

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 378**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2012 PCT/US2012/020717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12096917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2012 E 12734097 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2663330**

54 Título: **Anticuerpos anti-TLR4 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

10.01.2011 US 201161431191 P

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

31.07.2019

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE S.A. (100.0%)
14 ch. Des Aulx, Plan-Les-Ouates
1228 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**GIOVANNONI, LAURIANNE SANTA;
KOSCO-VILBOIS, MARIE;
DE GRAAF, KATRIEN, L.;
BOSCO, DOMENICO y
BERNEY, THIERRY**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 721 378 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-TLR4 y métodos de uso de los mismos

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 61/431.191, presentada el 10 de enero de 2011.

10 Campo de la invención

Esta invención se refiere en general con anticuerpos que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR-4), y a métodos para usar los anticuerpos anti-TLR4 como compuestos terapéuticos y a métodos para usar los anticuerpos anti-TLR4 en métodos para prevenir el rechazo de trasplantes y/o prolongación de la supervivencia del material biológico trasplantado.

Antecedentes de la invención

20 El trasplante de órganos y tejidos es el enfoque clínico preferido para tratar a pacientes que sufren insuficiencia orgánica o complicaciones derivadas de enfermedades de órganos y tejidos específicos. Sin embargo, los pacientes trasplantados se enfrentan a una terapia inmunosupresora de por vida y al riesgo de perder el nuevo órgano debido al rechazo. Aunque se han realizado mejoras en el proceso de trasplante, el rechazo sigue siendo la complicación más común después del trasplante y es la principal fuente de morbilidad y mortalidad. El rechazo del trasplante se produce cuando el sistema inmunitario del receptor de un trasplante ataca el órgano o tejido trasplantado. El rechazo es una respuesta inmune adaptativa y está mediada a través de mecanismos inmunitarios tanto humorales como mediados por linfocitos T.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos para promover la tolerancia al trasplante de órganos o tejidos en pacientes.

30 Sumario de la invención

La invención proporciona métodos para inhibir el rechazo y/o la prolongación de la supervivencia del material biológico trasplantado en un sujeto usando anticuerpos que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4), como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona métodos para inhibir el rechazo y/o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en un sujeto poniendo en contacto el material biológico que se va a trasplantar con un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a un polipéptido del receptor 4 tipo Toll (TLR4) para producir una composición trasplantable, e implantar la composición trasplantable en una ubicación deseada en el sujeto.

En algunas realizaciones, los métodos también incluyen la etapa de administrar al sujeto que se ha implantado con el material biológico una o más dosis adicionales de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a TLR4, en donde el anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para prevenir el rechazo del trasplante o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en el sujeto. La dosis adicional de anticuerpo anti-TLR4 se puede administrar durante el trasplante, después del trasplante o ambos.

La invención proporciona métodos para inhibir el rechazo o la prolongación de la supervivencia del material biológico trasplantado en un sujeto poniendo en contacto el material biológico que se va a trasplantar con un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a un polipéptido del receptor 4 tipo Toll (TLR4) para producir una composición trasplantable, implantando la composición trasplantable en una ubicación deseada en el sujeto, y administrando al sujeto una o más dosis adicionales de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a TLR4, en donde el anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para prevenir el rechazo del trasplante o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en el sujeto. La dosis adicional de anticuerpo anti-TLR4 se puede administrar durante el trasplante, después del trasplante o ambos.

La invención también proporciona métodos para tratar a un sujeto que ha recibido o recibirá un trasplante de material biológico administrando al sujeto una o más dosis de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a un polipéptido del receptor 4 tipo Toll (TLR4), en el que el anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para prevenir el rechazo del trasplante o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en el sujeto.

65 En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

En algunas realizaciones, el polipéptido de TLR4 es un polipéptido de TLR4 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido de TLR4 humano comprende la secuencia de aminoácidos:

```

1 mmsasrlagt lipamaflsc vrpeswepcv evvpnityqc melnfykipd nlpfstknld
61 lsfnpplrhlq sysffsfpel qvldlsrcei qtiedgayqs lshlstliit gnpiqslalg
121 afsglsslqk lvavetnlas lenfpighlk tlkelnvahn liqsfklpey fsnltnlehl
181 dlssnkiqsi yctdlrvlhq mpllnlsldi slnppmfiqp gafkeirlhk ltlrnnfdsi
241 nvmktciqgl aplevhrvlv gefrnegnle kfdkalegl cnltieefrl ayldyylddi
301 idlfncltnv ssfslsvsvti ervkdfsynf gwqhlelvnc kfgqfptkl kskrltfts
361 nkggnafsev dlpslefldl srnglsfkgc csqsdfgtts lkyldlsfng vitmssnflg
421 leqlehlfdq hsnlkqmsef svflslrnl i yldishtthr vafngifngl sslevlkmag
481 nsfgenflpd iftelrnlft ldlsqcqleq lsptafnsls slqvlmshn nffsltdtffy
541 kclnslqvld yslnhimtsk kqelqhfps laflnltqnd factcehqsf lqwikdqrql
601 lvevermecca tpsdkqgmpv lslnitcqmn ktiigvsvls vlvvsvvavl vykfyfhml
661 lagcikygrg eniydafviy ssqdedwvrn elvknleegv ppfqclchyr dfipgvaiaa
721 niihegfhks rkvivvvsqh fiqsrwcife yeiaqtqwfl ssragiifiv lqkvektllr
781 qqvelyrlls rntyleweds vlgrhifwrr lrkalldgks wnpegtvgtg cnwqeatsi (SEQ
ID NO: 11)

```

5 En algunas realizaciones, el material biológico a trasplantar es una o más células o tipos de células, uno o más tejidos o tipos de tejidos, o un órgano o parte del mismo. Por ejemplo, el material biológico a trasplantar es material biológico alogénico.

10 En algunas realizaciones, el material biológico a trasplantar es de células de islotes. En algunas realizaciones, las células de islotes son células alogénicas de islotes.

En algunas realizaciones, el material biológico a trasplantar es o se deriva de riñón, páncreas, hígado o intestino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el material biológico a trasplantar es o se deriva de uno o más hepatocitos.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 que se usa para entrar en contacto con el material biológico antes del trasplante es el mismo anticuerpo anti-TLR4 que se administra al sujeto durante y/o después de que el material biológico se haya trasplantado.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 que se usa para ponerse en contacto con el material biológico antes del trasplante es un anticuerpo diferente al anticuerpo anti-TLR4 que se administra al sujeto durante y/o después de que el material biológico se haya trasplantado.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a TLR4 se administra durante y/o después del trasplante en combinación con uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 y el agente o agentes adicionales se administran simultáneamente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TLR4 y el agente o agentes adicionales pueden formularse en una única composición o administrarse como dos o más composiciones separadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 y el agente o agentes adicionales se administran secuencialmente.

30 En algunas realizaciones, el agente o agentes adicionales son agentes inmunosupresores. Por ejemplo, el agente o agentes adicionales se seleccionan de metotrexato, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, everolimus, un corticosteroide, globulina antitímocítica, Infliximab, Etanercept y Adalimumab. El agente o agentes adicionales también pueden incluir cualquier compuesto u otra molécula que exhiba un efecto inmunosupresor.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 es, un anticuerpo monoclonal de ratón, quimérico, humanizado, completamente humano, anticuerpos de dominio, de cadena sencilla, fragmentos F_{ab}, F_{ab'} y F_{(ab')₂}, scFv o una biblioteca de expresión de Fab. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TLR4 también se unen al complejo del receptor humano TLR4/MD-2.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 comprende una región 1 variable determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR1 V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de GGYSWH (SEQ ID NO: 1); una región CDR2 V_H que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO: 2); y una región CDR3 V_H que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de KDPSDAFPY (SEQ ID NO: 3); una región variable determinante de la complementariedad de la cadena ligera 1 (CDR1 V_L) que comprende una secuencia de

aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de RASQSISDHLH (SEQ. ID. ID NO: 4); una región CDR2 VL que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de YASHAIS (SEQ ID NO: 5); y una región CDR3 VL que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de QQGHSPFLT (SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 comprende además una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada

5 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWNGYIHYSGYTDNFNPSLKTRITISRDTSKN
 10 QFSLKLSSVTAVDTAVYYCARKDPSDAFPYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7) y una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSISDHLHWYQQKPKDQSPKLLIKYASHAISGVPSPRFSGSGSGTDFTLTINSLEA
 15 EDAATYYCQQGHSPFLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8). En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 comprende además una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada
 20 MGWSWIFLFLSGTAGVHCQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWI
 RQPPGKGLEWNGYIHYSGYTDNFNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYY
 CARKDPSDAFPYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT
 25 KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGTEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSSKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 9) y una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 92%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de cadena ligera

