ejemplos 1 a 8), y han encontrado que el anticuerpo biespecífico inhibe la producción de TNF $\alpha$ , que es una citocina proinflamatoria inducida por una bacteria termoinactivada de la PAO-I de *Pseudomonas aeruginosa* que procede de aislado clínico (en lo sucesivo denominada bacteria inactivada) que responde al TLR2 y al TLR4 (Ejemplo 10). Se ha proporcionado el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano y la presente invención se ha completado basándose en estos resultados. Además, los presentes inventores han encontrado que el anticuerpo biespecífico también inhibe la producción del TNF $\alpha$  inducido por una bacteria inactivada de 21006 de *Escherichia coli* que procede de aislado clínico (Ejemplo 11).

Es decir, la presente invención incluye la siguiente invención como un material o un método que es aplicable médica o industrialmente.

[1] Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que se selecciona de los siguientes (1) o (2):

(1) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende

1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y  
2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la

secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4; o

- 5 (2) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que es un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraducciona del anticuerpo biespecífico de (1).

[2] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [1], que se selecciona de los siguientes (1) o (2):

- 10 (1) un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano y un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano, en donde  
el anticuerpo anti-TLR2 humano es un anticuerpo IgG y comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y  
15 el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un fragmento de región variable de cadena única (scFv) y comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4; o  
20 (2) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que es un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraducciona del anticuerpo biespecífico de (1).

- 25 [3] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [2], en el que el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano y un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano,  
siendo el anticuerpo anti-TLR2 humano un anticuerpo IgG y comprendiendo una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y  
30 siendo el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano un scFv y comprendiendo una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4.  
35 [4] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [2], en el que la modificación postraducciona es piroglutamilación en el extremo amino (extremo N) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano, eliminación de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada (extremo C) del anticuerpo anti-TLR2 humano, y/o piroglutamilación en el extremo N de la región variable de cadena pesada del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano.

- 40 [5] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [4], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una región constante de cadena pesada que es una región constante de Igγ1 humana.  
[6] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [5], en el que la región constante de Igγ1 humana es una región constante de Igγ1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A y L235A o mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A y I253A.  
45 [7] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [4], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una región constante de cadena ligera que es una región constante de Igκ humana.  
[8] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [4], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una región constante de cadena pesada que es una región constante de Igγ1 humana y una región constante de cadena ligera que es una región constante de Igκ humana.  
50 [9] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [8], en el que la región constante de Igγ1 humana es una región constante de Igγ1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A y L235A o mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A y I253A.

- 55 [10] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [2] o [3], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.  
[11] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [10], en el que el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv que tiene una estructura en la que el extremo N de la región variable de cadena ligera está conectado a través de un conector al extremo C de la región variable de cadena pesada.  
60 [12] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [11], en el que el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4.  
[13] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [2] o [3], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el

- 65 [13] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [2] o [3], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el

fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4.

[14] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [13], en el que el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano está conectado a través de un conector al extremo C de cada cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano.

[15] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [14], en el que el conector que conecta la cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano y el fragmento del anticuerpo anti-TLR4 humano consiste en un conector GS.

[16] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [15], en el que el conector GS consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

[17] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [2] o [3], en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano está conectado a través de un conector al extremo C de cada cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano.

[18] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [17], en el que el conector que conecta la cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano y el fragmento del anticuerpo anti-TLR4 humano consiste en un conector GS.

[19] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [18], en el que el conector GS consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

[20] Un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraduccional del anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [19].

[21] Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano, la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR4 humano y/o la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con [1].

[22] Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión en la que el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [19].

[23] El polinucleótido de acuerdo con [22], que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

[24] Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [17] a [19].

[25] Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [21].

[26] Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22], [23] y/o [24].

[27] Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de acuerdo con [25], seleccionada entre el grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6;

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los

números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4; y

(d) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6.

[28] Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de acuerdo con [25], seleccionada entre el grupo que consiste en los siguientes (a) a (d):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22] o [23] y un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [24];

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22] o [23] y el polinucleótido de acuerdo con [24];

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22] o [23]; y

(d) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación [24].

[29] Un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6.

[30] Un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al anti-TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22] o [23] y un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [24];

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22] o [23] y el polinucleótido de acuerdo con [24]; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [22] o [23] y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [24].

- 5 [31] Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, producido mediante el método de acuerdo con [29].
- [32] Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, producido mediante el método de acuerdo con [30].
- 10 [33] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [20], [31] y [32] y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- [34] La composición farmacéutica de acuerdo con [33], que es una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inmunitarias.
- [35] La composición farmacéutica de acuerdo con [34], en la que la enfermedad inflamatoria inmunitaria es sepsis o pancreatitis aguda.
- 15 [36] Un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria inmunitaria, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico según uno cualquiera de [1] a [20], [31] y [32].
- [37] El método para prevenir o tratar de acuerdo con [36], en la que la enfermedad inflamatoria inmunitaria es sepsis o pancreatitis aguda.
- [38] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [20], [31] y [32] para su uso en la
- 20 prevención y tratamiento de una enfermedad inflamatoria inmunitaria.
- [39] El anticuerpo biespecífico de acuerdo con [38], en la que la enfermedad inflamatoria inmunitaria es sepsis o pancreatitis aguda.
- [40] Uso del anticuerpo biespecífico de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [20], [31] y [32] en la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria inmunitaria.
- 25 [41] El uso del anticuerpo biespecífico de acuerdo con [40], en la que la enfermedad inflamatoria inmunitaria es sepsis o pancreatitis aguda.
- [42] Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende:
  - 1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que
  - 30 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 50 a 66 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 99 a 109 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende
  - 35 la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 24 a 39 de la SEQ ID NO: 6, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 55 a 61 de la SEQ ID NO: 6 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 94 a 102 de la SEQ ID NO: 6; y
  - 2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que comprende la CDR1 que
  - 40 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 521 a 525 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 540 a 556 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 589 a 598 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que comprende
  - 45 la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 648 a 658 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 674 a 680 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 713 a 721 de la SEQ ID NO: 4.
- [43] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [42], que
- 50 comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6.
- [44] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [42], que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que procede de una modificación postraduccion
- 55 de un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6.
- [45] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [42] o [44], en el que la modificación postraduccion es piroglutamilación en el extremo N de la región variable de cadena
- 60 pesada y/o eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesada.
- [46] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [45], que comprende una región constante de cadena pesada que es una región constante de IgY1 humana.
- [47] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [46], en el
- 65 que la región constante de IgY1 humana es una región constante de IgY1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A y L235A o mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A y I253A.

[48] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [45], que comprende una región constante de cadena ligera que es una región constante de Igk humana.

[49] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [44], que comprende una región constante de cadena pesada que es una región constante de Igk humana.

[50] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [49], en el que la región constante de Igk humana es una región constante de Igk humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A y L235A o mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A y I253A.

[51] El anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [42] o [43], que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

[52] El fragmento de unión a antígeno de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [50], que es un fragmento de región variable de cadena única, Fab, Fab', o F(ab')<sub>2</sub>.

[53] Un anticuerpo anti-TLR2 humano que es un anticuerpo que procede de una modificación post-traducciona del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51].

[54] El anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [53], en el que la modificación postraducciona es piroglutamilación en el extremo N de la región variable de cadena pesada y/o eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesada.

[55] El anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [42] o [44], que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

[56] Un método para producir un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43], y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43];

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43], y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43]; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43], y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43].

[57] Un método para producir un anticuerpo anti-TLR2 humano, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-TLR2 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51], y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51];

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51], y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51]; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51], y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51].

[58] Un anticuerpo anti-TLR2 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante el método de acuerdo con [56].

[59] Un anticuerpo anti-TLR2 humano producido mediante el método de acuerdo con [57].

[60] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [55], [58] y [59] y un excipiente farmacéuticamente

aceptable.

[61] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [43], el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con [44], y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[62] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [51], el anticuerpo anti-TLR2 humano de acuerdo con [55], y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[63] La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [60] a [62], que es una composición farmacéutica para prevenir o tratar cáncer.

[64] Un método para prevenir o tratar cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [55], [58] y [59].

[65] El anticuerpo anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [55], [58] y [59] para su uso en la prevención y tratamiento de cáncer.

[66] Uso del anti-TLR2 humano, o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con uno cualquiera de [42] a [55], [58] y [59] en la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar cáncer.

El anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano y el anticuerpo anti-TLR2 humano y los fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluyen una fusión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo con otro péptido o proteína, y una modificación que tiene un agente de modificación vinculado al mismo.

### Efectos de la invención

Un anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene una potente actividad inflamatoria antiinmunitaria mediante la inhibición funcional del TLR2 humano y el TLR4 humano y puede utilizarse como un agente para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria inmunitaria.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un ejemplo de una estructura de un anticuerpo biespecífico de la presente invención en el que el extremo N de un anticuerpo scFv anti-TLR4 humano está conectado a través de un conector al extremo C de cada cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que es un anticuerpo IgG.

La Fig. 2 muestra un efecto inhibidor de cada anticuerpo anti-TLR2 humano en la producción de fosfatasa alcalina (FA) inducida por Pam2CSK4 (agonista de TLR2/6) para células THP1-xBlue.

La Fig. 3 muestra un efecto inhibidor de cada anticuerpo biespecífico sobre la producción de TNF $\alpha$  inducida por *Escherichia coli* inactivada para células mononucleares de sangre periférica humana normal.

### Realizaciones para llevar a cabo la invención

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle.

Hay cinco clases principales de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE en un anticuerpo. La estructura básica de una molécula de anticuerpo está configurada de cadenas pesadas que tienen un peso molecular de 50000 a 70000 y cadenas ligeras que tienen un peso molecular de 20000 a 30000 en cada una de las clases en común. La cadena pesada generalmente consiste en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 440 aminoácidos, tiene una estructura distintiva para cada una de las clases y se denomina Igy, Igm, Ig $\alpha$ , Ig $\delta$  e Ig $\epsilon$  correspondientes a IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Además, cuatro subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 están presentes en la IgG, y las cadenas pesadas correspondientes a ellas se denominan respectivamente Igy1, Igy2, Igy3 e Igy4. La cadena ligera generalmente consiste en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 220 aminoácidos, de los cuales dos tipos, tipo L y tipo K, son conocidos, y se denominan Igl $\alpha$  e Igl $\kappa$ . En una configuración peptídica de la estructura básica de moléculas de anticuerpo, dos cadenas pesadas homólogas y dos cadenas ligeras homólogas están unidas mediante enlaces disulfuro (enlace S-S) y enlaces no covalentes, y el peso molecular de la misma es 150000 a 190000. Se pueden emparejar dos tipos de cadenas ligeras con cualquier cadena pesada. Las respectivas moléculas de anticuerpos consisten normalmente en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

Con respecto a los enlaces S-S intracadena, cuatro de los enlaces S-S están presentes en la cadena pesada (cinco en Igm e Ig $\epsilon$ ) y dos de ellos están presentes en la cadena ligera; se forma un bucle por cada 100 a 110 restos de aminoácidos, y esta estructura estérica es similar entre los bucles y se conoce como unidad estructural o dominio. El dominio ubicado en el lado N terminal tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos no es constante incluso en el caso de una muestra de la misma clase (subclase) del mismo tipo de animal, se conoce como región variable, y los respectivos dominios se denominan región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>). La secuencia de aminoácidos del lado C terminal de la región variable es casi constante en cada clase o subclase y se conoce como región constante (cada uno de los dominios se llama C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 y C<sub>L</sub>, respectivamente).

Un sitio determinante antigénico de un anticuerpo está configurado de  $V_H$  y  $V_L$ , y la especificidad de unión depende de la secuencia de aminoácidos de este sitio. Por otro lado, las actividades biológicas como la unión a complementos y diversas células reflejan diferencias en las estructuras de la región constante entre cada clase de Ig. Se entiende que la variabilidad de las regiones variables de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas se limita principalmente a tres pequeñas regiones hipervariables presentes en ambas cadenas y estas regiones se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR: CDR1, CDR2 y CDR3 desde el extremo N terminal). La porción restante de la región variable se conoce como región marco (FR, de sus siglas en inglés) y es relativamente constante.

Además, varios tipos de fragmentos de anticuerpos que comprenden  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo también tienen una actividad de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo típicos incluyen un fragmento de región variable de cadena única (scFv), Fab, Fab' y  $F(ab')_2$ . Un Fab es un fragmento de anticuerpo monovalente que está constituido por un fragmento de cadena ligera y de cadena pesada que incluye un dominio  $V_H$ , un dominio  $C_{H1}$  y una parte de la región bisagra. Un Fab' es un fragmento de anticuerpo monovalente que está constituido por un fragmento de cadena ligera y de cadena pesada que incluye un dominio  $V_H$ , un dominio  $C_{H1}$ , y una parte de la región bisagra, y los restos de cisteína que constituyen el enlace S-S entre cadenas pesadas están incluidos en la parte de la región bisagra. Un fragmento  $F(ab')_2$  es un fragmento de anticuerpo bivalente en el que dos fragmentos Fab' se unen entre sí a través del enlace S-S entre cadenas pesadas en la región bisagra. Un scFv es un fragmento de anticuerpo monovalente que está constituido por una  $V_H$  y un  $V_L$  conectadas con un conector (por ejemplo, un conector peptídico).

Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de dos anticuerpos que reconocen dos antígenos diferentes y se unen a cada antígeno. Con respecto al anticuerpo biespecífico, se han informado varios formatos (estructuras) (Expert Rev. Clin. Pharmacol., 2010, Vol. 3, n.º 4, págs. 491-508). Por ejemplo, se ha informado de un anticuerpo biespecífico tetravalente en el que los extremos C de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del otro anticuerpo se conectan respectivamente mediante conectores a los extremos N de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo, un anticuerpo bivalente biespecífico en el que la cadena pesada y la cadena ligera de cada anticuerpo se unen a través de CH3 mediante una tecnología de pomos en agujeros, y un anticuerpo biespecífico tetravalente en el que el extremo C del otro anticuerpo scFv está conectado a través de un conector al extremo N de la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo, o el extremo N del otro anticuerpo scFv está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada o la ligera de un anticuerpo (Nature Biotech., 1997, Vol. 15, págs. 159-163).

<Anticuerpo biespecífico de la presente invención>

La expresión "anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo biespecífico que tiene una actividad de unión al TLR2 humano y una actividad de unión al TLR4 humano. Específicamente, el anticuerpo biespecífico de la presente invención incluye un anticuerpo biespecífico que tiene las siguientes características:

Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende:

- 1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6; y
- 2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-TLR2 humano" se refiere a un anticuerpo que se une al TLR2 humano, y la expresión "anticuerpo anti-TLR4 humano" se refiere a un anticuerpo que se une al TLR4 humano. El anticuerpo biespecífico de la presente invención puede tener regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de cada uno del anticuerpo anti-TLR2 humano y el anticuerpo anti-TLR4 humano, por ejemplo, puede tener una estructura de cualquier anticuerpo biespecífico que comprenda un fragmento de anticuerpo anti-TLR2 humano que tiene una actividad de unión a un anticuerpo anti-TLR2 humano o TLR2 humano, y un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que tiene una actividad de unión a un anticuerpo anti-TLR4 humano o TLR4 humano. Ejemplos de dichas estructuras incluyen un anticuerpo biespecífico (DVD-Ig) en el que los extremos C de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del otro anticuerpo se conectan respectivamente a través de conectores a los extremos N de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico en el que la cadena pesada y la cadena ligera de cada anticuerpo se unen a través de CH3 mediante una tecnología de pomos en agujeros, y un anticuerpo biespecífico tetravalente en el que el extremo C del otro anticuerpo scFv está conectado a través de un conector al extremo N de la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo, o el extremo N del otro anticuerpo scFv está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo.

Preferentemente, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un anticuerpo biespecífico tetravalente que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano y un fragmento de anticuerpo anti-humano TLR4 en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano es un anticuerpo IgG, y el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv. A partir de ahora en el presente documento, el anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene esta estructura también se conoce como IgG(TLR2)-scFv(TLR4).

En el caso de que el anticuerpo biespecífico de la presente invención sea un IgG(TLR2)-scFv(TLR4), las regiones constantes de cualquier subclase (por ejemplo, regiones constantes de Igy1, Igy2, Igy3 o Igy4 como la cadena pesada, e Igλ o Igk como la cadena ligera) pueden seleccionarse como la región constante del anticuerpo anti-TLR2 humano, pero se prefiere una región constante de Igy1 humana como la región constante de cadena pesada y se prefiere una región constante de Igk humana como la región constante de cadena ligera.

La región constante de Igy1 humana utilizada como la región constante de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano puede ser, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que consiste en los números de aminoácidos 121 a 450 de la SEQ ID NO: 8.

En el caso de utilizar una región constante de Igy1 humana como la región constante de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano, una región constante de Igy1 humana con la introducción de una mutación de aminoácido como L234A (sustitución de leucina por alanina en la posición de aminoácido 234 de acuerdo con el índice EU de Kabat et al.) o L235A (sustitución de leucina por alanina en la posición de aminoácido 235 de acuerdo con el índice de la EU de Kabat et al.) también se puede utilizar para reducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y la actividad citotóxica dependiente de complemento del anticuerpo (Mol. Immunol., 1992, Vol. 29, n.º 5, págs. 633-639). Desde el punto de vista de la farmacocinética *in vivo*, una región constante de Igy1 humana con la introducción de una mutación de aminoácido como I253A (sustitución de isoleucina por alanina en la posición de aminoácido 253 de acuerdo con el índice EU de Kabat et al.) también se puede utilizar para eliminar rápidamente los anticuerpos de la sangre (J. Immunol., 1997, Vol. 158, págs. 2211-2217). La numeración de los restos en el contexto de la introducción de una mutación de aminoácido en una región constante de un anticuerpo utilizado en esta especificación es según el índice EU (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda).

Preferentemente, la región constante de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano es una región constante de Igy1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A y L235A o una región constante de Igy1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A e I253A. Más preferentemente, la región constante de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano es una región constante de Igy1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A y I253A, y dicha región constante de Igy1 humana puede ser, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que consiste en los números de aminoácidos 121 a 450 de la SEQ ID NO: 4.

La región constante de Igk humana utilizada como la región constante de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano puede ser, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que consiste en los números de aminoácidos 114 a 219 de la SEQ ID NO: 6.

Preferentemente, el anticuerpo anti-TLR2 humano es un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una región constante de cadena pesada que es una región constante de Igy1 humana y una región constante de cadena ligera que es una región constante de Igk humana, y más preferentemente la región constante de Igy1 humana es una región constante de Igy1 humana que tiene mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A e I253A.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-TLR2 humano puede ser un anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En el caso de que el anticuerpo biespecífico de la presente invención sea un IgG(TLR2)-scFv(TLR4), el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano puede ser uno cualquiera de un scFv que tenga una estructura en la que el extremo N de la región variable de cadena ligera está conectado a través de un conector al extremo C de la región variable de cadena pesada (región variable de cadena pesada-conector-región variable de cadena ligera), y un scFv que tiene una estructura en la que el extremo N de la región variable de cadena pesada está conectado a través de un conector al extremo C de la región variable de cadena ligera (región variable de cadena ligera-conector-región variable de cadena pesada), y es preferentemente un scFv que tiene una estructura de región variable de cadena pesada-conector-región variable de cadena ligera. El "conector" en el scFv es un péptido (conector peptídico) de cualquier longitud que conecta la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. El conector peptídico es un péptido que tiene preferentemente al menos 5 aminoácidos, más preferentemente al menos 10 aminoácidos, y aún más preferentemente de 15 a 50 aminoácidos. El conector peptídico preferido es un conector peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos GlyGlyGlyGlySer (también denominado (Gly)<sub>4</sub>Ser) (denominado aquí "conector GS"), preferentemente una pluralidad de (Gly)<sub>4</sub>Ser, y más preferentemente de tres a cinco (Gly)<sub>4</sub>Ser.

Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano puede ser un fragmento de anticuerpo anti-TLR4

humano que es un scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es un IgG(TLR2)-scFv(TLR4) es un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4.

Preferentemente, el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano está conectado través de un conector al extremo C de cada cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano en el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es un IgG(TLR2)-scFv(TLR4). La estructura de dicho anticuerpo específico se muestra en la Fig. 1.

El conector que conecta el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano al extremo C de cada cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano es un péptido (conector peptídico) de cualquier longitud que conecta dos extremos. El conector peptídico es un péptido que tiene preferentemente al menos 5 aminoácidos, más preferentemente al menos 10 aminoácidos, y aún más preferentemente de 15 a 50 aminoácidos. El conector peptídico preferido es un conector GS y comprende preferentemente una pluralidad de (Gly)<sub>4</sub>Ser, más preferentemente de cinco a diez (Gly)<sub>4</sub>Ser. Dicho conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es un IgG(TLR2)-scFv(TLR4) es un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-TLR2 humano comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano está conectado través de un conector al extremo C de cada cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano. La fusión en la que el extremo N del fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano está conectado a través del conector al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano también se conoce como "fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano". Preferentemente, en el anticuerpo biespecífico, el conector que conecta la cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano y el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un conector GS. Más preferentemente, el conector GS consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. Dicho anticuerpo biespecífico de la presente invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y una cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En general, se sabe que cuando un anticuerpo se expresa en células, el anticuerpo se modifica después de la traducción. Los ejemplos de la modificación postraduccional incluyen la escisión de lisina en el extremo C de la cadena pesada mediante una carboxipeptidasa; y modificación de glutamina o ácido glutámico en el extremo N de la cadena pesada y la cadena ligera a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación; y se sabe que la eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesada y la modificación de la mayor parte de la glutamina en el extremo N de la cadena pesada y la cadena ligera a ácido piroglutámico se producen en varios anticuerpos (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Vol. 97, págs. 2426-2447).

El anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención también incluye un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano y se somete a modificación postraduccional. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico de la presente invención también incluye no solo un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena pesada de longitud completa, sino también un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena pesada que carece de lisina en el extremo C. También se incluye un anticuerpo biespecífico sometido a modificación de glutamina o ácido glutámico en el extremo N a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación. Se sabe en la materia que dicha modificación postraduccional debida a la piroglutamilación en el extremo N y la eliminación de lisina en el extremo C no tiene ningún efecto sobre la actividad del anticuerpo (Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, págs. 24-39).

En una realización, el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención también incluye un anticuerpo biespecífico descrito a continuación.

Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene una modificación de ácido glutámico del número de aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 4 a ácido piroglutámico, y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

La presente invención también incluye un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 y al TLR4 humanos y tiene las

siguientes características.

Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende

- 5 1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 50 a 66 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 99 a 109 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que
- 10 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 24 a 39 de la SEQ ID NO: 6, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 55 a 61 de la SEQ ID NO: 6 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 94 a 102 de la SEQ ID NO: 6; y
- 15 2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 521 a 525 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 540 a 556 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 589 a 598 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 648 a 658 de la SEQ ID
- 20 NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 674 a 680 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 713 a 721 de la SEQ ID NO: 4.

- 25 El método para evaluar una actividad del anticuerpo biespecífico de la presente invención puede incluir un método para evaluar una actividad de unión y una actividad neutralizante para TLR2 humano y/o TLR4 humano.

- Ya sea que tenga o no una actividad de unión a TLR2 humano o TLR4 humano puede confirmarse mediante un método de medición conocido en la materia. Dicho método de medición puede incluir, por ejemplo, métodos como el análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR, de sus siglas en inglés) y un ensayo inmunoabsorbente
- 30 ligado a enzimas (ELISA, de sus siglas en inglés). Por ejemplo, en el caso de realizar un análisis de SPR para una actividad de unión al TLR2 humano, se puede utilizar Biacore T200 (GE Healthcare Japan). En este caso, la actividad de unión de un anticuerpo de prueba al TLR2 humano puede evaluarse mediante la inmovilización de la proteína humana TLR2 (R&D Systems) en la superficie de un chip sensor, la adición del anticuerpo de prueba a una ruta de flujo y el análisis de la constante de disociación del anticuerpo de prueba con la proteína humana TLR2 (KD).
- 35 Como ejemplo de un método de evaluación específico, se puede utilizar el método que se describe en el Ejemplo 5 a continuación. Como otro ejemplo, en el caso de evaluar una actividad de unión al TLR4 humano utilizando ELISA, la actividad de unión de un anticuerpo de prueba al TLR4 humano puede evaluarse mediante la inmovilización de un complejo de TLR4 humano y MD2 (en lo sucesivo, proteína TLR4 humano/MD2) en una placa ELISA, la adición de un anticuerpo de prueba a la misma, seguido de la reacción, lo que permite reaccionar con un anticuerpo secundario
- 40 tal como el anticuerpo anti-IgG marcado con una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés), el lavado y luego la medición de la actividad utilizando un reactivo de detección de actividad (por ejemplo, en el caso del etiquetado HRP, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB; MOS) para identificar la unión del anticuerpo secundario. Como ejemplo de un método de evaluación específico, se puede utilizar el método que se describe en el Ejemplo 9 a continuación.

