

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 555**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2016** **PCT/US2016/020779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016** **WO16141244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2016** **E 16710059 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3265484**

54 Título: **Dímeros scFv-Fc que se unen al factor de crecimiento transformante beta1 con alta afinidad, aidez y especificidad**

30 Prioridad:

04.03.2015 US 201562128133 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2025

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.00%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

QIU, HUAWEI;
PAN, CLARK y
BIRD, JULIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 3 014 555 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

Dímeros scFv-Fc que se unen al factor de crecimiento transformante beta1 con alta afinidad, avidez y especificidad

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo Técnico

La presente invención proporciona una proteína de unión aislada que se une selectivamente a TGFβ1 humano, dicha proteína de unión es un homodímero de una cadena polipeptídica que tiene la fórmula de, desde el extremo N hasta el extremo C: (dominio VH)-(enlazador 1)-(dominio VL)-(enlazador 2)-(bisagra)-(región Fc), en donde el dominio VH comprende SEQ ID NO: 1 y el dominio VL comprende SEQ ID NO: 6, el enlazador 1 comprende SEQ ID NO: 3 O SEQ ID NO: 4, el enlazador 2 comprende SEQ ID NO:20 o una variante de la misma, en donde la variante difiere de SEQ ID NO:20 por tener hasta dos sustituciones de aminoácidos de glicina a serina o de serina a glicina, y la bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y en donde la región Fc es una región Fc de IgG1 humana o una región Fc de IgG4 humana. También se proporcionan composiciones que comprenden la proteína de unión y el uso de la misma para el tratamiento de enfermedades que implican actividad de TGFβ1.

20 Antecedentes

Muchas enfermedades graves están relacionadas con el mal funcionamiento de la vía de señalización inducida por TGFβ. Por ejemplo, se cree que un aumento del nivel tisular de TGFβ es un factor en el desarrollo de fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis miocárdica. Además, los altos niveles de TGFβ en tejidos locales pueden permitir el mantenimiento y la progresión de algunos tipos de células cancerosas. Por lo tanto, la disminución regulada de la señalización de TGFβ puede reducir la viabilidad de células tumorales de este tipo.

Las isoformas de TGFβ son moléculas homodiméricas de ~ 25 kDa con un marco estructural similar en el que dos monómeros están enlazados covalentemente a través de un puente disulfuro. Las isoformas de mamífero comparten una identidad secuencial de 70-82 %, pero tienen actividades no solapantes en el desarrollo vascular y la regulación de la función de las células inmunitarias. Se han notificado tres isoformas de TGFβ en seres humanos: TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 (números de acceso de Swiss Prot P01137, P08112 y P10600, respectivamente). TGFβ1 y TGFβ3 desencadenan una cascada de señalización celular tras la unión a los dominios extracelulares de dos receptores transmembrana, conocidos como receptores de TGFβ tipos I y II. TGFβ2 puede unirse a los receptores de TGFβ tipos I y II, así como al receptor de TGFβ tipo III.

Se han testado anticuerpos que pueden unirse a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos para su uso clínico. Por ejemplo, Grütter et al, describen GC1008, un anticuerpo monoclonal IgG4 humano (Mab; es decir, GC1008) en desarrollo clínico para tratar el cáncer y enfermedades fibróticas. Proc. NAT'l Acad. Sci. USA 105(51): 20251-56 (2008). GC1008 es un anticuerpo neutralizante TGFβ "pan-específico", porque puede neutralizar las tres isoformas de TGFβ humanas. Los anticuerpos que neutralizan selectivamente TGFβ1 se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 6.492.497 y la Patente de EE.UU. N° 7.151.169. Metelimumab, también conocido como CAT192 (IgG4), es un anticuerpo monoclonal IgG4 humano que neutraliza selectivamente TGF-β1. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU N° 6.492.497. Metelimumab se testó para el tratamiento de la esclerosis sistémica cutánea difusa, también conocida como esclerodermia, pero demostró una eficacia insuficiente. Los documentos WO 2014/164709, WO 2006/116002 y WO 2007/076391 describen anticuerpos que tienen una mayor afinidad por TGFβ1 humano en comparación con TGFβ2 y/o TGFβ3 humanos. El documento WO 2000/066631 describe anticuerpos neutralizantes de TGFβ1 basados en regiones CDR3 específicas del anticuerpo SL15 y JT182. Power et al., J Immunol Methods 251:123-135 (2001) informan un vector para la expresión rápida de una proteína de fusión scFv-Fc en *Pichia pastoris*.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Específicamente, la presente invención proporciona una proteína de unión aislada que se une selectivamente a TGFβ1 humano, en donde dicha proteína de unión es un homodímero de una cadena polipeptídica que tiene la fórmula de, desde el extremo N hasta el extremo C: (dominio VH)-(enlazador 1)-(dominio VL)-(enlazador 2)-(bisagra)-(región Fc), en donde el dominio VH comprende SEQ ID NO: 1 y el dominio VL comprende SEQ ID NO: 6; el enlazador 1 comprende SEQ ID NO: 3 O SEQ ID NO: 4; el enlazador 2 comprende SEQ ID NO:20 o una variante de la misma, en donde la variante difiere de SEQ ID NO:20 al tener hasta dos sustituciones de aminoácidos de glicina a serina o de serina a glicina; y la bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; y en donde la región Fc es una región Fc de IgG1 humana o una región Fc de IgG4 humana.