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSISDHLHWYQQ
 KPDQSPKLLIKYASHAISGVPSPRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSPFLT
 FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVADNL
 30 QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 10).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 o su fragmento inmunológicamente activo es o se deriva de un anticuerpo como se describe en el documento PCT/IB2005/004206, presentado el 14 de junio de 2005 y publicado como el documento WO 2007/110678.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 o el fragmento inmunológicamente activo del mismo es o se deriva de un anticuerpo como se describe en la solicitud PCT PCT/IB2008/003978, presentada el 14 de mayo de 2008 y publicada como el documento WO 2009/101479.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 o su fragmento inmunológicamente activo es o se deriva del anticuerpo anti-TLR4 conocido como HTA125, que se describe, por ejemplo, en Shimazu, et al., J. Exp. Med., Vol. 189: 1777-1782 (1999); Nijhuis et al., Clin. Diag. Lab. Immunol., Vol. 10 (4): 558-63 (2003); y Pivarcsi et al., Intl. Immunopharm., Vol. 15 (6): 721-730 (2003).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 o su fragmento inmunológicamente activo es o se deriva de un anticuerpos de dominio tal como, por ejemplo, los anticuerpos de dominio que se unen a TLR4 descritos en la solicitud PCT PCT/EP2009/055926, presentada el 15 de mayo de 2009 y publicado como el documento WO 2009/13848.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TLR4 o su fragmento inmunológicamente activo se une a un epítipo que comprende uno o más residuos de aminoácidos en TLR4 humano entre los residuos 289 y 375 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 328 y 329 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 349 hasta 351 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 369 a 371 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 328, 329, 349 a 351 y 369 a 371 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 293 a 295 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 296 y 297 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 319 a 321 de la SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo que comprende al menos los residuos 293 a 295, 296, 297 y 319 a 321 de la SEQ ID NO: 11.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden incluir un anticuerpo de la invención y un vehículo. Estas

composiciones farmacéuticas pueden incluirse en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.
Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que representa la proliferación de células de ganglios linfáticos de ratón en IMLR (células positivas para Ki 67). n = 3; C = PBMC, I = islotes, CI = isotipo de control.

La Figura 2 es un gráfico que muestra células secretoras de IFN γ de ratón en IMLR (número de puntos). n = 3; C = PBMC, I = islotes, CI = isotipo de control.

La Figura 3 es un gráfico que representa la proliferación de PBMC humanas en IMLR (células positivas para Ki 67). n = 3; C = PBMC, I = islotes, CI = isotipo de control.

La Figura 4 es un gráfico que representa células secretoras de IFN γ humano en IMLR (número de puntos). n = 3; C = PBMC, I = islotes, CI = isotipo de control.

La Figura 5 es un gráfico que representa glucemia en sangre de ratones trasplantados (glc mM) donde se trasplantaron ratones C57BL/6 diabéticos debajo de la cápsula renal izquierda con seiscientos IEQ y se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana, desde el día 0 hasta el día 28, con PBS (n = 3), isotipo de control (n = 6) o 5E3 (n = 5).

La Figura 6 es un gráfico que representa la supervivencia del injerto en ratones trasplantados donde se trasplantaron ratones C57BL/6 diabéticos debajo de la cápsula renal izquierda con seiscientos IEQ y se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana, desde el día 0 al día 28, con PBS (n = 3), isotipo de control (n = 6) o 5E3 (n = 5). El rechazo del injerto se definió como tres glucemias en sangre consecutivas > 18 mM.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll, y más específicamente, a TLR4 humana. Estos anticuerpos anti-TLR4 se usan en métodos para inhibir el rechazo y/o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en un sujeto utilizando anticuerpos que se unen específicamente al receptor 4 tipo Toll (TLR4). Los anticuerpos anti-TLR4 incluyen anticuerpos que se unen al complejo receptor de TLR4/MD-2 humano y también se unen a TLR4 independientemente de la presencia de MD-2.

Los ejemplos de anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, los anticuerpos anti-TLR4 descritos en el documento PCT/IB2005/004206, presentado el 14 de junio de 2005 y publicado como el documento WO 2007/110678, los anticuerpos anti-TLR4 descritos en la solicitud PCT PCT/IB2008/003978, presentada el 14 de mayo de 2008 y publicada como el documento WO 2009/101479, y anticuerpos disponibles comercialmente, tales como HTA125.

Los ejemplos de anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, el anticuerpo al que se hace referencia en este documento como NI-0101, al que también se hace referencia en el presente documento y en las Figuras como "hu15C1", que se une al complejo humano TLR4/MD2 y también se une a TLR4, independientemente de la presencia de MD-2. Las secuencias del anticuerpo NI-0101 (hu15c1) se muestran a continuación, con las secuencias de CDR subrayadas en las secuencias de aminoácidos de VH y VL:

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de NI-0101:

```
ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTACATTGCCAGGTGCAGCTTCAGGAG
TCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCGTGCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGT
GGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGT
TACACTGACTTCAACCCCTCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATCCGTCGGACGCTTTCCCT
TACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTC
CTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAAATGCAAGGTCTCCAGTAAAGCTTTCCCTGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCCG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO: 12)
```

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de NI-0101:

MGWSWIFLFLLSGTAGVHCQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCVAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSG
YTDNPSLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCAR**KDPSDAFPY**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
 ALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de NI-0101:

5 ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGTCAGTAACTACAGGTGTCCACTCCGAAATTGTGTTGACGCAG
 TCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCATCACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGAC
 CACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATCAGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCT
 GGGTCCCATCGAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAA
 GATGCTGCAACGTATTACTGTCAGCAGGGTCAACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATC
 AAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT
 GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
 GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
 AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 13)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de NI-0101:

10 MEWSWVFLFLLSVTTGVHSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAIS
 GVPSRFGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 10)

El anticuerpo NI-0101 (hu15c1) incluye las CDR de VH que tienen las secuencias GGYSWH (SEQ ID NO: 1),
 YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO: 2) y KDPSDAFPY (SEQ ID NO: 3) y las CDR de VL que tienen las secuencias
 RASQISDHLH (SEQ ID NO: 4), YASHAIS (SEQ ID NO: 5) y QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 6).

15 Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de las regiones variables de cadena pesada (VH) y variables de
 cadena ligera (VL) de los anticuerpos anti-TLR4/MD2 se muestran a continuación. Los aminoácidos que abarcan las
 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) según lo definido por Chothia et al., 1989, E.A. Kabat et al.,
 1991 se destacan en el texto subrayado y en cursiva a continuación. (Véase Chothia, C., et al., Nature 342: 877-883
 20 (1989); Kabat, EA, et al., Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, Departamento de Salud y
 Servicios Humanos de los Estados Unidos, Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos (1991)).

25 Los anticuerpos anti-TLR4 incluyen los anticuerpos descritos en las solicitudes de patente de los Estados Unidos
 pendientes junto con la presente 11/009939, presentadas el 10 de diciembre de 2004 y el 11/151916, presentadas el
 15 de junio de 2004 y en el documento WO 05/065015, presentado el 10 de diciembre de 2004 y el documento
 PCT./US2005/020930, presentado el 15 de junio de 2004. Varios ejemplos de anticuerpos incluyen los anticuerpos a
 los que se hace referencia en lo sucesivo como 18H10, 16G7, 15C1 y 7E3.

30 Los anticuerpos anti-TLR4 incluyen los anticuerpos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos pendiente
 junto con la presente 11/151916, presentada el 15 de junio de 2004 (publicación de la patente de los estados Unidos
 US2008-0050366 A1) y en el documento PCT/IB2005/004206, presentado el 15 de junio. 2004 (Publicación PCT No.
 WO 07/11 0678).

35 Las secuencias de varios ejemplos de anticuerpos se muestran a continuación.

15C1 Hu V_H versión 4-28

QVQLQESGPG LVKPSDTLSL TCAVSGYSI X₁ **GGYSWH**WIRQ PPGKGLEW X₂G
YIHYSGYTDF NPSLKTR X₃T X₄ SRDTSKNQFS LKLSSVTAVD TAVYYCAR**KD**
PSDGFPYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)

40 CDR 1: GGYSWH (SEQ ID NO: 1)
 CDR 2: YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO: 2)

CDR 3: KDPSDGFY (SEQ ID NO: 3)

En donde X₁ es Thr o Ser
 En donde X₂ es Ile o Met
 En donde X₃ es Val o Ile
 En donde X₄ es Met o Ile

15C1 Hu V_H versión 3-66

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAX₁SGYSIT GGYSWHWVRQ APGKGLEWX₂S
YIHSGYTDFNPSLKTRFTI SRDNSKNTX₃Y LQMNSLRAED TAVYYCARKD
PSDGFYWGQ GTLTVVSS (SEQ ID NO: 15)

CDR 1: GGYSWH (SEQ ID NO: 1)
 CDR 2: YIHSGYTDNFNPSLKT (SEQ ID NO: 2)
 CDR 3: KDPSDGFY (SEQ ID NO: 3)

En donde X₁ es Ala o Val
 En donde X₂ es Val o Met
 En donde X₃ es Leu o Phe

15C1 Hu V_L versión L6

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS DHLHWYQOKP GQAPRLIX₁Y
ASHAISGIPA RFGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQN GHSFPLTFGG GTKVEIK
 (SEQ ID NO: 16)

CDR1: RASQSIDHLH (SEQ ID NO: 4)
 CDR2: YASHAIS (SEQ ID NO: 5)
 CDR3: QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 17)