- 45 La expresión "actividad neutralizante del anticuerpo contra TLR2 humano" se refiere a una actividad que inhibe cualquier actividad biológica que es provocada por el TLR2 humano a través de la unión al TLR2 humano, y puede evaluarse una o una pluralidad de actividades biológicas como un indicador. Por ejemplo, dicha actividad neutralizante contra el TLR2 humano puede ser una actividad que inhibe la producción de FA inducida por Pam2CSK4 en una célula THP1-xBlue que es una célula monocítica humana. Como un método específico para
- 50 evaluar la actividad, por ejemplo, se puede utilizar el método que se describe en el Ejemplo 6 a continuación.

- La expresión "actividad neutralizante del anticuerpo contra TLR4 humano" se refiere a una actividad que inhibe cualquier actividad biológica que es provocada por el TLR4 humano a través de la unión al TLR4 humano, y puede
- 55 evaluarse una o una pluralidad de actividades biológicas como un indicador. Por ejemplo, dicha actividad neutralizante contra el TLR4 humano puede ser una actividad que inhibe la producción de IL-6 inducida por LPS en una célula U937 que es una línea celular monocítica humana.

- El anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene una actividad neutralizante contra el TLR2 humano y el
- 60 TLR4 humano. La frase "tiene una actividad neutralizante contra el TLR2 humano y el TLR4 humano" se refiere a tener una actividad neutralizante contra el TLR2 humano y una actividad neutralizante contra el TLR4 humano. Ya sea que tenga o no una actividad neutralizante contra el TLR2 humano y el TLR4 humano puede ser evaluado mediante la utilización de cada uno de los métodos de evaluación mencionados anteriormente de una actividad neutralizante contra el TLR2 humano o el TLR4 humano, y una actividad de inhibición de una o una pluralidad de
- 65 actividades biológicas de la célula mediada por el TLR2 humano y el TLR4 humano puede evaluarse mediante la utilización de una célula que exprese tanto el TLR2 humano como el TLR4 humano. Un ejemplo del último método

de evaluación puede ser una evaluación de una actividad que inhibe la producción de TNF $\alpha$  inducida por la PAO-1 de *Pseudomonas aeruginosa* (por ejemplo, ATCC: BAA-47) que es el agente causal de la sepsis en una célula mononuclear de sangre periférica humana que expresa el TLR2 humano y el TLR4 humano. El anticuerpo que tiene dicha actividad puede determinarse como un anticuerpo que tiene una actividad neutralizante contra el TLR2 humano y el TLR4 humano. Como método de evaluación específico, se puede utilizar el método que se describe en el Ejemplo 10 a continuación.

El anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención puede ser preparado fácilmente por los expertos en la materia utilizando un método conocido en la materia, basado en la información de secuencia de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano, y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico de la presente invención, que se desvelan en la presente memoria descriptiva. El anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención no está particularmente limitado, pero se puede producir de acuerdo con, por ejemplo, el método descrito en la sección de <Método para producir anticuerpo biespecífico de la presente invención, y anticuerpo biespecífico producido por el mismo método> descrito a continuación.

El anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención se purifica además si se desea y se formula de acuerdo con un método convencional, y luego se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de enfermedades en las que el TLR2 humano y el TLR4 humano están implicados en la patogénesis de la misma, que incluye enfermedades inflamatorias inmunitarias, como sepsis, insuficiencia renal aguda, enfermedad renal crónica, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, esclerodermia, pancreatitis aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

<Polinucleótido de la presente invención>

El polinucleótido de la presente invención incluye un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada (que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4) de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera (que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6) de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada (que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4) de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera (que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4) de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano del presente invención.

El polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado siempre que sea un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano puede ser un polinucleótido que comprende una secuencia de bases de los números de bases 1 a 360 de la SEQ ID NO: 3, el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano puede ser un polinucleótido que comprende una secuencia de bases de los números de bases 1 a 339 de la SEQ ID NO: 5, el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR4 humano puede ser un polinucleótido que comprende una secuencia de bases de los números de bases 1471 a 1827 de la SEQ ID NO: 3, y el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR4 humano puede ser un polinucleótido que comprende una secuencia de bases de los números de bases 1873 a 2196 de la SEQ ID NO: 3.

Los ejemplos preferidos del polinucleótido de la presente invención incluyen un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende

una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, donde el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica IgG(TLR2)-scFv(TLR4). El polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano es preferentemente un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En una realización, el polinucleótido que codifica una fusión cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 puede ser un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3 y el polinucleótido de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 puede ser un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 5.

El polinucleótido de la presente invención puede prepararse fácilmente por los expertos en la materia utilizando un método conocido en la materia basado en la secuencia de bases. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención se puede sintetizar utilizando un método de síntesis de genes conocido en la materia. Se pueden utilizar diversos métodos, tales como un método de síntesis de genes de anticuerpos descritos en el documento WO90/07861, conocido por los expertos en la materia, como método de síntesis de genes. Una vez que se obtiene el polinucleótido de la presente invención, también es posible obtener otros polinucleótidos de la presente invención mediante la introducción de una mutación en un sitio predeterminado de este polinucleótido. El método de mutagénesis que se puede utilizar incluye varios métodos conocidos por los expertos en la materia, como la mutagénesis específica del sitio (Current Protocols in Molecular Biology edit., 1987, John Wiley&Sons Sección 8.1-8.5).

<Vector de expresión de la presente invención>

El vector de expresión de la presente invención incluye un vector que es un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y se puede utilizar en la producción de un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención. Los anticuerpos biespecíficos de diversos formatos y sus métodos de producción son conocidos en la materia. El vector de expresión de la presente invención se puede construir fácilmente de acuerdo con estos métodos de producción por los expertos en la materia de acuerdo con el formato de un anticuerpo biespecífico a expresar.

Por ejemplo, el vector de expresión utilizado para producir el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) es preferentemente un vector de expresión que comprende uno o ambos polinucleótidos que comprenden una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico.

Más preferentemente, el vector de expresión utilizado para producir el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) es un vector de expresión que comprende uno o ambos de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Aún más preferentemente, el vector de expresión utilizado para producir el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) es un vector de expresión que comprende uno o ambos de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

El vector de expresión utilizado para expresar polinucleótidos no está particularmente limitado siempre que sea un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico se puede expresar en diversas células hospedadoras de células eucariotas (por ejemplo, células animales, células de insecto, células vegetales, y levadura) y/o células procariotas (por ejemplo, *Escherichia coli*), y pueden producirse los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos. Los ejemplos del vector de expresión incluyen un vector plásmido y un vector viral (por ejemplo, adenovirus o retrovirus). Preferentemente, pueden utilizarse pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza, Inc.). Además, un gen de anticuerpo puede expresarse mediante la introducción de un fragmento de gen de región variable en un vector de expresión que comprende un gen de región constante de Ig humana tal como AG-γ1 o AG-κ (por ejemplo, véase el documento WO94/20632) por adelantado.

En el caso en que se use una célula animal, una célula de insecto o una levadura como célula hospedadora, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de terminación. En este caso, el vector de expresión de la presente invención puede comprender una secuencia potenciadora, una región no traducida en el lado 5' y el lado 3' de los genes que codifican el anticuerpo biespecífico de la presente invención o la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera del mismo, una secuencia señal secretora, una unión de empalme, un sitio de poliadenilación o un replicón. En los casos en los que se utiliza *Escherichia coli* como célula hospedadora, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio, un codón de terminación, una región de terminación y un replicón. Además, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un marcador de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a la tetraciclina, un gen de resistencia a la ampicilina, un gen de resistencia a la kanamicina, un gen de resistencia a la neomicina o un gen de la dihidrofolato reductasa) que se utiliza comúnmente según la necesidad.

El vector de expresión de la presente invención puede incluir un promotor que está unido operativamente al polinucleótido. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de la presente invención en una célula animal incluyen un promotor que procede de virus tal como CMV, RSV o SV40, un promotor de actina, un promotor 1α del factor de alargamiento (EF, de sus siglas en inglés) y un promotor de choque térmico. En el caso de que la célula hospedadora sea *Escherichia coli* (por ejemplo, las bacterias que pertenecen al género *Escherichia*), los ejemplos de los promotores para la expresión incluyen un promotor trp, un promotor lac, un promotor λPL y un promotor tac. Además, los ejemplos de los promotores para la expresión en levaduras incluyen un promotor de GAL1, un promotor de GAL10, un promotor de PH05, un promotor de PGK, un promotor de GAP y un promotor de ADH.

<Célula hospedadora transformada de la presente invención>

La célula hospedadora transformada de la presente invención no está particularmente limitada siempre que se transforme con el vector de expresión de la presente invención, y un ejemplo de la misma es la célula hospedadora transformada de la presente invención utilizada para producir el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) e incluye una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende uno o ambos de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano incluido en el anticuerpo biespecífico, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico.

La célula hospedadora transformada de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) incluye una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la presente invención, que se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

- (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6;

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4; y

(d) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, la célula hospedadora transformada de la presente invención es una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la presente invención, que se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4; y

(d) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, la célula hospedadora transformada de la presente invención es una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la presente invención, que se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humanos-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y

(d) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Los ejemplos preferidos de la célula hospedadora transformada de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) incluyen una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

El método para producir IgG(TLR2)-scFv(TLR4) de la presente invención no está particularmente limitado siempre que incluya una etapa de cultivo de la célula hospedadora transformada de la presente invención para expresar IgG(TLR2)-scFv(TLR4). Los ejemplos de la célula hospedadora preferida para su uso en el método incluyen las células hospedadoras transformadas preferidas anteriores de la presente invención.

La célula hospedadora a transformar no está particularmente limitada siempre que la célula hospedadora sea apropiada para el vector de expresión que se está utilizando, se transforme con el vector de expresión y pueda expresar un anticuerpo. Los ejemplos de la célula hospedadora a transformar incluyen varias células tales como células naturales o células establecidas artificialmente que se utilizan convencionalmente en la materia a la que pertenece la presente invención (por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHO-K1SV), células de insecto (por ejemplo, Sf9), *Escherichia coli* (por ejemplo, bacterias que pertenecen al género *Escherichia*), levadura (por ejemplo, el género *Saccharomyces* o *Pichia*) y similares). Preferentemente, se pueden utilizar células cultivadas de células CHO-K1SV, células CHO-DG44, células 293, células NS0 o similares.

El método de transformación de una célula hospedadora no está particularmente limitado, pero, por ejemplo, se puede utilizar un método de fosfato de calcio o un método de electroporación.

<Método para producir anticuerpo biespecífico de la presente invención, y anticuerpo biespecífico producido por el mismo método>

El método para producir el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención no está particularmente limitado siempre que incluya una etapa de cultivo de la célula hospedadora transformada de la presente invención para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano. Los ejemplos de la célula hospedadora preferida para su uso en el método incluyen las células hospedadoras transformadas preferidas anteriores de la presente invención.

En una realización, el método para producir el anticuerpo biespecífico de la presente invención que es IgG(TLR2)-scFv(TLR4) incluye un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números

de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, el método para producir el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención incluye un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, el método para producir el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención incluye un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 6;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

La célula hospedadora transformada se puede cultivar mediante un método conocido. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio y el tiempo de cultivo se seleccionan apropiadamente. En el caso donde la célula hospedadora es una célula animal, los ejemplos del medio incluyen un medio MEM que contiene aproximadamente del 5 al 20 % de suero bovino fetal (Science, 1959, Vol. 130, n.º 3373, págs. 432 a 7), un medio DMEM (Virology, 1959, Vol. 8, pág. 396), y un medio RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, pág. 519), un medio 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, págs. 1 a 8). El pH del medio es preferentemente de aproximadamente 6 a 8, y el cultivo generalmente se lleva a cabo a aproximadamente de 30 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 72 horas con aireación y agitación si es necesario. En el caso donde la célula hospedadora es una célula de insecto, por ejemplo, puede utilizarse como medio un medio de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1985, Vol. 82, pág. 8404) que contiene suero bovino fetal. El pH del medio es preferentemente de aproximadamente 5 a 8, y el cultivo generalmente se lleva a cabo a aproximadamente de 20 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 100 horas con aireación y agitación si es necesario. En el caso donde la célula hospedadora es *Escherichia coli* o levadura, por ejemplo, un medio líquido que contiene una fuente de nutrientes es adecuado como medio. Se prefiere que el medio nutriente contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico necesaria para el crecimiento de la célula hospedadora transformada. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón y sacarosa solubles, y los ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánico o la fuente de nitrógeno orgánico incluyen sales de amonio, sales de nitrato, aminoácidos, licor de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja y extracto de patata. Se pueden incluir otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio), vitaminas) y antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina y kanamicina), según se desee. El pH del medio es preferentemente de aproximadamente 5 a 8. En el caso donde la célula hospedadora es *Escherichia coli*, los ejemplos preferidos del medio que se puede utilizar incluyen un medio LB y un medio M9 (Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2). El cultivo generalmente se lleva a cabo a aproximadamente 14 a 39 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas con aireación y agitación si es necesario. En el caso donde la célula hospedadora es una levadura, por ejemplo, se puede utilizar como medio un medio mínimo de Burkholder (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1980, Vol. 77, pág. 4505). El cultivo generalmente se lleva a cabo a aproximadamente 20 a 35 °C durante aproximadamente 14 a 144 horas con aireación y agitación si es necesario. Al llevar a cabo el cultivo de la manera descrita anteriormente, es posible expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención.