El dominio VH de la proteína de unión descrita comprende una región determinante de la complementariedad pesada variable 1 (HCDR1), una región determinante de la complementariedad pesada variable 2 (HCDR2) y una región determinante de la complementariedad pesada variable 3 (HCDR3), en donde la HCDR1 tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 22, la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y la HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

El dominio VL de la proteína de unión descrita comprende una región determinante de complementariedad ligera variable 1 (LCDR1), una región determinante de complementariedad ligera variable 2 (LCDR2) y una región determinante de complementariedad ligera variable 3 (LCDR3), en donde la LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, y la LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

El enlazador 1 tiene la secuencia de aminoácidos SGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3), o la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4).

La bisagra comprende la secuencia de aminoácidos derivada de una región bisagra de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos CPPCP (SEQ ID NO: 21).

De acuerdo con la invención, el enlazador 2 comprende la secuencia de aminoácidos GGSG (SEQ ID NO: 20), o una variante de la misma que tiene hasta 2 modificaciones de aminoácidos de glicina a serina o de serina a glicina.

La región Fc es una región Fc de IgG1 humana o una región Fc de IgG4 humana. En una realización, cada uno de los polipéptidos del dímero tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9. La estructura del dímero scFv-Fc de SEQ ID NO: 9 se muestra en la FIG. 2. El dímero scFv-Fc puede unirse a TGFβ1 selectivamente. El dímero scFv-Fc puede mostrar una constante de disociación aparente inferior a 1 nM o incluso inferior a 0,1 nM. La constante de disociación aparente se puede medir utilizando un bioensayo A549 o mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo.

El dímero scFv-Fc de la presente invención puede ser un elemento de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del dímero scFv-Fc. La composición puede comprender, además, uno o más componentes, excipientes o diluyentes biológicamente activos.

La presente invención también proporciona la proteína de unión aislada o una composición farmacéutica que comprende la misma y un excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibición de la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es una enfermedad fibrótica, cáncer, una enfermedad mediada por el sistema inmune, p. ej., esclerosis sistémica cutánea difusa, enfermedad de remodelación ósea o una enfermedad renal. El tratamiento de la enfermedad o trastorno puede comprender neutralizar TGFβ1 o inhibir la señalización de TGFβ1. El tratamiento de la enfermedad puede comprender inhibir la producción de fibronectina mediada por TGFβ1, la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), la proliferación de células epiteliales, la proliferación de células endoteliales, la proliferación de células del músculo liso o la inmunosupresión. El tratamiento de la enfermedad puede comprender aumentar la actividad de células asesinas naturales.

Aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención se describen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DEL/DE LOS DIBUJOS

Los dibujos presentados en esta memoria tienen fines ilustrativos y no se deben utilizar para limitar el alcance de la presente invención.

La FIG. 1 representa las estructuras generales de los diversos formatos.

La FIG. 2 representa los resultados de un ensayo de unión de TGFβ1 Biacore que mostró la pérdida de afinidad cuando el scFv(CAT191) se convirtió en una molécula IgG4 de longitud completa (CAT192).