En donde X₁ es Lys o Tyr

15C1 Hu V_L versión A26

EIVLTQSPDF QVTPKEKVT ITCRASQSIS DHLHWYQOKP DQSPKLLIK₁Y
ASHAISGVPS RFGSGSGTD FTLTINSLEA EDAATYYCQN GHSFPLTFGG GTKVEIK
 (SEQ ID NO: 18)

CDR1: RASQSIDHLH (SEQ ID NO: 4)
 CDR2: YASHAIS (SEQ ID NO: 5)
 CDR3: QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 17)

18H10 Hu V_H versión 1-69

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGFNIK DSYIHWVRQA PGQGLEWX₁GW
TDPENVNSIY DPRFQGRVTI TADX₂STSTAY X₃ELSSLRSED TAVYYCARG₁Y
NGVYYAMDYW GQGTTTVVSS (SEQ ID NO: 19)

CDR1: DSYIH (SEQ ID NO: 20)
 CDR2: WDPENVNSIYDPRFQG (SEQ ID NO: 21)
 CDR3: GYNGVYYAMDY (SEQ ID NO: 22)

En donde X₁ es Met o Ile
 En donde X₂ es Lys o Thr
 En donde X₃ es Met o Leu

18H10 Hu V_L versión L6

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC[SASSSVI YMH]WYQQKPG QAPRLLIY[RT]
 [YNLAS]GIPAR FSGSGSGTDX₁ TLTISSLEPE DFAVYYC[HQW SSFPYT]FGQG TKVEIK
 (SEQ ID NO: 23)

- 5 CDR1: SASSSVIYMH (SEQ ID NO: 24)
 CDR2: RTYNLAS (SEQ ID NO: 25)
 CDR3: HQWSSFPYT (SEQ ID NO: 26)

En donde X₁ es Phe o Tyr

7E3 Hu V_H versión 2-70

10 QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLX₁ [TYNIGVG]WIR OPPGKALEWL
 A[HIWWNDNIY YNTVLKS]RLT X₂SKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCX₃[RM]
 [AEGRYDAMDY] WGQGT LVTVS S (SEQ ID NO: 27)

- 15 CDR1: TYNIGVG (SEQ ID NO: 28)
 CDR2: HIWWNDNIYYNTVLKS (SEQ ID NO: 29)
 CDR3: MAEGRYDAMDY (SEQ ID NO: 30)

En donde X₁ es Ser o Thr

En donde X₂ es Ile o Phe

En donde X₃ es Ile o Ala

- 20 7E3 Hu V_H versión 3-66

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAX₁SGFSLT [TYNIGVG]WVR QAPGKGLEWX₂
 S[HIWWNDNIY YNTVLKS]RLT X₃SX₄DNSKNTX₅ YLQMNSLRAE DTAVYYCX₆[RM]
 [AEGRYDAMDY] WGQGT LVTVS S (SEQ ID NO: 31)

- 25 CDR1: TYNIGVG (SEQ ID NO: 28)
 CDR2: HIWWNDNIYYNTVLKS (SEQ ID NO: 29)
 CDR3: MAEGRYDAMDY (SEQ ID NO: 30)

En donde X₁ es Phe o Ala

- 30 En donde X₂ es Val o Leu

En donde X₃ es Ile o Phe

En donde X₄ es Lys o Arg

En donde X₅ es Leu o Val

En donde X₆ es Ile o Ala

- 35 7E3 Hu V_L versión L19

DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ITC[RASQDIT NYLN]WYQQKPG GKAPKLLIY[Y]
 [TSKLHS]GVPS RFGSGSGTD X₁TLTISSLQP EDFATYX₂[CQQ] GNTFPWT[FGG]
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 32)

- 40 CDR1: RASQDITNYLN (SEQ ID NO: 33)
 CDR2: YTSKLHS (SEQ ID NO: 34)
 CDR3: QQGNTFPWT (SEQ ID NO: 35)

En donde X₁ es Phe o Tyr

- 45 En donde X₂ es Tyr o Phe

Los anticuerpos anti-TLR4 incluyen los anticuerpos descritos en el documento WO 2009/101479. Estos anticuerpos anti-TLR4 se modifican para incluir una o más mutaciones en la porción de la CDR3. Las secuencias de varios ejemplos de anticuerpos se muestran a continuación.

- 50 Secuencia de aminoácidos del mutante 1 de la VH humanizada de 15C1

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNF
SLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDPSDAFPYWGQGLVTVSS (SEQ
ID NO: 36)

Secuencia de ácido nucleico del mutante 1 de la VH humanizada de 15C1

5 CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCAC
CTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCC
CAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACACTGACTTCAACCCC
TCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCT
GAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATCCGTCCGACG
CCTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 37)

Secuencia de aminoácidos del mutante 2 de la VH humanizada de 15C1:

10 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNP
SLKTRITISRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAVYYCARKDPSEGFYWGQGLVTVSS (SEQ
ID NO: 38)

Secuencia de ácido nucleico del mutante 2 de la VH humanizada de 15C1:

15 CAGGTGCAGCTTCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCAC
CTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATAGCTGGCACTGGATACGGCAGCCCC
CAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCCACTACAGTGGTTACACTGACTTCAACCCC
TCCCTCAAGACTCGAATCACCATATCACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCT
GAGCTCTGTGACCGCTGTGGACACTGCAGTGTATTACTGTGCGAGAAAAGATCCGTCCGAGG
GATTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC (SEQ ID NO: 39)

15 Secuencia de aminoácidos del mutante 1 de la VL humanizada de 15C1:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRF
SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNSHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)

Secuencia de ácido nucleico del mutante 1 de la VL humanizada de 15C1:

20 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCAT
CACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATC
AGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTT
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGC
TGCAACGTATTACTGTCAGAATAGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGG
TGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 41)

Secuencia de aminoácidos del mutante 2 de la VL humanizada de 15C1:

25 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRF
SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)

Secuencia de ácido nucleico del mutante 2 de la VL humanizada de 15C1:

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCAT
CACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATC
AGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTT
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGC
TGCAACGTATTACTGTCAGCAGGGTACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGG
TGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 43)

Secuencia de aminoácidos del mutante 3 de la VL humanizada de 15C1:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRF
SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNSSSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

5

Secuencia de ácido nucleico del mutante 3 de la VL humanizada de 15C1:

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCAT
CACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATC
AGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGC
TGCAACGTATTACTGTCAGAATAGTAGTATTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGG
TGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 45)

10

Secuencia de aminoácidos del mutante 4 de la VL humanizada de 15C1:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI SDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRF
SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSHSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)

15

Secuencia de ácido nucleico del mutante 4 de la VL humanizada de 15C1:

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAAAAAGTCACCAT
CACCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATCAGCGACCACTTACACTGGTACCAACAGAAACCTGATC
AGTCTCCCAAGCTCCTCATCAAATATGCTTCCCATGCCATTTCTGGGGTCCCATCGAGGTTTC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAATAGCCTAGAGGCTGAAGATGC
TGCAACGTATTACTGTCAGCAGAGTCACAGTTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGG
TGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 47)

Definiciones:

20

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de oligo y polinucleótidos descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos y el cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

25

30

35

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

40

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

45

Se sabe que la unidad estructural del anticuerpo básico comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por

dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo terminal amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción del extremo terminal carboxilo de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en los seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

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

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

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

Como se usa en el presente documento, los términos "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d menor representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológicas de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de estos métodos implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo sitio de unión a antígeno/antígeno, en donde esas velocidades dependen de las concentraciones de los compañeros del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante de velocidad de asociación" ($K_{\text{asociación}}$) como la "constante de velocidad de disociación" ($K_{\text{disociación}}$) se pueden determinar mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La relación de $K_{\text{disociación}}/K_{\text{asociación}}$ permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, en general, Davies et al., (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente al complejo del receptor 4 tipo Toll (TLR4)/MD-2 o al TLR4 cuando no está complejado con MD-2, cuando la constante de unión de equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y lo más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$ hasta aproximadamente 1 pM , según se mide mediante ensayos tales como ensayos de unión a radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

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

en el presente documento, y las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera mostradas en el presente documento.

5 El término "proteína aislada" mencionado en este documento significa una proteína de ADNc, ARN recombinante, o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no esta asociada con proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se presenta en la naturaleza.

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

20 El término "de origen natural" como se usa en este documento cuando se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionalmente en el laboratorio o está presente de forma natural.

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

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

40 El término oligonucleótido al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos naturales y modificados enlazados entre sí mediante enlaces de oligonucleótidos de origen natural y no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprenden una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y lo más preferiblemente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son generalmente de cadena sencilla, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser de doble cadena, por ejemplo, para uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos sentido o antisentido.

50 El término "nucleótidos naturales" al que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótidos" al que se hace referencia en el presente documento incluye enlaces de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilatioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984), Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, páginas 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., patente de los Estados Unidos No. 5.151.510; Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para la detección, si se desea.