El método para producir el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención puede incluir además recuperar, preferentemente aislar o purificar el anticuerpo biespecífico de la presente invención de la célula hospedadora transformada además de cultivar la célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo biespecífico de la presente invención como se describe anteriormente. Los ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen métodos que utilizan solubilidad, como la precipitación salina y un método de precipitación con solventes, métodos que utilizan la diferencia de peso molecular, como la diálisis, la ultrafiltración y la filtración en gel, métodos que utilizan una carga eléctrica como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de hidroxilapatita, métodos que utilizan afinidad específica, como la cromatografía de afinidad, métodos que utilizan la diferencia de hidrofobia, como la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, y métodos que utilizan la diferencia de punto isoeléctrico, como la electroforesis de punto isoeléctrico. Preferentemente, el anticuerpo acumulado en un sobrenadante de cultivo se puede purificar mediante diversas cromatografías, por ejemplo, diversas cromatografías en columna que utilizan una columna de Proteína A o una columna de Proteína G.

#### <Composición farmacéutica de la presente invención>

La composición farmacéutica de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante un método utilizado convencionalmente que utiliza excipientes, es decir, excipientes farmacéuticos o vehículos farmacéuticos comúnmente utilizados en la materia. Los ejemplos de formas de dosificación de las composiciones farmacéuticas incluyen preparaciones parenterales tales como una inyección y una infusión por goteo, que pueden administrarse mediante administración intravenosa, administración subcutánea o similares. En la preparación de

productos farmacéuticos, los vehículos y aditivos de acuerdo con las formas de dosificación se pueden utilizar dentro del intervalo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir varios tipos de anticuerpos biespecíficos que se unen al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo no sometido a modificación postraducciona y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que procede de una modificación postraducciona del anticuerpo.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano también incluye una composición farmacéutica descrita a continuación.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano que es un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende

- 1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y
- 2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y
- un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraducciona del anticuerpo biespecífico anterior.

La composición farmacéutica de la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que tiene la eliminación de la lisina C-terminal de la cadena pesada, un anticuerpo biespecífico que tiene la modificación postraducciona N terminal, un anticuerpo biespecífico que tiene la eliminación de la lisina C-terminal de la cadena pesada y la modificación postraducciona N terminal, y/o un anticuerpo biespecífico que tiene lisina del extremo C de la cadena pesada y que no tiene la modificación postraducciona N terminal.

En una realización, la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de los siguientes (1) y (2).

- (1) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene una modificación de ácido glutámico del número de aminoácido 1 a ácido piroglutámico, y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
- (2) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En otra realización más, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano también incluye una composición farmacéutica descrita a continuación.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de adición del anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención en una formulación varía dependiendo de la gravedad y la edad de los pacientes, una forma de dosificación de la formulación de fármaco a utilizar, el título de unión del anticuerpo y similares. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico se puede utilizar en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/kg a 100 mg/kg.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar como un agente para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inmunitarias en las cuales los TLR2 y TLR4 humanos están implicados en la patogénesis de las mismas, tal como sepsis, insuficiencia renal aguda, enfermedad renal crónica, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, esclerodermia, pancreatitis aguda y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias inmunitarias, que comprende el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención. Además, la presente invención incluye un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria inmunitaria, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico. Además, la presente invención incluye el anticuerpo biespecífico de la presente invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria inmunitaria. Además, la presente invención incluye el uso del anticuerpo biespecífico de la presente invención en la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria inmunitaria.

10 <Anticuerpo anti-TLR2 humano de la presente invención y composición farmacéutica que comprende el mismo anticuerpo>

La presente invención incluye un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 8, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 50 a 66 de la SEQ ID NO: 8 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 99 a 109 de la SEQ ID NO: 8, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 24 a 39 de la SEQ ID NO: 6, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 55 a 61 de la SEQ ID NO: 6 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 94 a 102 de la SEQ ID NO: 6.

Además, la presente invención también incluye un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que procede de una modificación postraduccional del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de la modificación postraduccional incluyen piroglutamilación en el extremo N de la región variable de cadena pesada y/o eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesada. La región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera preferidas en el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención son los mismos que los descritos para el anticuerpo anti-TLR2 humano en la sección <Anticuerpo biespecífico de la presente invención> descrito anteriormente.

35 En una realización, el anticuerpo anti-TLR2 humano de la presente invención es un anticuerpo anti-TLR2 humano que tiene las siguientes características.

Un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En otra realización más, el anticuerpo anti-TLR2 humano de la presente invención es un anticuerpo anti-TLR2 humano que tiene las siguientes características.

45 Un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Los expertos en la materia pueden preparar fácilmente el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención utilizando un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica cada una de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano incluido en el anticuerpo biespecífico de la presente invención descrito anteriormente, y con referencia a la descripción de <Vector de expresión de la presente invención>, <Célula hospedadora transformada de la presente invención> y <Método para producir anticuerpo biespecífico de la presente invención y anticuerpo biespecífico producido por el mismo método> descrito anteriormente.

La presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante un método utilizado convencionalmente que utiliza excipientes, es decir, excipientes farmacéuticos o vehículos farmacéuticos comúnmente utilizados en la materia. Los ejemplos de formas de dosificación de las composiciones farmacéuticas incluyen preparaciones parenterales tales como una inyección y una infusión por goteo, que pueden administrarse mediante administración intravenosa, administración subcutánea o similares. En la preparación de productos farmacéuticos, los excipientes, vehículos y aditivos de acuerdo con las formas de dosificación se pueden utilizar dentro del intervalo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir varios tipos de anticuerpos anti-TLR2 humano o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo no sometido a modificación postraducciona y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que procede de una modificación postraducciona del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo también incluye una composición farmacéutica descrita a continuación.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que procede de una modificación postraducciona del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano también incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al TLR2 humano de los siguientes (1) a (4).

(1) un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

(2) un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y que tiene una modificación de ácido glutámico del número de aminoácido 1 a ácido piroglutámico, y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

(3) un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 8 y que tiene una modificación de ácido glutámico del número de aminoácido 1 a ácido piroglutámico y, una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

(4) un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

En otra realización más, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano también incluye la siguiente composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al TLR2.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de adición del anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en una formulación varía dependiendo de la gravedad y la edad de los pacientes, una forma de dosificación de la formulación de fármaco a utilizar, el título de unión del anticuerpo y similares. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo se puede utilizar en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/kg a 100 mg/kg.

El anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se purifica adicionalmente si es necesario y se formula de acuerdo con un método convencional, y luego se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad en la que el TLR2 humano está involucrado en la patogénesis de la misma, tal como sepsis o cáncer.

<Anticuerpo de fusión y anticuerpo modificado>

Los expertos en la materia pueden preparar un anticuerpo de fusión de un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, un anticuerpo anti-TLR2 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo con otro péptido o proteína y también pueden preparar un anticuerpo modificado que tenga un agente de modificación unido al mismo, utilizando métodos conocidos en la materia. El anticuerpo biespecífico que se une al

TLR2 humano y al TLR4 humano, el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también incluyen un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno del mismo en forma de dicha fusión o modificación. El otro péptido o proteína que puede utilizarse para la fusión no está particularmente limitado, siempre que el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención como el anticuerpo de fusión tenga una actividad de unión al TLR2 humano y al TLR4 humano o el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como el anticuerpo de fusión tenga una actividad de unión al TLR2 humano; ejemplos de los mismos incluyen albúmina de suero humano, varios péptidos marcadores, péptidos con motivos de hélices artificiales, proteínas de unión a maltosa, glutatión S transferasa, varias toxinas, otros péptidos o proteínas capaces de promover la multimerización, y similares. El agente de modificación que puede utilizarse para la modificación no está particularmente limitado, siempre que el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención como el anticuerpo de fusión tenga una actividad de unión al TLR2 humano y al TLR4 humano o el anticuerpo anti-TLR2 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como el anticuerpo de modificación tenga una actividad de unión al TLR2 humano; ejemplos de los mismos incluyen polietilenglicol, cadenas de azúcar, fosfolípidos, liposomas, compuesto de bajo peso molecular y similares.

La presente invención se ha descrito y se proporcionarán ejemplos específicos a los que se hace referencia para una mejor comprensión, pero estos son simplemente ejemplos y la presente invención no se limita a ellos.

## Ejemplos

Con respecto a las partes que utilizan kits o reactivos disponibles en el mercado, los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo adjunto, a menos que se indique lo contrario. Por razones de conveniencia, se expresa la concentración mol/l como M. Por ejemplo, una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M se refiere a una solución acuosa de hidróxido de sodio de 1 mol/l.

### (Ejemplo 1: Preparación de hibridoma productor de anticuerpo anti-TLR2 humano)

Se preparó un anticuerpo anti-TLR2 humano utilizando ratones con tecnología de desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos "VelocImmune" (VelocImmune antibody technology: Regeneron, Inc. (Patente de EE.UU. N.º 6596541)). Se inmunizó una proteína TLR2 humana (R&D Systems, 2616-TR-050) en ratones VelocImmune, junto con un adyuvante que provoca una reacción inmunitaria. De acuerdo con un método convencional, se extrajo el bazo o el ganglio linfático de los ratones inmunizados y se recogieron los linfocitos y se fusionaron con células de células de mieloma de ratón SP2/0 (ATCC: CRL-1581) para preparar un hibridoma. El hibridoma se sometió a monoclonización y se cultivó en un medio de hibridoma CD (Life Technologies) que es un medio sin suero. El anticuerpo se purificó del sobrenadante de cultivo resultante utilizando una columna de proteína G (GE Healthcare Japan). Dado que la tecnología VelocImmune emplea ratones transgénicos en los que las regiones variables de cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena se reemplazan con las regiones variables humanas correspondientes, el anticuerpo obtenido es un anticuerpo que tiene regiones variables del anticuerpo humano y regiones constantes del anticuerpo de ratón (también referido como anticuerpo quimérico).

### (Ejemplo 2: Evaluación de la actividad neutralizante del anticuerpo anti-TLR2 humano)

Con el fin de evaluar una actividad neutralizante del anticuerpo anti-TLR2 humano identificado en el Ejemplo 1, se llevó a cabo un ensayo para la inhibición de la producción de fosfatasa alcalina (FA) inducida por Pam2CSK4 agonista de TLR2/6 utilizando una célula THP1-xBlue que es una célula monocítica humana que expresa endógenamente TLR2 humano.

Como resultado, se demostró que el anticuerpo anti-TLR2 humano (anticuerpo quimérico) designado 31-5F5-2F3 inhibe la producción de FA y tiene una actividad neutralizante contra el TLR2 humano.

### (Ejemplo 3: Secuenciación del anticuerpo anti-TLR2 humano y preparación de la variante)

La secuencia de los genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo se analizó y se secuenció a partir de un hibridoma que produce el anticuerpo anti-TLR2 humano 31-5F5-2F3.

Con el fin de mejorar las propiedades físicas y la estabilidad del anticuerpo después de la secuenciación del anticuerpo, las FR de la cadena pesada y la cadena ligera del 31-5F5-2F3 se reemplazaron con las FR de un anticuerpo humano diferente para preparar un anticuerpo anti-TLR2 humano 31-5F5-2F3.m1

### (Ejemplo 4: Preparación del anticuerpo anti-TLR2 humano completamente humano)

El anticuerpo preparado en el Ejemplo 3 es un anticuerpo en el que la región variable procede de seres humanos y la región constante procede de ratón. Por consiguiente, utilizando un vector GS (Lonza, Inc.) que es un vector de expresión de células de mamíferos, se construyó un vector de expresión que comprende ambos genes de la cadena pesada y la cadena ligera para producir así un anticuerpo completamente humano. Específicamente, un gen que

codifica una secuencia señal (Nigel Whittle et al., Protein Engineering, 1987, Vol. 1, n.º 6, págs. 499-505) se conectó al lado 5' del gen de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 31-5F5-2F3.m1 y un gen de región constante de Igγ1 humana (que consiste en la secuencia de bases de los números de base 361 a 1350 de la SEQ ID NO: 7) se conectó al lado 3' del mismo, y luego este gen de la cadena pesada se insertó en un vector GS pEE6.4.