La FIG. 3 muestra los resultados de un bioensayo de células A549 que compara los efectos inhibidores de diversas construcciones de anticuerpos sobre la producción de IL-11 estimulada por TGFβ1: diacuerpo 5aa de scFv (SEQ ID NO: 14); CAT191 (scFv) (SEQ ID NO: 12); CAT191 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 9); y CAT192 (IgG4) (cadena ligera SEQ ID NO: 10 y cadena pesada SEQ ID NO: 11).

La FIG. 4 representa los resultados de ensayos farmacocinéticos para determinar la semivida de CAT191 (scFv-Fc) después de la administración intravenosa (IV).

La FIG. 5 representa los resultados de los ensayos farmacocinéticos para determinar la semivida de CAT191 (scFv-Fc) después de la administración intraperitoneal (IP).

La FIG. 6 muestra los resultados de la unión específica para TGFβ1 de CAT191 (scFv-Fc) preparado a partir de células CHO.

La FIG. 7 muestra los resultados del ensayo de potencia basado en células de CAT191 (scFv-Fc) preparado a partir de células CHO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los dímeros scFv-Fc descritos se unen y neutralizan TGFβ1 selectivamente y con alta afinidad y avidéz. Los dímeros scFv-Fc muestran ventajosamente una mayor eficacia en la neutralización de TGFβ1 que cuando los dominios variables se utilizan en otros formatos. Debido a su tamaño relativamente pequeño y a su semivida prolongada en suero, los presentes dímeros scFv-Fc son candidatos ideales para aplicaciones terapéuticas.

Tal como se utiliza en esta memoria, un primer elemento "y/o" un segundo elemento significa una divulgación específica del primer o segundo elemento por separado, o el primer y segundo elemento en combinación. Las formas en singular "un", "una" y "la", "el" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Un polinucleótido (o ácido nucleico) o proteína "aislado" se elimina y/o altera de su forma natural utilizando tecnologías de ingeniería genética. Un ácido nucleico o proteína "purificado" puede ser sustancialmente puro, p. ej., al menos un 90 % puro o en forma homogénea.

"Unión selectiva", o "unir selectivamente" a TGFβ1 humano, significa que la proteína de unión (p. ej., dímero scFv-Fc) es capaz de unirse a TGFβ1 humano con una afinidad mayor que la unión a TGFβ2 humano o TGFβ3 humano, p. ej., con una constante de disociación con TGFβ1 humano al menos un 50 % menor que su constante de disociación con TGFβ2 humano o TGFβ3 humano, según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

Dímeros scFv-Fc

El dominio VH comprende la HCDR1 de SEQ ID NO: 22, la HCDR2 de SEQ ID NO: 23 y la HCDR3 de SEQ ID NO: 25. El dominio VL comprende la LCDR2 de SEQ ID NO: 28, y la LCDR3 de SEQ ID NO: 29.

Un "dominio variable" (VD, por sus siglas en inglés) se refiere a un dominio de unión hipervariable de una inmunoglobulina, o un dominio de unión a ligando de un receptor, implicado en la unión a antígeno/ligando, tal como conocen los expertos en la técnica. A los dominios variables se les alude rutinariamente por su ubicación u origen dentro de una inmunoglobulina; p. ej., dominios variables de la cadena ligera de una inmunoglobulina (VL), dominios variables de la cadena pesada de una inmunoglobulina (VH), dominios variables de la cadena pesada de una inmunoglobulina de camélido (VHH).

Un dominio variable "variante" comprende adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de referencia. Una "variante" de los dominios VH o VL puede tener hasta cuatro modificaciones de aminoácidos de este tipo. Por ejemplo, uno de los dos dominios puede comprender una sustitución de aminoácidos, mientras que el otro dominio no está modificado, o ambos dominios pueden comprender sustituciones de aminoácidos. Las modificaciones que añaden o eliminan residuos de aminoácidos se pueden realizar en el extremo N o el extremo C del dominio VH o VL. Por ejemplo, el residuo N-terminal del dominio VH puede eliminarse.

Se pueden realizar hasta cuatro sustituciones de aminoácidos para desinmunizar el dímero de scFv-Fc, por ejemplo. La desinmunización puede realizarse de acuerdo con el método de Harding et al. (2010) mAbs 2: 256-265, por ejemplo.