60 Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida que se usa como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, tal como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia génica dada en un listado de secuencias o puede comprender una secuencia completa de ADNc o génica. En general, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos,

65

frecuentemente de al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos, y con frecuencia de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Dado que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa de polinucleótido o aminoácido) que es similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan típicamente comparando secuencias de las dos moléculas en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en donde una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en la que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones, supresiones, sustituciones y similares (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl Acad Sci. (EE. UU.) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, versión 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin), paquetes de software Geneworks o MacVector), o por inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que resulta en el porcentaje más alto de homología en la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, con base en nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) en la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico es idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o el residuo se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos "identidad sustancial" como se usa en este documento denota una característica de una secuencia de polinucleótido o de aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más generalmente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), con frecuencia en una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir supresiones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tal como los aminoácidos α,α -disustituidos, los N-alquil aminoácidos, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmexionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en el presente documento, la dirección izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección derecha es la dirección del terminal carboxilo, de acuerdo con el uso estándar y la convención.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5', la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se denomina regiones de secuencia de dirección de transcripción en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan como "secuencias ascendentes", las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias descendentes".

Según se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, mediante los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de huecos predeterminados, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia.

Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservadoras.

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

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

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

El término "fragmento de polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una supresión en el extremo terminal amino y/o el extremo terminal carboxilo, pero cuando la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos típicamente tienen una longitud de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, usualmente una longitud de al menos 50 aminoácidos, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo" como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene una unión específica al complejo TLR4/MD2 o TLR4 solo, bajo condiciones de unión adecuadas. Típicamente, los análogos de polipéptidos comprenden una

sustitución de aminoácidos conservadora (o adición o supresión) con respecto a la secuencia que se produce naturalmente. Los análogos típicamente tienen una longitud de al menos 20 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 50 aminoácidos o mayor, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido natural de longitud completa.

Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986), Veber y Freidinger TINS página 392 (1985); y Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelación molecular computarizada. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)); por ejemplo, añadiendo residuos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

El término "agente" se usa en el presente documento para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho a partir de materiales biológicos.

Como se usa en el presente documento, los términos "etiqueta" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de fracciones biotiniladas que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. Se conocen diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas en la técnica y se pueden usar. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánido, fósforo), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos). En algunas realizaciones, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. El término "agente farmacéutico o fármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.

Otros términos de química en el presente documento se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en el Diccionario de Términos Químicos de McGraw-Hill (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

El término "agente antineoplásico" se usa en el presente documento para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o la progresión de un neoplasma en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), como un carcinoma, sarcoma, linfoma, o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

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

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

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de la invención (por ejemplo, monoclonales murinos, anticuerpos humanizados o anticuerpos monoclonales completamente humanos) se unen específicamente a TLR4. También se incluyen en la invención los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a TLR4 y/o el complejo TLR4/MD-2 se unen a un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos en TLR4 humano que se muestra a continuación:

```

1 mmsasrlagt lipamaflsc vrpeswepcv evvpnityqc melnfykipd nlpfstknld
61 lsfnpnlrhlq sysffsfpel qvldlsrcei qtiedgayqs lshlstlilt gnpiqslalg
121 afsglsslqk lvavetnlas lenfpighk tlkelnvahn liqsfklpey fsnltnlehl
181 dlssnkiqsi yctdlrvlhq mpllnlsldl slnmpnfiqp gafkeirlhk ltlrnnfdsl
241 nvmktciqgl aplevhrvl gefrnegnl kfdksalegl cnttieefrl ayldylddi
301 idlfncltnv ssfslsvsvti ervkdfsynf gwqhlelvnc kfgqfptlkl kslkrltfts
361 nkggnafsev dlpslefldl srnglsfkgc csqsdfgts lkyldlsfng vitmsnflg
421 leqlehlfdq hsnlkqmsef svflslrnli yldishthtr vafngifngl sslevlkmag
481 nsfgenflpd iftelrnlft ldlsqcqleq lsptafnsls slqvlmshn nffsldtfpy
541 kclnslqvld yslnhimtsk kqelqhfps laflnltqnd factcehqsf lqwkdqrql
601 lvevermecca tpsdkqgmpv lslnitcqmn ktiigvsvls vlvsvvavl vykfyfhml
661 lagcikygrg eniydafviy ssqdedwvnr elvknleegv ppfqlchlhr dfipgvaiaa
721 niihegfhks rkvivvvsqh figsrwcife yeiaqtqwfl ssragiifiv lqkvektllr
781 qqvelyrlls rntyleweds vlgrhifwrr lrkalldgks wnpegtvgtg cnwqeatsi (SEQ
ID NO: 11)

```

Los expertos en la materia reconocerán que es posible determinar, sin experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o humanizado murino) tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal utilizado en los métodos descritos en el presente documento determinando si el primero evita que el último se una al complejo TLR4/MD-2 o al TLR4 cuando no está complejoado con el MD-2. Si el anticuerpo monoclonal que se está probando compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o a un epítipo estrechamente relacionado. Un método alternativo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad del anticuerpo monoclonal de la invención es preincubar el anticuerpo monoclonal de la invención con el complejo TLR4/MD-2 o una proteína TLR4 soluble (con la que normalmente es reactivo) y luego agregar el anticuerpo monoclonal que se está probando para determinar si el anticuerpo monoclonal que se está probando es inhibido en su capacidad para unirse al complejo TLR4/MD-2 o para unirse a TLR4 y TLR4 en complejo con MD-2. Si se inhibe el anticuerpo monoclonal que se está probando, entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epítópica, o funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Uso de anticuerpos anti-TLR4

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

farmacéuticos.

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo anti-TLR4, se usan para prevenir el rechazo del trasplante y/o prolongar la supervivencia de un trasplante.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el rechazo de trasplantes u otros trastornos relacionados con el trasplante. La prolongación de la supervivencia del material biológico trasplantado o la prevención del rechazo del trasplante en un sujeto indica que el anticuerpo confiere un beneficio clínico.

Los anticuerpos anti-TLR4 se administran en forma de composiciones farmacéuticas. Los principios y consideraciones involucrados en la preparación de tales composiciones, así como una guía en la elección de los componentes, se proporcionan, por ejemplo, en Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19a ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

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

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

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de vinil etileno y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Los anticuerpos son policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se usa un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, F_{ab}, scFv o F_{(ab)2}). El término "etiquetado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo de la sonda o el anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente etiquetado. Los ejemplos de etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario que usa un anticuerpo secundario etiquetado en forma fluorescente y el etiquetado final de una sonda de ADN con biotina de tal manera que se puede detectar con estreptavidina etiquetada en forma fluorescente. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Incluido dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, está la sangre y una fracción o componente de la sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el método de detección de la invención se puede usar para detectar un ARNm analito, una proteína o un ADN genómico en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un ARNm analito incluyen las hibridaciones Northern y las hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína analito incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. En las técnicas *in vitro* para la detección de un ADN genómico analito incluyen hibridaciones Southern. Los procedimientos para realizar inmunoensayos se describen, por ejemplo, en "ELISA: Theory and

Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, 1985. Además, en las técnicas *in vivo* para detección de una proteína analito incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo anti-proteína analito etiquetado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede etiquetar con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se puedan detectar mediante técnicas de imagenología estándar.

Composiciones farmacéuticas

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

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

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

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

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un vehículo fluido para usar como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o traga. Agentes de unión

farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

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

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

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

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

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes a la técnica de elaboración de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de individuos

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

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

Ejemplos

Los ejemplos y los datos proporcionados en el presente documento evalúan el papel de TLR4 en la mediación de una respuesta inmune a los islotes allogénicos. Brevemente, los islotes purificados humanos o murinos (DBA1) se cultivaron conjuntamente respectivamente con PBMC allogénicas o células de ganglios linfáticos, en presencia o ausencia de mAb anti-TLR4 humano o anti-TLR4 de ratón, o controles de isotipo relevantes. Las células en proliferación se evaluaron utilizando la tinción con Ki67, y se evaluaron las células que secretan IFN γ utilizando el ensayo ELISPOT. Los islotes DBA1, cultivados durante 24 horas *in vitro* con los mAb anti-ratón, se trasplantaron bajo la cápsula renal de ratones diabéticos C57BL/6, se inyectaron dos veces por semana por vía intraperitoneal con los mAb anti-ratón desde el día 0 al 28 después del trasplante. El azúcar en sangre se controló dos veces por semana. Los resultados *in vitro*, mostraron una disminución en la proliferación de $79 \pm 2\%$ ($p < 0,001$) y $67 \pm 16\%$ ($p = 0,05$) en los cultivos mixtos de islotes-linfocitos humanos y de murinos, respectivamente, en comparación con los controles. De manera similar, se observó una disminución de $62 \pm 9\%$ ($N = 3$, $p < 0,05$) y $64 \pm 10\%$ ($N = 3$, $p < 0,05$) en el número de células secretoras de IFN γ . In vivo, el tratamiento con el mAb anti-TLR4 de ratón prolongó la supervivencia del injerto de islotes a > 60 días en el 80% de los animales ($N = 5$), en contraste con la supervivencia del injerto del 0% a los 17 días en los ratones tratados con control de isotipo ($N = 6$) y con tampón ($N = 3$). Estos resultados demuestran que el bloqueo de TLR4 puede modular eficazmente la inmunogenicidad de islotes humanos o murinos *in vitro* y es capaz de lograr la supervivencia indefinida de injertos de islotes *in vivo*.