Además, se conectó un gen que codifica una secuencia señal (Nigel Whittle, et al., *supra*) al lado 5' del gen de la región variable de cadena ligera y un gen de la región constante de la cadena κ humana (que consiste en la secuencia de bases de los números de aminoácidos 340 a 657 de la SEQ ID NO: 5) se conectó al lado 3' del mismo, y luego este gen de la cadena ligera se insertó en un vector GS pEE12.4.

La secuencia del gen de la cadena pesada de un anticuerpo insertado en pEE6.4 y la secuencia del gen de la cadena ligera de un anticuerpo insertado en pEE12.4 se analizaron utilizando un secuenciador y, a partir de la secuencia de aminoácidos resultante, se determinaron las secuencias de CDR con referencia a la base de datos de Kabat et al ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Oficina de Impresión del Gobierno de los Estados Unidos).

La secuencia de bases de la cadena pesada del anticuerpo completamente humano (31-5F5-2F3.m1 completamente humano) del 31-5F5-2F3.m1 preparado se expone en la SEQ ID NO: 7, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 8, la secuencia de bases de la cadena ligera del anticuerpo se expone en la SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 6.

La región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 8 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 8, y la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la cadena pesada consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 109 de la SEQ ID NO: 8. La región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 6 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la cadena ligera consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de la SEQ ID NO: 6.

Utilizando los vectores GS descritos anteriormente en los que se insertaron respectivamente los genes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, se llevó a cabo la expresión del anticuerpo de dos maneras de expresión transitoria y expresión constitutiva. Para la expresión transitoria, ambos vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera descritos anteriormente se transfectaron en células FreeStyle 293 (Life Technologies) cultivadas a aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml en un medio de expresión FreeStyle 293 (Life Technologies) utilizando un reactivo de transfección 293fectin (Life Technologies), y cultivadas durante 7 días. Como alternativa, ambos vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera descritos anteriormente se transfectaron en células Expi293 (Life Technologies) cultivadas a aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml en un medio de expresión Expi293 (Life Technologies) utilizando un reactivo de transfección ExpiFectamine293 (Life Technologies), y cultivadas durante 7 días. Como alternativa, ambos vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera descritos anteriormente se transfectaron en células CHO-K1 SV (Lonza, Inc.) cultivadas a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml en un medio CD-CHO (Life Technologies) utilizando un método de electroporación y cultivadas durante 7 días. El sobrenadante de cultivo se purificó utilizando columnas de proteína A o proteína G (ambas están disponibles en GE Healthcare Japan) para dar un anticuerpo purificado del anticuerpo completamente humano. Para la expresión constitutiva, los vectores GS descritos anteriormente, en los que los genes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo se insertaron respectivamente, se dividieron con las enzimas de restricción *NotI* y *PvuI* y se ligaron entre sí utilizando el kit de conveniencia-ligadura (NIPPONGENE) que es un kit de ligadura o alta ligadura (TOYOBO) que es un reactivo de ligadura, construyendo así vectores GS en los que se insertaron ambos genes de la cadena pesada y la cadena ligera. Los vectores de expresión codifican una cadena pesada y una cadena ligera de longitud completa y una glutamina sintetasa, y los anticuerpos se expresaron mediante transfección de los mismos en células CHO-K1SV. El sobrenadante de cultivo se purificó utilizando una columna de proteína A o una columna de proteína G para obtener un anticuerpo purificado del anticuerpo completamente humano.

#### **(Ejemplo 5: Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo anti-TLR2 humano completamente humano)**

Para evaluar una actividad de unión del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano preparado en el Ejemplo 4 para TLR2 humano, se llevó a cabo un análisis de SPR.

En el análisis de SPR, se utilizó Biacore T200 (GE Healthcare Japan) para llevar a cabo el análisis. Se inmovilizó una IgG anti-His (incluida en el kit His Capture) en un chip sensor CM5 (GE Healthcare Japan, BR-1005-30) utilizando un kit His Capture (GE Healthcare Japan, 28-9950-56) y un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare Japan, BR-1000-50). La ruta de flujo N.º 1 se conoce como referencia, a la que no se unió la proteína TLR2 humana. En cada una de las otras rutas de flujo (N.º 2, N.º 3 y N.º 4), una proteína TLR2 humana (R&D Systems, 2616-TR-050) diluida a 0,66 µg/ml en tampón HBS-EP+ (GE Healthcare Japan, BR-1006-69) se añadió a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto durante 2 minutos y luego se inmovilizó. Posteriormente, se añadió una solución de 31-5F5-2F3.m1 completamente humano diluido a 200 nM en tampón HBS-EP+ a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto durante 2 minutos, y se midió la unión del anticuerpo completamente humano-TLR2 humano. A continuación, se

añadió tampón HBS-EP+ a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto durante 5 minutos y se midió la disociación del anticuerpo completamente humano y el TLR2 humano. El modelo de analito bivalente y el  $R_{max}$  se analizaron mediante ajuste local para calcular la constante de velocidad de asociación ( $k_a$ ) y la constante de velocidad de disociación ( $k_d$ ), y se calculó la constante de asociación-disociación ( $KD$ ) mediante la división de  $k_d$  por  $k_a$ .

Como resultado, se demostró que  $KD$  es 88,5 pM, y el 31-5F5-2F3.m1 completamente humano tiene una actividad de unión al TLR2 humano.

#### **(Ejemplo 6: Evaluación de la actividad neutralizante del anticuerpo anti-TLR2 humano completamente humano)**

Con el fin de evaluar una actividad neutralizante del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano preparado en el Ejemplo 4 contra el TLR2 humano, se realizó un ensayo para la inhibición de la producción de FA inducida por Pam2CSK4 utilizando células THP1-xBlue. Se sembraron células THP1-xBlue (Invivogen Inc., thpx-sp) en un medio RPMI1640 (Life Technologies) en  $5 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Becton, Dickinson and Company) a 75 µl/pocillo. Inmediatamente después de la siembra celular, se añadieron 25 µl de 31-5F5-2F3.m1 completamente humano diluido en 9 pasos en un intervalo de 855 nM a 2,19 pM con un medio RPMI1640 y se incubaron durante 30 minutos en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Además, se añadieron 25 µl de Pam2CSK4 (Invivogen, tlr1-pm2s; una concentración final de 100 ng/ml) diluido con un medio RPMI1640. Como control, se prepararon respectivamente un pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de un anticuerpo, y un pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de Pam2CSK4. Después de cultivar durante la noche en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de FA en el sobrenadante de cultivo utilizando un Quanti-Blue disponible comercialmente (Invivogen). Además, se calculó un valor de IC<sub>50</sub> del anticuerpo contra la producción de FA inducida por Pam2CSK4. En relación con el cálculo de un valor de IC<sub>50</sub>, el pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de un anticuerpo se expuso como control de inhibición al 0 %, y el pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de Pam2CSK4 se expuso como control de inhibición al 100 %. El valor de IC<sub>50</sub> se calculó mediante el ajuste de curva logística de cuatro parámetros.

Como resultado, el 31-5F5-2F3.m1 completamente humano inhibió la producción de FA y tuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 97,7 pM. Se encontró que el 31-5F5-2F3.m1 completamente humano tiene una actividad neutralizante contra el TLR2 humano.

#### **(Ejemplo 7: Evaluación de la actividad neutralizante del anticuerpo anti-TLR2 humano completamente humano (2))**

Con el fin de evaluar una actividad neutralizante del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano preparado en el Ejemplo 4 contra el TLR2 humano, se llevó a cabo un ensayo para la inhibición de la producción de FA inducida por Pam2CSK4 utilizando células THP1-xBlue. Se utilizaron T2.5 (Documento de patente 1) y OPN305 (Documento de patente 3), que son un anticuerpo anti-TLR2 humano, como anticuerpos comparativos.

Se llevó a cabo el mismo experimento que en el Ejemplo 6 para tres tipos de anticuerpos, 31-5F5-2F3.m1 completamente humano (dilución en 9 pasos en un intervalo de 855 nM a 2,19 pM en un medio RPMI1640), T2.5 (dilución en 9 pasos en un intervalo de 833 nM a 2,13 pM en un medio RPMI1640), y OPN305 (dilución en 9 pasos en un intervalo de 861 nM a 2,20 pM en un medio RPMI1640). Los valores de IC<sub>50</sub> se calcularon mediante el ajuste de curva logística de cuatro parámetros.

Como resultado, el 31-5F5-2F3.m1 completamente humano inhibió completamente la producción de FA inducida por Pam2CSK4 y tuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 130 pM. Por otro lado, la inhibición de la producción de FA inducida por Pam2CSK4 de T2.5 y OPN305 fue parcial (Fig. 2).

#### **(Ejemplo 8: Preparación del anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano)**

Se prepararon dos anticuerpos biespecíficos anti-TLR2 humano y anti-TLR4 humano que comprenden un anticuerpo anti-TLR2 humano (anticuerpo IgG) y un fragmento de región variable de cadena única del anticuerpo anti-TLR4 humano (scFv). El anticuerpo biespecífico preparado en este Ejemplo es un anticuerpo biespecífico del tipo IgG(TLR2)-scFv(TLR4) mencionado anteriormente, y tiene una estructura en la que el extremo N del anticuerpo scFv anti-TLR4 humano está conectado a través de un conector al extremo C de cada cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano (Figura 1).

Se preparó el gen que codifica una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en el que el gen que codifica un conector GS (SEQ ID NO: 9) se conectó al extremo 3' del gen de la cadena pesada del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano preparado en el Ejemplo 4 utilizando un método de PCR, el gen que codifica un anticuerpo scFv anti-TLR4 humano se conectó al extremo 3' del gen que codifica un conector GS utilizando un método de PCR y el extremo C de la cadena pesada del 31-5F5-2F3 completamente humano y el extremo N de un anticuerpo scFv anti-TLR4 humano se conectaron mediante el conector GS. El

anticuerpo scFv anti-TLR4 humano incluido en la fusión codificada por este gen tiene una estructura en la que se conectó el extremo N de la región variable de cadena ligera, que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, a través de un conector GS (SEQ ID NO: 10) al extremo C de la región variable de cadena pesada, que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 y que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4. La fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano así preparada se denomina como cadena pesada ICU-1-IgY1. El gen que codifica una secuencia señal (Nigel Whittle et al., *supra*) se conectó al lado 5' del gen de la cadena pesada ICU-1-IgY1, que luego se insertó en un vector pEE6.4.

Además, el gen de una cadena pesada ICU-1-IgY1 modificada con la introducción de mutaciones de aminoácidos de L234A, L235A e I253A en la región constante de cadena pesada de IgY1 humana de la cadena pesada ICU-1-IgY1 (denominada cadena pesada ICU-1-IgY1-Lash) se preparó y el gen se insertó en un vector pEE6.4.

Se prepararon dos tipos de anticuerpos biespecíficos que se unen al TLR2 humano y al TLR4 humano mediante la combinación del vector pEE6.4 con la inserción del gen de la cadena pesada ICU-1-IgY1 o el gen de la cadena pesada ICU-1-IgY1-Lash y pEE12.4 con inserción del gen de la cadena ligera del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano preparado en el Ejemplo 4, y mediante la utilización del mismo método que el método de expresión y purificación de los anticuerpos descritos en el Ejemplo 4.

El anticuerpo biespecífico que comprende la cadena pesada ICU-1-IgY1 y la cadena ligera del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano se denomina ICU-1-IgY1 completamente humano, y el anticuerpo biespecífico que comprende la cadena pesada ICU-1-IgY1-Lash y la cadena ligera del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano se denomina ICU-1-IgY1-Lash completamente humano.

La secuencia de bases de la cadena pesada ICU-1-IgY1 del ICU-1-IgY1 completamente humano se expone en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de bases de la cadena pesada ICU-1-IgY1-Lash del ICU-1-IgY1-Lash completamente humano se expone en la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 4.

La cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano incluida en la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano expuesta en la SEQ ID NO: 2 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 2.

La cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano incluida en la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano expuesta en la SEQ ID NO: 4 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4.

La región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano incluida en las dos fusiones anteriores de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano expuestas en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 es común entre ellas y consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la región variable de cadena pesada consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 31 a 35, 50 a 66, y 99 a 109 de la SEQ ID NO: 4.

El anticuerpo scFv anti-TLR4 humano incluido en las dos fusiones anteriores de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano expuesto en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 es común entre ellas y consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR4 humano que constituye el anticuerpo scFv anti-TLR4 humano consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la región variable de cadena pesada consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 521 a 525, 540 a 556, y 589 a 598 de la SEQ ID NO: 4. La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR4 humano que constituye el anticuerpo scFv anti-TLR4 humano consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4, y la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la región variable de cadena ligera consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 648 a 658, 674 a 680, y 713 a 721 de la SEQ ID NO: 4.

La secuencia de bases de la cadena ligera del ICU-1-IgY1 completamente humano y del ICU-1-IgY1-Lash completamente humano es común entre ellas y, la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 6. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano expuesta en la SEQ ID NO: 6 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la región variable de cadena ligera consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 24 a 39, 55 a 61, y 94 a 102 de la SEQ ID NO: 6.

**(Ejemplo 9: Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano)**

Con el fin de evaluar la actividad de unión de cada uno de los dos anticuerpos biespecíficos preparados en el Ejemplo 8 para el TLR2 humano y el TLR4 humano, se llevó a cabo un ELISA utilizando una proteína TLR2 humana y una proteína TLR4/MD2 humana. Se añadieron 15 µl/pocillo de una proteína TLR2 humana (R&D Systems, 2616-TR-050) diluida a una concentración de 10 µg/ml en PBS (Life Technologies, 10010-023) a una placa MaxiSorp de 384 pocillos transparente (Thermo Fisher Scientific Inc.), seguido de inmovilización a temperatura ambiente durante 1 hora. De forma similar, se añadieron 15 µl/pocillo de una proteína TLR4/MD2 humana (R&D Systems, 3146-TM / CF) a 10 µg/ml, seguido de inmovilización a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de 1 hora, los pocillos se lavaron tres veces con una solución de lavado (solución salina tamponada con Tris (TB) que contenía Tween-20 al 0,05 %) y se añadió 100 µl/pocillo de Blocking One (NACAL TESQUE, INC., 03953-95), seguido de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron de nuevo tres veces con una solución de lavado, se añadieron 15 µl/pocillo de dos anticuerpos biespecíficos preparados en el Ejemplo 8 al pocillo en el que se inmovilizó la proteína TLR2 humana y al pocillo en el que se inmovilizó la proteína TLR4/MD2 humana. La dilución de estos anticuerpos se llevó a cabo utilizando un tampón de reacción donde se mezclaron PBS y Blocking One en cantidades iguales. Los anticuerpos se diluyeron en 13 pasos en un intervalo de 75,0 nM a 4,47 fM. Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, los pocillos se lavaron tres veces con una solución de lavado. Se añadieron 15 µl/pocillo de anticuerpo de adsorción cruzada de cadena ligera y pesada de IgG humana (BETHYL, A80-219P) diluido 4000 veces en tampón de reacción, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución de lavado y se añadieron 15 µl/pocillo de ELISA DE SUSTRATO DE PEROXIDASA TMB (MOSS, #TMBE-500). Después de 15 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 15 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 198-09595) a los pocillos en los que se inmovilizó la proteína TLR2 humana. Después de 5 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 15 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 M a los pocillos en los que se inmovilizó la proteína TLR4/MD2 humana. Se midió una absorbancia a 450 nm mediante la utilización de Safire2 (TECAN), y se calculó un valor de EC50 de cada anticuerpo para la proteína TLR2 humana y la proteína TLR4/MD2 humana. En relación con el cálculo de un valor de EC50, a partir de la forma de la curva sigmoidal en el gráfico que representa el valor de medición en un eje vertical y el valor de concentración de anticuerpo en un eje horizontal, el valor máximo de los valores de medición de cada anticuerpo puede determinar que el valor de medición de acuerdo con un aumento en la concentración de anticuerpos ha alcanzado un valor de convergencia establecido en 100 %, y el valor mínimo de los valores de medición de cada anticuerpo puede determinar que el valor de medición de acuerdo con una disminución en la concentración de anticuerpos ha alcanzado un valor de convergencia que establecido en 0 %. Los valores de EC50 calculados por el ajuste de curva logística de cuatro parámetros se muestran a continuación (Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Actividad de unión a la proteína TLR2 humana

| [Tabla 1]                            |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
|                                      | Valor de EC50 (pM) |
| ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano | 210,5              |
| ICU-1-IgY1 completamente humano      | 150,0              |

Tabla 2: Actividad de unión contra la proteína TLR4/MD2 humana

| [Tabla 2]                            |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
|                                      | Valor de EC50 (pM) |
| ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano | 521,7              |
| ICU-1-IgY1 completamente humano      | 493,5              |

Como resultado, se demostró que el ICU-1-IgY1 completamente humano y el ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano se unen tanto a la proteína TLR2 humana como a la proteína TLR4/MD2 humana.

**(Ejemplo 10: Ensayo de la inhibición de la producción de TNFα inducida por *Pseudomonas aeruginosa* inactivada del anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano en células mononucleares de sangre periférica humana normal)**

Con el fin de evaluar una actividad neutralizante del anticuerpo biespecífico preparado en el Ejemplo 8, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la producción de TNFα inducida por *Pseudomonas aeruginosa* inactivada utilizando células mononucleares de sangre periférica humana que expresan endógenamente TLR2 humano y TLR4/MD2 humano. *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias causales de la sepsis y se sabe que estimula el TLR2 y

el TLR4 en células mononucleares de sangre periférica humana para producir TNF $\alpha$  (Scand. J. Immunol., 2008, Vol. 67, n.º 2, págs. 193-203).

Se sembraron 30  $\mu$ l/pocillo de células mononucleares de sangre periférica humana normal (Lonza, Inc., CC-2702) a 1,875x10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa de 384 pocillos (Nunc Inc.), utilizando un medio RPMI1640 (Life Technologies) que contenía suero humano (Lonza, Inc., 14-490E) preparado adecuadamente a una concentración final del 10 al 30 %. De forma inmediatamente posterior, 10  $\mu$ l del anticuerpo purificado ICU-1-IgY1 completamente humano diluido en 12 pasos en un intervalo de 375 nM a 7,680 fM con un medio RPMI1640 o ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano diluido en 13 pasos en un intervalo de 500 nM a 10,24 fM con un medio RPMI1640 se añadió e incubó en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 30 minutos. Además, se diluyó la PAO-I de *Pseudomonas aeruginosa* termoinactivada de aislados clínicos con un medio RPMI1640 y se añadieron 10  $\mu$ l del mismo a una concentración final de 1x10<sup>6</sup> UFC (unidad formadora de colonias)/ml. Como control, se prepararon respectivamente un pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de un anticuerpo, y un pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de *Pseudomonas aeruginosa* inactivada. Después de cultivar durante la noche en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de cultivo utilizando un kit AlphaLISA TNF $\alpha$  disponible comercialmente (PerkinElmer Co., Ltd., AL208C). Además, se calcularon los valores de IC50 de cada anticuerpo para la producción de TNF $\alpha$  inducida por *Pseudomonas aeruginosa* inactivada. En relación con el cálculo de un valor de IC50, el pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de un anticuerpo se expuso como control de inhibición al 0 %, y el pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de *Pseudomonas aeruginosa* inactivada se expuso como control de inhibición al 100 %. Los valores de IC50 calculados por el ajuste de curva logística de cuatro parámetros se muestran a continuación (Tabla 3).

Tabla 3: Actividad inhibidora contra la producción de TNF $\alpha$  inducida por *Pseudomonas aeruginosa* inactivada en células mononucleares de sangre periférica humana normal

| [Tabla 3]                            |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
|                                      | Valor de IC50 (pM) |
| ICU-1-IgY1 completamente humano      | 40,00              |
| ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano | 17,17              |

Como resultado, se demostró que el ICU-1-IgY1 completamente humano y el ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano inhiben la producción de TNF $\alpha$  y tienen una actividad neutralizante contra el TLR2 humano y el TLR4 humano.

**(Ejemplo 11: Ensayo de inhibición de la producción de TNF $\alpha$  inducida por *Escherichia coli* inactivada en células mononucleares de sangre periférica humana normal)**

Se sembraron 30  $\mu$ l/pocillo de células mononucleares de sangre periférica humana normal (Lonza, Inc., CC-2702) a 1x10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa de 384 pocillos (Nunc Inc.), utilizando un medio RPMI1640 (Life Technologies) que contenía suero humano (Lonza, Inc., 14-490E) preparado adecuadamente a una concentración final del 10 %. De forma inmediatamente posterior, se añadieron 10  $\mu$ l de ICU-1-IgY1 completamente humano purificado o ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano diluido en 12 pasos en un intervalo de 2,500  $\mu$ M a 20,00 fM con un medio RPMI1640. Como anticuerpo comparativo, se añadió 10  $\mu$ l de una solución mixta de un anticuerpo 1E11.C2E3 anti-TLR4 humano purificado (Documento de patente 6) y un anticuerpo OPN305 anti-TLR2 humano (Documento de patente 3) diluidos en 13 pasos en un intervalo de 7,758  $\mu$ M a 52,96 fM con un medio RPMI1640. A esto le siguió una incubación en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 30 minutos. Además, se diluyó *Escherichia coli* (21006) termoinactivada de aislados clínicos con un medio RPMI1640 y se añadieron 10  $\mu$ l del mismo a una concentración final de 1x10<sup>6</sup> UFC/ml. Como control, se prepararon respectivamente un pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de un anticuerpo, y un pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de *Escherichia coli* inactivada. Después de cultivar durante la noche en condiciones de 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de cultivo utilizando un kit AlphaLISA TNF $\alpha$  disponible comercialmente (PerkinElmer Co., Ltd., AL208C). Además, se calcularon los valores de IC50 de cada anticuerpo para la producción de TNF $\alpha$  inducida por *Escherichia coli* inactivada. En relación con el cálculo de un valor de IC50, el pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de un anticuerpo se expuso como control de inhibición al 0 %, y el pocillo al que se había añadido un medio RPMI1640 en lugar de *Escherichia coli* inactivada se expuso como control de inhibición al 100 %. Los valores de IC50 calculados por el ajuste de curva logística de cuatro parámetros se muestran a continuación (Tabla 4 y Fig. 3).

Tabla 4: Actividad inhibidora contra la producción de TNF $\alpha$  inducida por *Escherichia coli* inactivada en células mononucleares de sangre periférica humana normal

[Tabla 4]

|                                      | Valor de IC50 (pM) |
|--------------------------------------|--------------------|
| ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano | 20,42              |
| ICU-1-IgY1 completamente humano      | 16,47              |
| 1E11.C2E3+OPN305                     | 209,2              |

Como resultado, se demostró que el ICU-1-IgY1 completamente humano y el ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano tienen una actividad inhibidora de la producción de TNF $\alpha$  de aproximadamente 10 veces mayor eficacia (potencia) que la utilización combinada de 1E11.C2E3 y OPN305.

#### Aplicabilidad industrial

El anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano de la presente invención es útil para prevenir y tratar diversas enfermedades que están implicadas en la patogénesis mediada por el TLR2 humano y el TLR4 humano. Además, los polinucleótidos, los vectores de expresión, las células hospedadora transformadas y los métodos para producir un anticuerpo biespecífico de la presente invención son útiles para producir el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano.

#### Texto libre de la lista de secuencias

En el encabezado numérico <223> de la lista de secuencias, se realiza la descripción de "Secuencia Artificial". Específicamente, la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias es la secuencia de bases de la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del ICU-1-IgY1 completamente humano, y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano codificada por la SEQ ID NO: 1. La secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO: 3 de la lista de secuencias es la secuencia de bases de la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano, y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano codificada por la SEQ ID NO: 3. La secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO: 5 de la lista de secuencias es la secuencia de bases de la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del ICU-1-IgY1 completamente humano y el ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano, y la cadena ligera del 31-SFS-2F3.m1 completamente humano y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano codificada por la SEQ ID NO: 5. La secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO: 7 de la lista de secuencias es la secuencia de bases de la cadena pesada del 31-5F5-2F3.m1 completamente humano, y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 de la lista de secuencias es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada codificada por la SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9 de la lista de secuencias es la secuencia de aminoácidos de un conector GS que conecta el extremo C de la región constante de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano y el extremo N del anticuerpo scFv anti-TLR4 humano incluido en el ICU-1-IgY1 completamente humano y el ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 de la lista de secuencias es la secuencia de aminoácidos de un conector GS que conecta la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera en el anticuerpo scFv anti-TLR4 humano incluido en el ICU-1-IgY1 completamente humano y el ICU-1-IgY1-LAsh completamente humano.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Nuevo anticuerpo biespecífico anti-TLR2 humano/TLR4 humano

<130> A15004A00

<150> JP2014-038438

<151> 28/02/2014

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2199

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> péptido de fusión de cadena pesada del anti-TLR2 humano\_scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo  
bienespecífico

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. (2199)