Aunque los estudios descritos en el presente documento utilizan islotes alogénicos, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

5 Ejemplo 1

10 Materiales y métodos para la generación de anticuerpos monoclonales 15C1 y 5E3: el anticuerpo hu15C1, también denominado en este documento NI-0101, se generó y probó como se describe en la solicitud PCT, PCT/IB2008/003978, presentada el 14 de mayo de 2008 y publicado como el documento WO 2009/101479. El anticuerpo monoclonal 5E3 es un anticuerpo monoclonal que se une a TLR4 de ratón. (Véase Daubeuf et al., "TLR4/MD-2 Monoclonal Antibody Therapy Affords Protection in Experimental Models of Septic Shock," J Immunol vol. 179: 6107-6114 (1997).

15 Anticuerpos de control: el isotipo de control humano se adquirió a través de SIGMA® (número de referencia 15029) y el juego FITC anti-Ki-67 a través de BD Pharmingen (Franklin Lakes NJ).

Islotes humanos: los páncreas se obtuvieron de donantes de múltiples órganos con muerte cerebral a través de Swisstransplant y la Agence de la Biomédecine francesa.

20 Los islotes se aislaron utilizando el método automatizado descrito por Ricordi con modificaciones locales. (Véase, por ejemplo, Ricordi et al., "Automated method for isolation of human pancreatic islets," Diabetes, vol. 37(4): 413-20 (1988); Ricordi et al., "Automated islet isolation from human pancreas," Diabetes, vol. 38 Suppl 1:140-2 (1989)). Se usó colagenasa NB1 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemania). Los islotes se purificaron en un gradiente continuo de Biocoll (Biochrom, Berlín, Alemania) con un procesador de células COBE refrigerado (COBE 2991; Cobe, Lakewood, CO).

30 Los islotes se incubaron durante la noche en placas Petri de 60 mm de diámetro no adherentes que contenían 5 mL de CMRL-FCS al 10% (suero de ternera fetal al 10%, glucosa 11,2 mM, 110 µg/mL de piruvato de sodio y complementado con 110 unidades/mL de penicilina, 110 µg/mL de estreptomina y 50 µg/mL de gentamicina) con o sin el anticuerpo 15C1 1,5nM o el isotipo de control.

35 Animales: Se adquirieron ratones C57BL/6 y DBA1 machos de dos meses de edad a través de Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia). Todos los animales se mantuvieron en instalaciones para animales en la Universidad de Ginebra con acceso libre a alimentos y agua. Todos los experimentos se realizaron bajo protocolos revisados y aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales.

40 Islotes de ratón: se aislaron islotes de Langerhans mediante digestión con colagenasa de páncreas de ratones DBA1 machos, seguido de purificación con Ficoll utilizando una modificación del método de Sutton et al., (Sutton et al., "Human pancreatic islet isolation with increased incubation temperatures and variable density gradients," Transplant Proc., vol. 22: 758-59 (1990).

45 Los islotes se incubaron durante la noche en placas Petri de 60 mm de diámetro no adherentes que contenían 5 mL de medio completo RPMI 1640 (suero de ternera fetal al 10%, glucosa 11,2 mM, piruvato de sodio 110 µg/mL y complementado con 110 unidades/mL de penicilina, 110 µg/mL de estreptomina y 50 µg/mL de gentamicina) con o sin el anticuerpo 5E3 1,5 nM o el isotipo de control.

50 Extracción de células y cultivos mixtos de linfocitos (MLC): Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de la sangre durante 20 minutos a 2000 rpm en Histopaque-1077 (SIGMA®), de donantes sanos bajo consentimiento por escrito. Las células se sembraron inmediatamente con islotes (véase la sección de MLC).

55 Los ganglios linfáticos mesentéricos de ratón se recogieron de ratones C57BL/6 machos y las células se extrajeron mediante destrucción estructural manual de los nodos. Las células se sembraron inmediatamente con islotes (véase la sección de MLC).

60 Se sembraron partes alícuotas de 25 IEQ con 500.000 PBMC humanas o células de ganglios linfáticos de ratón, en la placa de 96 pozos Multiscreen-IP de Millipore®, recubierta previamente con anticuerpo de captura IFN γ (según las recomendaciones del fabricante, kits de ensayo IFN γ ELISPOT Ready-SET-Go humanos y de ratón de eBiosciences®), en un volumen total de 200 µl de medio RPMI 1640 completo modificado (suero de ternera fetal o humano al 10%, glucosa 11,2 mM, piruvato de sodio 110 µg/mL y complementado con 110 unidades/mL de penicilina, 110 µg/mL de estreptomina, β -mercaptoetanol 0,5 mM y solución de aminoácidos no esenciales MEM 1X (SIGMA®), con o sin anticuerpos anti-TLR4 o isotipos de control. Como control, las células se sembraron sin islotes.

65 Después de tres días, las células y los islotes se transfirieron a placas de 96 pozos no adherentes. Las membranas ELISPOT se revelaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los puntos se contaron utilizando un analizador automático Immunospot (Cellular Technology Ltd, Bonn, Alemania).

5 La reacción entre células e islotes se continuó durante cuatro días adicionales antes de la medición de la proliferación celular. Las células se separaron de los islotes mediante centrifugación durante 1 minuto a 1.000 rpm, se fijaron y se permeabilizaron utilizando el juego de regulador de tinción Foxp3 de eBioscience® de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Después de 30 minutos de incubación, las células se marcaron con anticuerpo FITC anti-Ki-67. Las células se adquirieron y analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (BDBiosciences®).

10 Trasplante de islotes: se usó estreptozotocina (200 mg/kg i.p.) para inducir diabetes en ratones C57BL/6 al menos 5 días antes del trasplante de islotes. La diabetes se definió como niveles de glucosa en sangre sin ayuno $\geq 18,0$ mM durante dos o más días consecutivos antes del trasplante. Después del cultivo durante la noche, se trasplantaron 600 equivalentes de islote de ratón DBA1 bajo la cápsula renal izquierdo de ratones diabéticos. El azúcar en sangre se controló dos veces por semana y los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana con 500 μ g de 5E3, isotipo de control o regulador (PBS), desde el día 0 hasta el 28 después del trasplante. El rechazo del injerto se definió como tres glucemias sanguíneas consecutivas superiores a 18 mM.

15 Presentación de los datos y análisis estadístico: los datos se presentan como la media \pm S.E. para "n" experimentos independientes, y los niveles de significancia para las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student para grupos no pareados o la prueba Log-rank (Mantel-Cox) usando el software GraphPad PRISM (* = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, **** = p < 0,0001).

20 Otras realizaciones

25 Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Listado de secuencias

30 <110> NovImmune, SA Kosco-Vilbois, Marie de Graaf, Katrien Berney, Thierry Giovannoni, Laurianne Santa Bosco, Domenico

<120> Anticuerpos anti-TLR4 y métodos de uso de los mismos

35 <130> 23135-424001WO

<150> US 61/431191

<151> 2011-01-10

40 <160> 47

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <400> 1

Gly Gly Tyr Ser Trp His
1 5

55 <210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

60 Tyr Ile His Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Phe Asn Pro Ser Leu Lys Thr
1 5 10 15

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

ES 2 721 378 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

5 Lys Asp Pro Ser Asp Ala Phe Pro Tyr
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 4

15 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp His Leu His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 5

Tyr Ala Ser His Ala Ile Ser
1 5

<210> 6

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

30 Gln Gln Gly His Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 118

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 721 378 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Phe Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Thr Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Asp Pro Ser Asp Ala Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp His
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser His Ala Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 9
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 9

ES 2 721 378 T3

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

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

Pro Ser Asp Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile
 35 40 45

Thr Gly Gly Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

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

Pro Ser Leu Lys Thr Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Pro Ser Asp Ala Phe Pro Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

ES 2 721 378 T3

420

425

430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

5 <210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 10

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

ES 2 721 378 T3

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

5 <210> 11
 <211> 839
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 11

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

ES 2 721 378 T3

Thr Asp Leu Arg Val Leu His Gln Met Pro Leu Leu Asn Leu Ser Leu
 195 200 205
 Asp Leu Ser Leu Asn Pro Met Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ala Phe Lys
 210 215 220
 Glu Ile Arg Leu His Lys Leu Thr Leu Arg Asn Asn Phe Asp Ser Leu
 225 230 235 240
 Asn Val Met Lys Thr Cys Ile Gln Gly Leu Ala Gly Leu Glu Val His
 245 250 255
 Arg Leu Val Leu Gly Glu Phe Arg Asn Glu Gly Asn Leu Glu Lys Phe
 260 265 270
 Asp Lys Ser Ala Leu Glu Gly Leu Cys Asn Leu Thr Ile Glu Glu Phe
 275 280 285
 Arg Leu Ala Tyr Leu Asp Tyr Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Asp Leu Phe
 290 295 300
 Asn Cys Leu Thr Asn Val Ser Ser Phe Ser Leu Val Ser Val Thr Ile
 305 310 315 320
 Glu Arg Val Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Phe Gly Trp Gln His Leu Glu
 325 330 335
 Leu Val Asn Cys Lys Phe Gly Gln Phe Pro Thr Leu Lys Leu Lys Ser
 340 345 350
 Leu Lys Arg Leu Thr Phe Thr Ser Asn Lys Gly Gly Asn Ala Phe Ser
 355 360 365
 Glu Val Asp Leu Pro Ser Leu Glu Phe Leu Asp Leu Ser Arg Asn Gly
 370 375 380
 Leu Ser Phe Lys Gly Cys Cys Ser Gln Ser Asp Phe Gly Thr Thr Ser
 385 390 395 400
 Leu Lys Tyr Leu Asp Leu Ser Phe Asn Gly Val Ile Thr Met Ser Ser
 405 410 415
 Asn Phe Leu Gly Leu Glu Gln Leu Glu His Leu Asp Phe Gln His Ser
 420 425 430
 Asn Leu Lys Gln Met Ser Glu Phe Ser Val Phe Leu Ser Leu Arg Asn
 435 440 445
 Leu Ile Tyr Leu Asp Ile Ser His Thr His Thr Arg Val Ala Phe Asn
 450 455 460

ES 2 721 378 T3

Gly Ile Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Glu Val Leu Lys Met Ala Gly
465 470 475 480

Asn Ser Phe Gln Glu Asn Phe Leu Pro Asp Ile Phe Thr Glu Leu Arg
485 490 495

Asn Leu Thr Phe Leu Asp Leu Ser Gln Cys Gln Leu Glu Gln Leu Ser
500 505 510 515

Pro Thr Ala Phe Asn Ser Leu Ser Ser Leu Gln Val Leu Asn Met Ser
515 520 525

His Asn Asn Phe Phe Ser Leu Asp Thr Phe Pro Tyr Lys Cys Leu Asn
530 535 540

Ser Leu Gln Val Leu Asp Tyr Ser Leu Asn His Ile Met Thr Ser Lys
545 550 555 560

Lys Gln Glu Leu Gln His Phe Pro Ser Ser Leu Ala Phe Leu Asn Leu
565 570 575

Thr Gln Asn Asp Phe Ala Cys Thr Cys Glu His Gln Ser Phe Leu Gln
580 585 590

Trp Ile Lys Asp Gln Arg Gln Leu Leu Val Glu Val Glu Arg Met Glu
595 600 605

Cys Ala Thr Pro Ser Asp Lys Gln Gly Met Pro Val Leu Ser Leu Asn
610 615 620

Ile Thr Cys Gln Met Asn Lys Thr Ile Ile Gly Val Ser Val Leu Ser
625 630 635 640

Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Phe Tyr Phe
645 650 655

His Leu Met Leu Leu Ala Gly Cys Ile Lys Tyr Gly Arg Gly Glu Asn
660 665 670

Ile Tyr Asp Ala Phe Val Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Glu Asp Trp Val
675 680 685

Arg Asn Glu Leu Val Lys Asn Leu Glu Glu Gly Val Pro Pro Phe Gln
690 695 700

Leu Cys Leu His Tyr Arg Asp Phe Ile Pro Gly Val Ala Ile Ala Ala
705 710 715 720

Asn Ile Ile His Glu Gly Phe His Lys Ser Arg Lys Val Ile Val Val
725 730 735

ES 2 721 378 T3

Val Ser Gln His Phe Ile Gln Ser Arg Trp Cys Ile Phe Glu Tyr Glu
 740 745 750

Ile Ala Gln Thr Trp Gln Phe Leu Ser Ser Arg Ala Gly Ile Ile Phe
 755 760 765

Ile Val Leu Gln Lys Val Glu Lys Thr Leu Leu Arg Gln Gln Val Glu
 770 775 780

Leu Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Glu Asp Ser
 785 790 795 800

Val Leu Gly Arg His Ile Phe Trp Arg Arg Leu Arg Lys Ala Leu Leu
 805 810 815

Asp Gly Lys Ser Trp Asn Pro Glu Gly Thr Val Gly Thr Gly Cys Asn
 820 825 830

Trp Gln Glu Ala Thr Ser Ile
 835

<210> 12
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12

atgggatgga gctggatcct tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcagggtg acattgccag 60
 gtgcagcttc aggagtccgg cccaggactg gtgaagcctt cggacaccct gtccctcacc 120
 tgcgctgtct ctggttactc catcaccggg ggttatagct ggcaactggat acggcagccc 180
 ccagggaagg gactggagtg gatgggggat atccactaca gtggttacac tgacttcaac 240
 ccctccctca agactcgaat caccatatca cgtgacacgt ccaagaacca gttctccctg 300
 aagctgagct ctgtgaccgc tgtggacact gcagtgtatt actgtgagag aaaagatccg 360
 tccgacgcct ttccttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctcttc cgctccacc 420
 aagggcccat cgggtcttcc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcccttc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaaa 1020

10

ES 2 721 378 T3

tgcaaggctc ccagtaaagc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa atag 1404

<210> 13
<211> 702
5 <212> ADN
213> Homo sapiens

<400> 13

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacagggtg ccaactccgaa 60
attgtgttga cgcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggaaaa agtcaccatc 120
acctgcaggg ccagtcagag tatcagcgac cacttacact ggtaccaaca gaaacctgat 180
cagtctccca agctcctcat caaatatgct tcccatgccca tttctgggggt cccatcgagg 240
ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcaatagcct agaggctgaa 300
gatgctgcaa cgtattactg tcagcaggggt cacagttttc cgctcacttt cggcggaggg 360
accaagggtg agatcaaacg tacgggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
10 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 14
<211> 118
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> características misceláneas
20 <222> (30)..(30)
<223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> características misceláneas
25 <222> (49)..(49)
<223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> características misceláneas
30 <222> (68)..(68)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> características misceláneas
 <222> (70)..(70)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Xaa Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Xaa Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Phe Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Thr Arg Xaa Thr Xaa Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Asp Pro Ser Asp Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 15
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> características misceláneas
 <222> (24)..(24)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20

<220>
 <221> características misceláneas
 <222> (49)..(49)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25

<220>
 <221> características misceláneas
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30

<400> 15

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 Xaa Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
 20 25 30

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

Xaa Ser Tyr Ile His Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Phe Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Xaa 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 Arg Lys Asp Pro Ser Asp Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5

- <210> 16
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10

- <220>
- <221> características misceláneas
- <222> (49)..(49)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15

- <400> 16

ES 2 721 378 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp His
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Xaa Tyr Ala Ser His Ala Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17

5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

10 Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

15 <210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 721 378 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser His Ala Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> características misceláneas
<222> (48)..(48)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <220>
<221> características misceláneas
<222> (74)..(74)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <220>
<221> características misceláneas
<222> (81)..(81)
<223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 19

ES 2 721 378 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45
 Gly Trp Thr Asp Pro Glu Asn Val Asn Ser Ile Tyr Asp Pro Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Xaa Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Xaa Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Asn Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 20

Asp Ser Tyr Ile His
 1 5

15 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Trp Thr Asp Pro Glu Asn Val Asn Ser Ile Tyr Asp Pro Arg Phe Gln
 1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

30 Gly Tyr Asn Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

ES 2 721 378 T3

<210> 23
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> características misceláneas
 <222> (70)..(70)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10

<400> 23

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

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

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

Arg Thr Tyr Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Phe Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 24

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met His
 1 5 10

25

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 25

Arg Thr Tyr Asn Leu Ala Ser
 1 5

35

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 26

ES 2 721 378 T3

His Gln Trp Ser Ser Phe Pro Tyr Thr
 1 5

5 <210> 27
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (30)..(30)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25 <400> 27

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Xaa Thr Tyr
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Ile Tyr Tyr Asn Thr Val
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Xaa Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Xaa Arg Met Ala Glu Gly Arg Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 28

Thr Tyr Asn Ile Gly Val Gly
 1 5

ES 2 721 378 T3

<210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 29

His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Ile Tyr Tyr Asn Thr Val Leu Lys Ser
 1 5 10 15

10 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 30

Met Ala Glu Gly Arg Tyr Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

20 <210> 31
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (24)..(24)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

35 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (71)..(71)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

40 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

45 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (80)..(80)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

50 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

55 <400> 31

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

ES 2 721 378 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Xaa Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Asn Ile Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Xaa Ser His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Ile Tyr Tyr Asn Thr Val
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Xaa Ser Xaa Asp Asn Ser Lys Asn Thr Xaa
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Xaa Arg Met Ala Glu Gly Arg Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <220>
 <221> características misceláneas
 <222> (87)..(87)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp

ES 2 721 378 T3

85

90

95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 37
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 37

caggtgcagc ttcaggagtc cggcccagga ctggtgaagc cttcggacac cctgtcctc 60
 acctgcgctg tctctggtta ctccatcacc ggtggttata gctggcactg gatacggcag 120
 cccccagggg agggactgga gtggatgggg tatatccact acagtgggta cactgacttc 180
 aaccctccc tcaagactcg aatcaccata tcacgtgaca cgtccaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gctctgtgac cgctgtggac actgcagtgt attactgtgc gagaaaagat 300
 10 ccgtccgacg cctttcctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ttcc 354

15 <210> 38
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Phe Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Thr Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Asp Pro Ser Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 20 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 354