<400> 1

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gag gta cag ttg gtg gag agt gga ggc ggg ctg gtc caa cct ggt ggg | 48  |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| agt ctt cgc ctt tct tgt gca gcc tct ggg ttt acc ttc tca aac tat | 96  |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gcc atg tcc tgg gtg cgt cag gct ccc ggc aaa gga ctg gaa tgg gtt | 144 |
| Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gcc gcc att tat gga cgg ggc ggt tac aca aac tac gca gat tcc gtc | 192 |
| Ala Ala Ile Tyr Gly Arg Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aag gga agg ttc aca atc agc cga gac aat tcc aag aac acc ctc tac | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ctg cag atg aat agc ctg aga gcc gag gac act gct gtg tac tac tgc | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gct aaa gaa ggc ggt ggc tac agg gac tat ttt gat tat tgg ggc cag | 336 |
| Ala Lys Glu Gly Gly Gly Tyr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| ggg acc ttg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc | 384 |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc | 432 |

ES 2 709 996 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala |      |  |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |      |  |
| ctg | ggc | tgc | ctg | gtc | aag | gac | tac | ttc | ccc | gaa | ccg | gtg | acg | gtg | tcg | 480  |  |
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser |      |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |      |  |
| tgg | aac | tca | ggc | gcc | ctg | acc | agc | ggc | gtg | cac | acc | ttc | ccg | gct | gtc | 528  |  |
| Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val |      |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |      |  |
| cta | cag | tcc | tca | gga | ctc | tac | tcc | ctt | agt | agc | gtg | gtg | acc | gtg | ccc | 576  |  |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro |      |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |      |  |
| tcc | agc | agc | ttg | ggc | acc | cag | acc | tac | atc | tgc | aac | gtg | aat | cac | aag | 624  |  |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys |      |  |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |  |
| ccc | agc | aac | acc | aag | gtg | gac | aag | aaa | gtt | gag | ccc | aaa | tct | tgt | gac | 672  |  |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp |      |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |  |
| aaa | act | cac | aca | tgc | cca | ccg | tgc | cca | gca | cct | gaa | ctc | ctg | ggg | gga | 720  |  |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly |      |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |  |
| ccg | tca | gtc | ttc | ctc | ttc | ccc | cca | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | atg | atc | 768  |  |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |      |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |      |  |
| tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc | aca | tgc | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | cac | gaa | 816  |  |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu |      |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |      |  |
| gac | cct | gag | gtc | aag | ttc | aac | tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | gtg | cat | 864  |  |
| Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |      |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |  |
| aat | gcc | aag | aca | aag | ccg | cgg | gag | gag | cag | tac | aac | agc | acg | tac | cgt | 912  |  |
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg |      |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |  |
| gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc | gtc | ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | 960  |  |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys |      |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |  |
| gag | tac | aag | tgc | aag | gtc | tcc | aac | aaa | gcc | ctc | cca | gcc | ccc | atc | gag | 1008 |  |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu |      |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |  |
| aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc | aaa | ggg | cag | ccc | cga | gaa | cca | cag | gtg | tac | 1056 |  |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr |      |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |  |
| acc | ctg | ccc | cca | tcc | cgg | gat | gag | ctg | acc | aag | aac | cag | gtc | agc | ctg | 1104 |  |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu |      |  |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |  |
| acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc | ttc | tat | ccc | agc | gac | atc | gcc | gtg | gag | tgg | 1152 |  |
| Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp |      |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |  |

# ES 2 709 996 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg<br>Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val<br>385 390 395 400 | 1200 |
| ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac<br>Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp<br>405 410 415     | 1248 |
| aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat<br>Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His<br>420 425 430     | 1296 |
| gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg<br>Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro<br>435 440 445     | 1344 |
| ggt aaa gga ggt ggc gga tcc ggt ggc ggt gga agt ggc ggt ggt ggg<br>Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly<br>450 455 460     | 1392 |
| tcc gga ggc ggt ggc tct ggg ggt ggc gga tct ggc gga ggc ggt tcc<br>Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser<br>465 470 475 480 | 1440 |
| ggt ggg ggc ggc agt gga ggt ggc gga tct gaa gtg cag ctg gtg gag<br>Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu<br>485 490 495     | 1488 |
| tct ggg gga ggc ctg gtg cag cct ggc gag tcc ctg aga ctg tcc tgt<br>Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys<br>500 505 510     | 1536 |
| gca gcc tct gga ttc acc ttt gat act tat gcc atg cac tgg gtc cgg<br>Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg<br>515 520 525     | 1584 |
| cag gct cca ggg aag tgc ctg gag tgg gtc gcc ggt att agt tgg aat<br>Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn<br>530 535 540     | 1632 |
| agt ggt aac atc ggc tat gcc gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc<br>Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile<br>545 550 555 560 | 1680 |
| tcc aga gac aac tcc aag aac acc ctg tac ctg cag atg aac agt ctg<br>Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu<br>565 570 575     | 1728 |
| aga gcc gag gac acc gcc gtg tat tac tgt gca aaa gac tgg gat aac<br>Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Asp Asn<br>580 585 590     | 1776 |
| tgg aac ctg ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc<br>Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser<br>595 600 605     | 1824 |
| tca gga ggc ggt ggt agc ggt ggg ggt ggc tct ggc gga ggt ggc tcc<br>Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser<br>610 615 620     | 1872 |
| gac atc cag atg acc cag tct cct tcc tcc ctg tct gca tct gtg gga<br>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly<br>625 630 635 640 | 1920 |

# ES 2 709 996 T3

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg 1968  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
 645 650 655

ctg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctg ctg atc 2016  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 660 665 670

tat aag gcc tct agt ctg gaa agt ggg gtc cca tcc agg ttc agc ggc 2064  
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 675 680 685

agt gga tct ggg aca gac ttc act ctg acc atc agc agc ctg cag cct 2112  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 690 695 700

gag gat ttt gca act tat tac tgc cag cag tat agt agt tat tcc tgg 2160  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Trp  
 705 710 715 720

acc ttc ggc tgc ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt tga 2199  
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 725 730

<210> 2

<211> 732

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de fusión de cadena pesada del anti-TLR2 humano\_scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo  
 biespecífico

<400> 2

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Tyr Gly Arg Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Gly Gly Gly Tyr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

# ES 2 709 996 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | 115 | 120 | 125 |
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | 130 | 135 | 140 |
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | 145 | 150 | 155 |
| Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | 165 | 170 | 175 |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | 180 | 185 | 190 |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | 195 | 200 | 205 |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | 210 | 215 | 220 |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | 225 | 230 | 235 |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | 245 | 250 | 255 |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | 260 | 265 | 270 |
| Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | 275 | 280 | 285 |
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | 290 | 295 | 300 |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | 305 | 310 | 315 |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | 325 | 330 | 335 |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | 340 | 345 | 350 |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu |     |     |     |

# ES 2 709 996 T3

|                                                                 |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 355                                                             |     | 360 |     | 365 |
| Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp |     |     |     |     |
| 370                                                             |     | 375 |     | 380 |
| Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val |     |     |     |     |
| 385                                                             |     | 390 |     | 395 |
|                                                                 |     |     |     | 400 |
| Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp |     |     |     |     |
|                                                                 | 405 |     | 410 | 415 |
| Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His |     |     |     |     |
|                                                                 | 420 |     | 425 | 430 |
| Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro |     |     |     |     |
|                                                                 | 435 |     | 440 | 445 |
| Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |     |     |
| 450                                                             |     | 455 |     | 460 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser |     |     |     |     |
| 465                                                             |     | 470 |     | 475 |
|                                                                 |     |     |     | 480 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu |     |     |     |     |
|                                                                 | 485 |     | 490 | 495 |
| Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys |     |     |     |     |
|                                                                 | 500 |     | 505 | 510 |
| Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg |     |     |     |     |
|                                                                 | 515 |     | 520 | 525 |
| Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn |     |     |     |     |
| 530                                                             |     | 535 |     | 540 |
| Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile |     |     |     |     |
| 545                                                             |     | 550 |     | 555 |
|                                                                 |     |     |     | 560 |
| Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu |     |     |     |     |
|                                                                 | 565 |     | 570 | 575 |
| Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Asp Asn |     |     |     |     |
|                                                                 | 580 |     | 585 | 590 |
| Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser |     |     |     |     |
|                                                                 | 595 |     | 600 | 605 |

# ES 2 709 996 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
610 615 620

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
625 630 635 640

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
645 650 655

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
660 665 670

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
675 680 685

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
690 695 700

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Trp  
705 710 715 720

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
725 730

<210> 3

<211> 2199

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de fusión de cadena pesada del anti-TLR2 humano\_scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo  
bienespecífico

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2199)

<400> 3

gag gta cag ttg gtg gag agt gga ggc ggg ctg gtc caa cct ggt ggg 48  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

agt ctt cgc ctt tct tgt gca gcc tct ggg ttt acc ttc tca aac tat 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

gcc atg tcc tgg gtg cgt cag gct ccc ggc aaa gga ctg gaa tgg gtt 144  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

gcc gcc att tat gga cgg ggc ggt tac aca aac tac gca gat tcc gtc 192  
Ala Ala Ile Tyr Gly Arg Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| aag gga agg ttc aca atc agc cga gac aat tcc aag aac acc ctc tac<br>Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr<br>65 70 75 80     | 240 |
| ctg cag atg aat agc ctg aga gcc gag gac act gct gtg tac tac tgc<br>Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<br>85 90 95        | 288 |
| gct aaa gaa ggc ggt ggc tac agg gac tat ttt gat tat tgg ggc cag<br>Ala Lys Glu Gly Gly Gly Tyr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln<br>100 105 110     | 336 |
| ggg acc ttg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc<br>Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val<br>115 120 125     | 384 |
| ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc<br>Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala<br>130 135 140     | 432 |
| ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg<br>Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser<br>145 150 155 160 | 480 |
| tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc<br>Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val<br>165 170 175     | 528 |
| cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc gtg ccc<br>Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro<br>180 185 190     | 576 |
| tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag<br>Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys<br>195 200 205     | 624 |
| ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac<br>Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp<br>210 215 220     | 672 |
| aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gct ggg gga<br>Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly<br>225 230 235 240 | 720 |
| ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg gcc<br>Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala<br>245 250 255     | 768 |
| tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa<br>Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu<br>260 265 270     | 816 |
| gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat<br>Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His<br>275 280 285     | 864 |
| aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt<br>Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg<br>290 295 300     | 912 |
| gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag<br>Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys<br>305 310 315 320 | 960 |

# ES 2 709 996 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag<br>Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu<br>325 330 335     | 1008 |
| aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac<br>Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr<br>340 345 350     | 1056 |
| acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg<br>Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu<br>355 360 365     | 1104 |
| acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg<br>Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp<br>370 375 380     | 1152 |
| gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg<br>Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val<br>385 390 395 400 | 1200 |
| ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac<br>Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp<br>405 410 415     | 1248 |
| aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat<br>Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His<br>420 425 430     | 1296 |
| gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg<br>Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro<br>435 440 445     | 1344 |
| ggg aaa gga ggt ggc gga tcc ggt ggc ggt gga agt ggc ggt ggt ggg<br>Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly<br>450 455 460     | 1392 |
| tcc gga ggc ggt ggc tct ggg ggt ggc gga tct ggc gga ggc ggt tcc<br>Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser<br>465 470 475 480 | 1440 |
| ggg gga ggc ggc agt gga ggt ggc gga tct gaa gtg cag ctg gtg gag<br>Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu<br>485 490 495     | 1488 |
| tct ggg gga ggc ctg gtg cag cct ggc gag tcc ctg aga ctg tcc tgt<br>Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys<br>500 505 510     | 1536 |
| gca gcc tct gga ttc acc ttt gat act tat gcc atg cac tgg gtc cgg<br>Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg<br>515 520 525     | 1584 |
| cag gct cca ggg aag tgc ctg gag tgg gtc gcc ggt att agt tgg aat<br>Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn<br>530 535 540     | 1632 |
| agt ggt aac atc ggc tat gcc gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc<br>Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile<br>545 550 555 560 | 1680 |
| tcc aga gac aac tcc aag aac acc ctg tac ctg cag atg aac agt ctg<br>Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu                    | 1728 |