ES 2 721 378 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39

5
 caggtgcagc ttcaggagtc cggcccagga ctggtgaagc cttcggacac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctctgggta ctccatcacc ggtgggtata gctggcactg gatacggcag 120
 cccccagga agggactgga gtggatgggg tatatccact acagtgggta cactgacttc 180
 aaccctccc tcaagactcg aatcaccata tcacgtgaca cgtccaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gctctgtgac cgctgtggac actgcagtgt attactgtgc gagaaaagat 300
 ccgtccgagg gatttcctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ttcc 354

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

15
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp His
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser His Ala Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Ser His Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 41

20
 25
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga aaaagtcacc 60
 atcacctgca gggccagtca gagtatcagc gaccacttac actggtacca acagaaacct 120
 gatcagcttc ccaagctcct catcaaata gcttcccatg ccatttctgg ggtcccatcg 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcaatag cctagaggct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcagaat agtcacagtt ttccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

ES 2 721 378 T3

5 <210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp His
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser His Ala Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10
 15 <210> 43
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 43

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga aaaagtcacc 60
 atcacctgca gggccagtc gagtadcagc gaccacttac actggtacca acagaaacct 120
 gatcagtctc ccaagctcct catcaaatat gcttcccatg ccatttctgg ggtcccatcg 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcaatag cctagaggct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcagcag ggtcacagtt ttccgctcac tttcggcgga 300
 20 gggaccaagg tggagatcaa a 321

25 <210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44

30 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

ES 2 721 378 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga aaaagtcacc 60
 atcacctgca gggccagtca gagtatcagc gaccacttac actggtacca acagaaacct 120
 gatcagtcct ccaagtcct catcaaatat gcttcccatg ccatttctgg ggtcccatcg 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcaatag cctagaggct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcagcag agtcacagtt ttccgctcac tttcggcgga 300
 10 gggaccaagg tggagatcaa a 321

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a un polipéptido del receptor 4 tipo Toll (TLR4) para uso en un método para inhibir el rechazo y/o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en un sujeto, en el que el material biológico que va a ser trasplantado es células de islote, y en el que el agente se usa en un método que comprende:
- (i) poner en contacto las células de islote que se van a trasplantar con un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a un polipéptido del receptor 4 tipo Toll (TLR4) humano para producir una composición trasplantable, y
- (ii) después de que la composición trasplantable se haya implantado en una ubicación deseada en el sujeto, administrar al sujeto una o más dosis adicionales de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a TLR4 humano, en el que el anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para prevenir el rechazo del trasplante o prolongar la supervivencia de las células de islote en el sujeto;
- en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (i), el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (ii) o el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (i) y en la etapa (ii) comprende una región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (CDR1_{VH}) que comprende la secuencia de aminoácidos de GGYSWH (SEQ ID NO: 1); una región CDR2_{VH} que comprende la secuencia de aminoácidos de YIHYSGYTDFNPSLKT (SEQ ID NO: 2); y una región CDR3_{VH} que comprende la secuencia de aminoácidos de KDPDAFPY (SEQ ID NO: 3); una región 1 variable determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR1_{VL}) que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISDHLH (SEQ ID NO: 4); una región CDR2_{VL} que comprende la secuencia de aminoácidos de YASHAIS (SEQ ID NO: 5); y una región CDR3_{VL} que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGHSFPLT (SEQ ID NO: 6).
2. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano.
3. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el material biológico que se va a trasplantar es material biológico alogénico.
4. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a TLR4 usado antes y después de la implantación son el mismo anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo, o son anticuerpos diferentes o fragmentos inmunológicamente activos.
5. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une específicamente a TLR4 se administra al sujeto en combinación con uno o más agentes adicionales.
6. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el uno o más agentes adicionales es uno o más agentes inmunosupresores o en el que el uno o más agentes adicionales se selecciona de metotrexato, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, everolimus, un corticosteroide, globulina anti-timocitos, Infiximab, Etanercept y Adalimumab.
7. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (i), el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (ii) o el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (i) y en la etapa (ii) comprende además la secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada
 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQPPGKGLEWMGYIHYSGYTDFNPSLKRITISRDTSKN
 QF SLKLSSVTAVDTAVYYCARKDPDAFPYWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera
 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSISDHLHWYQQKPDQSPKLLIKYASHAISGVPSRFSGSGSGDFTLTINSLEA
 ED AATYYCQQGHSFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 8).
8. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (i), el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (ii) o el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a TLR4 en la etapa (i) y en la etapa (ii) comprende además la secuencia de aminoácidos de cadena pesada
 MGWSWIFLFLLSGTAGVHCQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSITGGYSWHWIRQP-
 PGKGLEWMGYIHYSGYT
 DFNPSLKRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARKDPDAFPYWGQGLTIVTSS-
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG

ES 2 721 378 T3

TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY-
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE-
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP-
5 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS-
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera
MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIDHLHWYQQKP-
DQSPKLLIKYASHAISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV-
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
10 AKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 10).

FIGURA 1

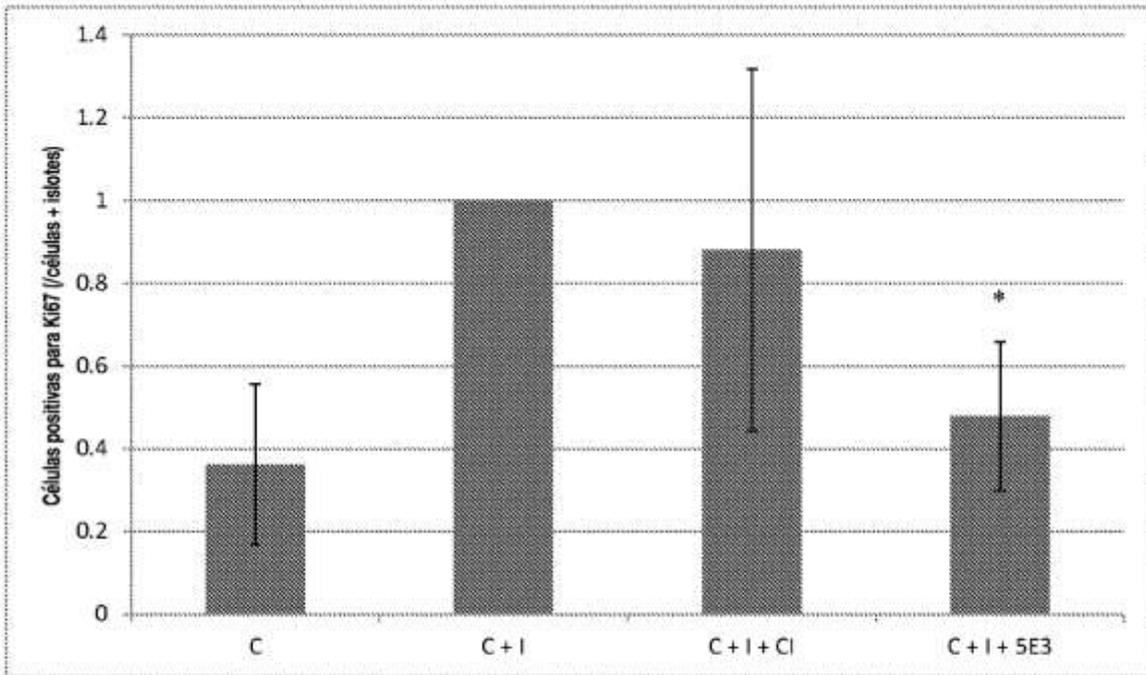


FIGURA 2

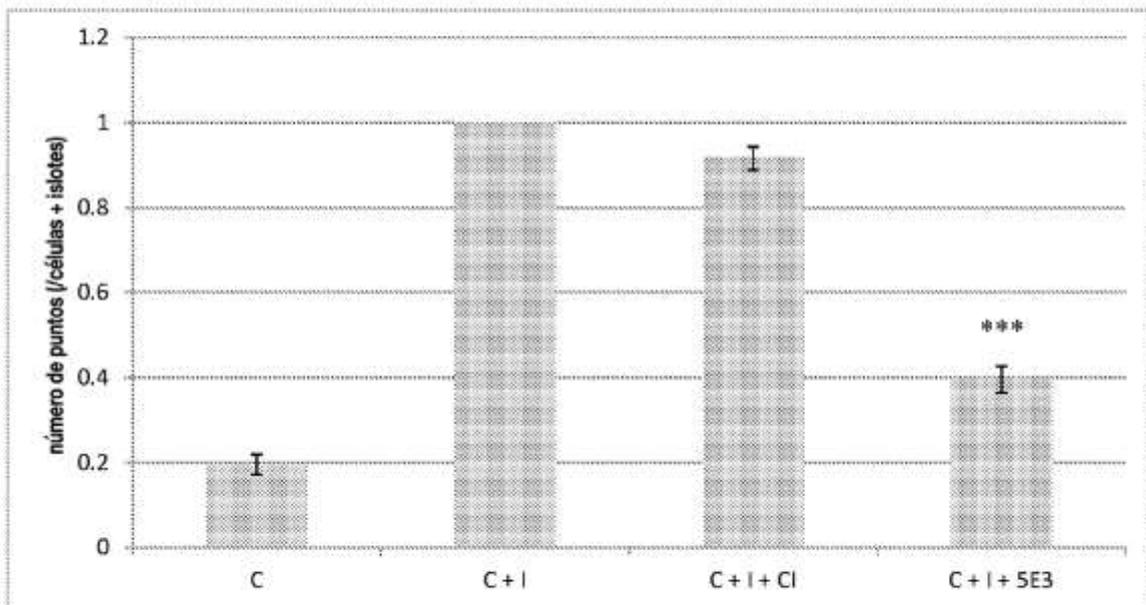


FIGURA 3

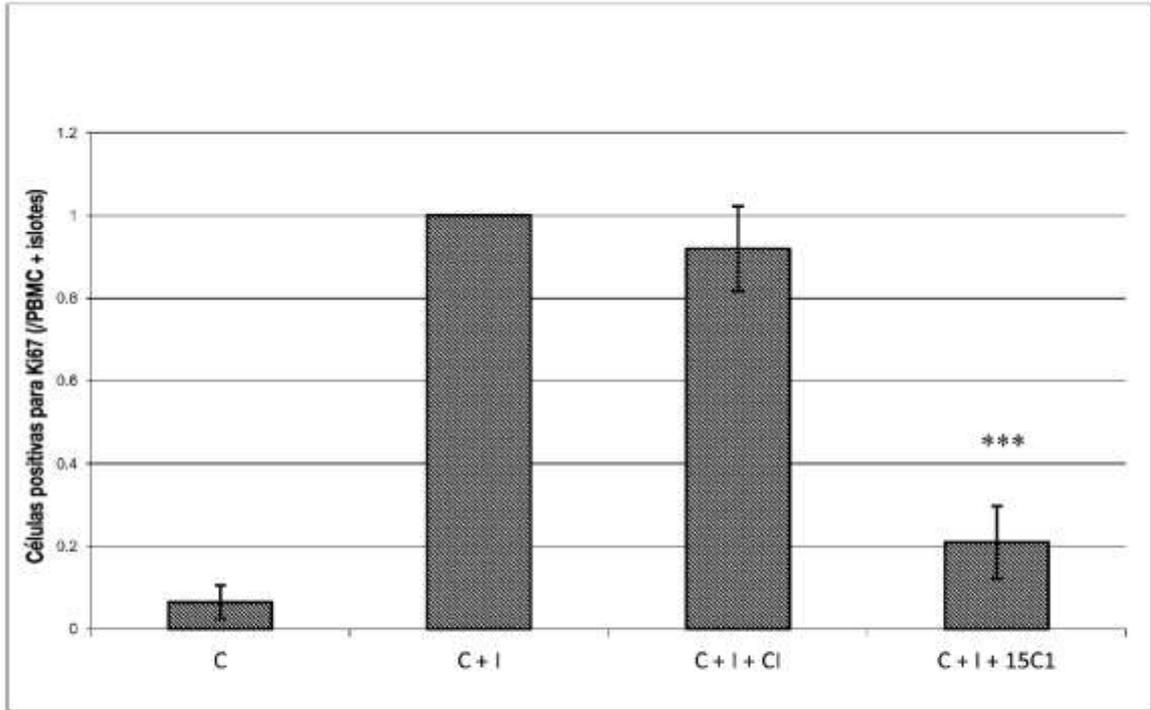


FIGURA 4

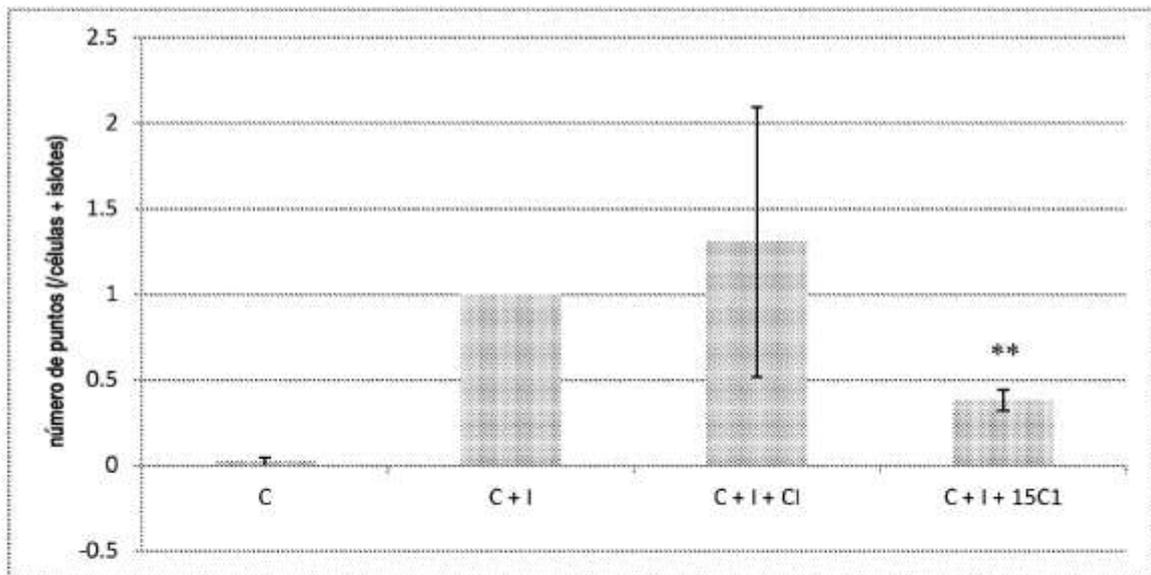


FIGURA 5

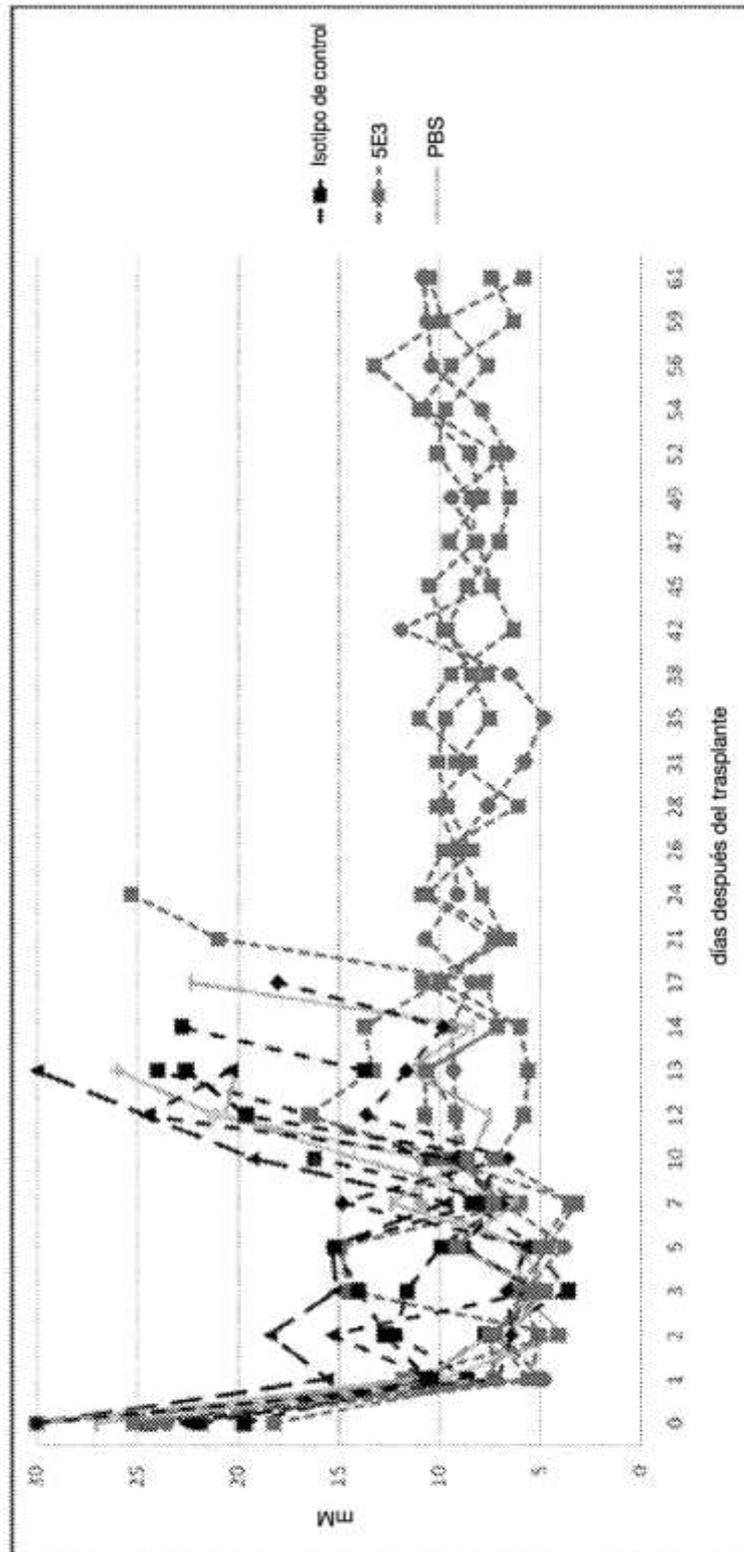


FIGURA 6