# ES 2 709 996 T3

| 565                                                             | 570                             | 575 |      |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----|------|
| aga gcc gag gac acc gcc gtg tat                                 | tac tgt gca aaa gac tgg gat aac |     | 1776 |
| Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr                                 | Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Asp Asn |     |      |
| 580                                                             | 585                             | 590 |      |
| tgg aac ctg ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc |                                 |     | 1824 |
| Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser |                                 |     |      |
| 595                                                             | 600                             | 605 |      |
| tca gga ggc ggt ggt agc ggt ggg ggt ggc tct ggc gga ggt ggc tcc |                                 |     | 1872 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser     |                                 |     |      |
| 610                                                             | 615                             | 620 |      |
| gac atc cag atg acc cag tct cct tcc tcc ctg tct gca tct gtg gga |                                 |     | 1920 |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |                                 |     |      |
| 625                                                             | 630                             | 635 | 640  |
| gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg |                                 |     | 1968 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp |                                 |     |      |
| 645                                                             | 650                             | 655 |      |
| ctg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctg ctg atc |                                 |     | 2016 |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile |                                 |     |      |
| 660                                                             | 665                             | 670 |      |
| tat aag gcc tct agt ctg gaa agt ggg gtc cca tcc agg ttc agc ggc |                                 |     | 2064 |
| Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |                                 |     |      |
| 675                                                             | 680                             | 685 |      |
| agt gga tct ggg aca gac ttc act ctg acc atc agc agc ctg cag cct |                                 |     | 2112 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro |                                 |     |      |
| 690                                                             | 695                             | 700 |      |
| gag gat ttt gca act tat tac tgc cag cag tat agt agt tat tcc tgg |                                 |     | 2160 |
| Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Trp |                                 |     |      |
| 705                                                             | 710                             | 715 | 720  |
| acc ttc ggc tgc ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt tga             |                                 |     | 2199 |
| Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg                 |                                 |     |      |
| 725                                                             | 730                             |     |      |

<210> 4

<211> 732

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido de fusión de cadena pesada del anti-TLR2 humano\_scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo  
bienespecífico

<400> 4

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |
| 1 5 10 15                                                       |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |
| 20 25 30                                                        |

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

# ES 2 709 996 T3

| 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Ile | Tyr | Gly | Arg | Gly | Gly | Tyr | Thr | Asn | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala | Lys | Glu | Gly | Gly | Gly | Tyr | Arg | Asp | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |

# ES 2 709 996 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | 290 | 295 | 300 |     |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | 325 | 330 | 335 |     |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | 340 | 345 | 350 |     |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | 355 | 360 | 365 |     |
| Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | 370 | 375 | 380 |     |
| Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | 405 | 410 | 415 |     |
| Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | 420 | 425 | 430 |     |
| Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | 435 | 440 | 445 |     |
| Gly | Lys | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | 450 | 455 | 460 |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | 465 | 470 | 475 | 480 |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | 485 | 490 | 495 |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Glu | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | 500 | 505 | 510 |     |
| Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asp | Thr | Tyr | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | 515 | 520 | 525 |     |
| Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Cys | Leu | Glu | Trp | Val | Ala | Gly | Ile | Ser | Trp | Asn | 530 | 535 | 540 |     |

# ES 2 709 996 T3

Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
545 550 555 560

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
565 570 575

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Asp Asn  
580 585 590

Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
595 600 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
610 615 620

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
625 630 635 640

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
645 650 655

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
660 665 670

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
675 680 685

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
690 695 700

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Trp  
705 710 715 720

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
725 730

<210> 5

<211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico, y cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(660)

<400> 5

# ES 2 709 996 T3

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| gat gtc cag atg acc cag agt cct tca tca ctg tcc gca agc gtg gga<br>Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly<br>1 5 10 15       | 48  |
| gac agg gtc acc atc aca tgc cgg tcc agc cag tcc ctg gtg ttc agc<br>Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Ser<br>20 25 30        | 96  |
| gat gga aac acc tac ctg aat tgg ttt cag cag aag ccc ggg aaa gcc<br>Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala<br>35 40 45        | 144 |
| cct aag agg ctg atc tat aaa gtg tct aac aga gac agt ggt gtc ccc<br>Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro<br>50 55 60        | 192 |
| tct agg ttc tct ggc agt gga tca ggg acc gac ttt act ctg acc att<br>Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile<br>65 70 75 80     | 240 |
| tct agt ctg cag cca gag gat ttc gcc aca tac tat tgt atg cag ggc<br>Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Gly<br>85 90 95        | 288 |
| gct cac tgg ccc ctg aca ttt ggt cag ggc act aaa gtc gaa att aag<br>Ala His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<br>100 105 110     | 336 |
| cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag<br>Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu<br>115 120 125     | 384 |
| cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc<br>Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe<br>130 135 140     | 432 |
| tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa<br>Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln<br>145 150 155 160 | 480 |
| tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc<br>Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser<br>165 170 175     | 528 |
| acc tac agc ctg agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag<br>Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu<br>180 185 190     | 576 |
| aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg<br>Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser<br>195 200 205     | 624 |
| ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag<br>Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys<br>210 215                                             | 660 |

<210> 6  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

# ES 2 709 996 T3

<223> cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico, y cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano

<400> 6

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Ser  
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 7

<211> 1353

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1353)

10

<400> 7

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gag gta cag ttg gtg gag agt gga ggc ggg ctg gtc caa cct ggt ggg | 48  |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| agt ctt cgc ctt tct tgt gca gcc tct ggg ttt acc ttc tca aac tat | 96  |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gcc atg tcc tgg gtg cgt cag gct ccc ggc aaa gga ctg gaa tgg gtt | 144 |
| Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gcc gcc att tat gga cgg ggc ggt tac aca aac tac gca gat tcc gtc | 192 |
| Ala Ala Ile Tyr Gly Arg Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aag gga agg ttc aca atc agc cga gac aat tcc aag aac acc ctc tac | 240 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ctg cag atg aat agc ctg aga gcc gag gac act gct gtg tac tac tgc | 288 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gct aaa gaa ggc ggt ggc tac agg gac tat ttt gat tat tgg ggc cag | 336 |
| Ala Lys Glu Gly Gly Gly Tyr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| ggg acc ttg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc | 384 |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc | 432 |
| Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg | 480 |
| Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc | 528 |
| Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc gtg ccc | 576 |
| Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag | 624 |
| Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys |     |

# ES 2 709 996 T3

| 195                                                                                                                                                   | 200 | 205 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac<br>Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp<br>210 215 220     |     |     | 672  |
| aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga<br>Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly<br>225 230 235 240 |     |     | 720  |
| ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc<br>Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile<br>245 250 255     |     |     | 768  |
| tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa<br>Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu<br>260 265 270     |     |     | 816  |
| gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat<br>Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His<br>275 280 285     |     |     | 864  |
| aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt<br>Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg<br>290 295 300     |     |     | 912  |
| gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag<br>Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys<br>305 310 315 320 |     |     | 960  |
| gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag<br>Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu<br>325 330 335     |     |     | 1008 |
| aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac<br>Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr<br>340 345 350     |     |     | 1056 |
| acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg<br>Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu<br>355 360 365     |     |     | 1104 |
| acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg<br>Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp<br>370 375 380     |     |     | 1152 |
| gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg<br>Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val<br>385 390 395 400 |     |     | 1200 |
| ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac<br>Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp<br>405 410 415     |     |     | 1248 |
| aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat<br>Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His<br>420 425 430     |     |     | 1296 |
| gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg<br>Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro<br>435 440 445     |     |     | 1344 |
| ggt aaa tga                                                                                                                                           |     |     | 1353 |

Gly Lys  
450

<210> 8  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano

<400> 8

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Tyr Gly Arg Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Gly Gly Gly Tyr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

# ES 2 709 996 T3

| 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |

# ES 2 709 996 T3

Gly Lys  
450

5 <210> 9  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> conector  
<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
35 40

15 <210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> conector  
<400> 10

25 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende:

- 5 1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 50 a 66 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 99 a 109 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que comprende la CDR1 que  
10 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 24 a 39 de la SEQ ID NO: 6, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 55 a 61 de la SEQ ID NO: 6 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 94 a 102 de la SEQ ID NO: 6; y  
15 2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 521 a 525 de la SEQ ID NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 540 a 556 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 589 a 598 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que comprende la CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 648 a 658 de la SEQ ID  
20 NO: 4, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 674 a 680 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 713 a 721 de la SEQ ID NO: 4.

2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de los siguientes (1) o (2):

- 25 (1) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende  
1) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena  
30 ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y  
2) una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de  
35 cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4; o

(2) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que es un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraduccional del anticuerpo biespecífico de (1).

40 3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, que se selecciona de los siguientes (1) o (2):

- (1) un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo anti-TLR2 humano y un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano, en donde  
45 el anticuerpo anti-TLR2 humano es un anticuerpo IgG y comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 113 de la SEQ ID NO: 6, y  
50 el fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano es un fragmento de región variable de cadena única (scFv) y comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 609 de la SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 625 a 732 de la SEQ ID NO: 4; o  
(2) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que es un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraduccional del anticuerpo biespecífico de (1).

55 4. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 3, que se selecciona de los siguientes (1) o (2):

- (1) un anticuerpo biespecífico que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano en la que el extremo N de un fragmento de anticuerpo anti-TLR4 humano que  
60 consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 491 a 732 de la SEQ ID NO: 4 está conectado a través de un conector al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 450 de la SEQ ID NO: 4, y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; o  
65 (2) un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que es un anticuerpo biespecífico que procede de una modificación postraduccional del anticuerpo biespecífico de (1).

5. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

6. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene una modificación de ácido glutámico del número de aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 4 a ácido pirroglutámico, y una cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

7. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-TLR2 humano, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR4 humano, y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2.

8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4.

9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5.

10. Una célula hospedadora seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) o (b):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4; o

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4.

11. Una célula hospedadora seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) o (b):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5; o

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5.

12. Un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar una(s) célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que

comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 4.

13. Un método para producir un anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano, que comprende cultivar una(s) célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) para expresar el anticuerpo biespecífico que se une al TLR2 humano y al TLR4 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la fusión de cadena pesada del anticuerpo anti-TLR2 humano-anticuerpo scFv anti-TLR4 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-TLR2 humano del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5.

14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5 y/o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

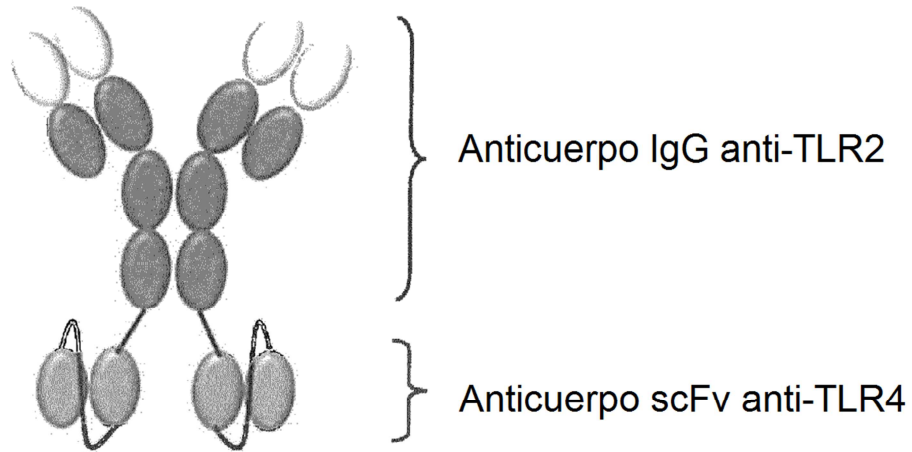


Fig. 2

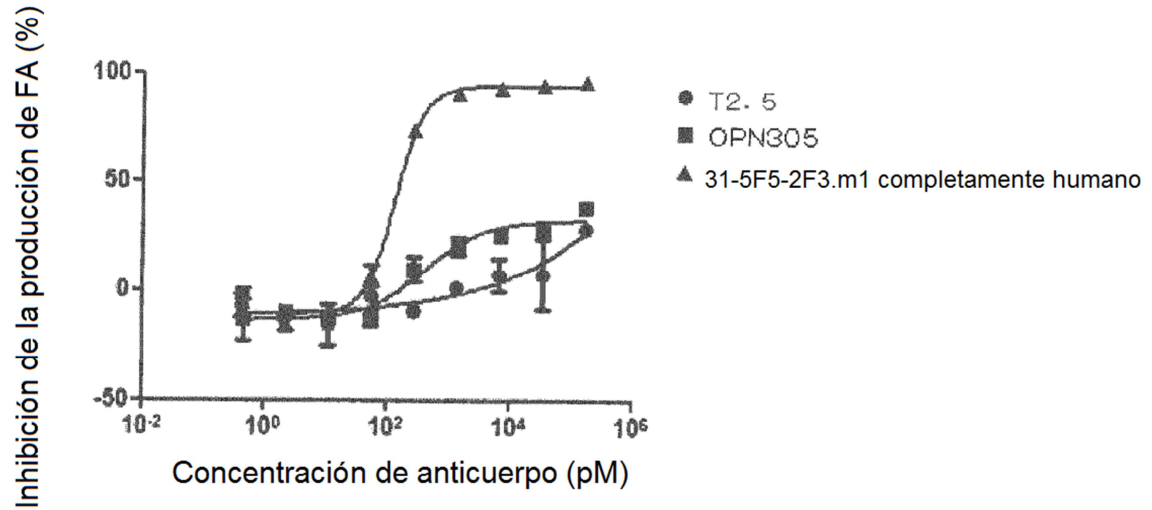


Fig. 3