Los residuos marco de los dominios VH y/o VL, por ejemplo, pueden sustituirse para aumentar la estabilidad de los dímeros scFv-Fc y/o disminuir su tendencia a agregarse. La mala estabilidad puede afectar a la capacidad de los dímeros scFv-Fc expresados para plegarse adecuadamente cuando se expresan de manera recombinante, lo que da como resultado que una fracción de los anticuerpos expresados no sea funcional. Los anticuerpos de baja estabilidad también pueden ser propensos a formar agregados potencialmente inmunogénicos o pueden tener avidéz o vida útil alterada. Los polipéptidos scFv, en particular, pueden demostrar problemas con la estabilidad, solubilidad, expresión, agregación, productos de degradación, y la capacidad de fabricación general en sistemas de expresión tanto bacterianos como de mamíferos. Las sustituciones de aminoácidos marco que se espera que aumenten la estabilidad y/o disminuyan la tendencia a agregar un dominio VH y/o VL, p. ej., en un polipéptido scFv, se describen en el documento WO 2007/109254, por ejemplo. Se espera que las sustituciones en los residuos correspondientes en los dominios VH y VL de esta divulgación aumenten de manera similar la estabilidad y/o disminuyan la tendencia de los dímeros scFv-Fc a agregarse.

Se espera que las sustituciones que pueden tolerarse incluyan aquellas que reemplazarían un aminoácido de SEQ ID NO: 1, 2, 5 o 6 con un aminoácido correspondiente que se produce en otra secuencia de la línea germinal de dominio VH o VL humana. Se puede tolerar una sustitución de un aminoácido marco con un aminoácido que se produce en cualquiera de estas secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, un residuo de un dominio VH de SEQ ID NO: 1 podría sustituirse con un aminoácido que aparece en una posición correspondiente en cualquier secuencia de la línea germinal de VH, p. ej., la secuencia de la línea germinal de DP-10 (V_H 1-69) o DP-88 (V_H 1-e). Las posiciones correspondientes en este caso se determinan mediante un alineamiento de secuencias entre las diversas secuencias de la línea germinal, utilizando técnicas de alineamiento bien conocidas en la técnica, p. ej., ClustalW.

Sustituciones adicionales que se espera que se toleren son las hechas a un aminoácido con la mayor parte de su cadena lateral expuesta al disolvente, según se determina mediante el análisis de las tres estructuras de co-cristal. El área superficial accesible al disolvente de un residuo se puede estimar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, se espera que las sustituciones a aminoácidos enterrados dentro de los dominios variables se toleren mejor si la cadena lateral del aminoácido no crea impedimento estérico con residuos contiguos. Por esta razón, los aminoácidos enterrados se sustituyen generalmente con aminoácidos con cadenas laterales de tamaño similar o menor. Por ejemplo, se espera que se tolere una sustitución de un residuo de Ile enterrado con un Leu, Val, Ala o Gly. El posible impedimento estérico creado por una sustitución se puede predecir mediante el análisis de las tres estructuras de co-cristal. Sustituciones adicionales que se espera tolerar son aquellas que mantienen las interacciones electrostáticas existentes dentro de los dominios variables, p. ej., interacciones dipolo-dipolo, interacciones dipolo inducidas, enlaces hidrógeno o enlaces iónicos.

Sustituciones de aminoácidos adicionales de dominios variables incluyen aquellas que se espera que confieran nuevas propiedades útiles a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación putativos en los dominios VH y/o VL se pueden eliminar para prevenir o reducir la formación de N-glicoforamas. El residuo amino-terminal se puede sustituir con un residuo de Gln para provocar piroglutamilación, que puede disminuir el número de variantes de carga. Las sustituciones de aminoácidos pueden utilizarse para reducir el punto isoelectrónico, lo que puede disminuir la velocidad de eliminación de anticuerpos polipeptídicos IgG, por ejemplo.

Los residuos superficiales de dominios variables pueden sustituirse con residuos de Cys o Lys, por ejemplo, que luego pueden modificarse covalentemente y acoplarse a moléculas que confieren características útiles a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, p. ej., un marcador detectable, toxina, resto fijador de objetivo o proteína. Por ejemplo, el residuo de Cys se puede acoplar a un fármaco citotóxico para formar un conjugado de fármaco. Los residuos de Cys también se pueden acoplar a moléculas que aumentan la semivida sérica, p. ej., polietilenglicol (PEG) o albúmina sérica. Modificaciones de aminoácidos de este tipo se revisan en Beck et al. (2010) *Nature* 10: 345-52, por ejemplo.

Marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ^{131}I o ^{99}TC , que pueden unirse a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos utilizando métodos conocidos en la técnica. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcadores incluyen, además, restos químicos tales como biotina que pueden detectarse mediante la unión a un resto detectable afín específico, p. ej., avidina marcada. Se pueden unir otros restos que facilitan la purificación. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden marcarse con His utilizando métodos bien conocidos de modificación y expresión recombinante.

Los dominios VH y VL de los dímeros scFv-Fc están unidos entre sí por un enlazador, denominado Enlazador 1 en esta memoria. Enlazadores adecuados para preparar un fragmento scFv son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Bird et al. (1988) *Science*, 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883. Esto se puede lograr condensando los ácidos nucleicos codificantes en marco y expresando la proteína de fusión en una célula huésped adecuada, por ejemplo. Enlazadores adecuados incluyen los del tipo $[\text{G}_4\text{S}]_3$. Los enlazadores de tipo $[\text{G}_4\text{S}]_3$ están compuestos por unidades repetitivas de residuos de glicina y serina. De acuerdo con la presente invención, el enlazador 1 comprende una secuencia de SGGGSGGGGSGGGS (SEQ ID NO: 3) o GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4). Enlazadores de tipo $[\text{G}_4\text{S}]_3$ se han utilizado ampliamente para unir dominios variables en una estructura scFv, debido a que los enlazadores son hipoalergénicos y provocan distorsiones conformacionales mínimas a los dominios variables. Véase, p. ej., Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83.

En los dímeros scFv-Fc, se inserta una secuencia de enlazador corta, denominada Enlazador2 en esta memoria, entre el dominio VL y la bisagra. Esta secuencia de enlazador aumenta la flexibilidad del componente scFv con respecto al componente Fc. De acuerdo con la presente invención, Enlazador2 tiene la secuencia de GGSG (SEQ ID NO: 20). Modificaciones adecuadas en el enlazador GGSG incluyen sustituir de uno a dos aminoácidos de Gly a Ser o viceversa.

La región bisagra es un dominio flexible que une la porción scFv a la región Fc. La flexibilidad de la región bisagra en las moléculas de IgG e IgA permite que los brazos Fab adopten una amplia gama de ángulos, permitiendo la unión a epítopos separados distancias variables. La región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana que comprende SEQ ID NO: 21. La bisagra de una IgG1 humana contiene dos residuos de Cys, que pueden formar enlaces disulfuro con los residuos de Cys de la bisagra en el monómero correspondiente. La porción bisagra de IgG1 humana que forma los enlaces disulfuro contiene la secuencia de aminoácidos CPPCP (SEQ ID NO: 21). Variantes de una bisagra de IgG1 humana pueden comprender esta secuencia.

El componente scFv se fusiona en marco a una región Fc, que forma el componente Fc del dímero. Las regiones Fc son aquellas de IgG1 humana, tal como se expone en SEQ ID NO: 8, o IgG4, tal como se expone en los dominios CH₂ y CH₃ de SEQ ID NO: 11. La región Fc de un anticuerpo media su semivida sérica y funciones efectoras, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés).

Se pueden realizar modificaciones en la región bisagra y Fc para mejorar diversas propiedades de los dímeros scFv-Fc. Por ejemplo, pueden modificarse uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta diez aminoácidos de una región Fc humana que se produce de forma natural, además de modificaciones de la región bisagra. Por ejemplo, la región Fc se puede modificar para aumentar la semivida en suero del dímero de scFv-Fc. La semivida de una IgG depende de su unión dependiente del pH al receptor FcRn. FcRn, que se expresa en la superficie de las células endoteliales, se une a la IgG de una manera dependiente del pH y la protege de la degradación. Se ha demostrado que las mutaciones situadas en la interfaz entre los dominios CH₂ y CH₃, por ejemplo, aumentan la afinidad de unión a FcRn y la semivida de IgG1 *in vivo*. Modificaciones de este tipo se revisan en Strohl WR., 2009. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol. 20(6):685-91; y Vaccaro C. et al., 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. Nat Biotechnol. 23(10):1283-8, por ejemplo.

Otras modificaciones en la región bisagra y/o Fc pueden aumentar o reducir las funciones efectoras. Los cuatro isotipos de IgG humana se unen a los receptores Fcγ activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), el receptor inhibidor FcγRIIb y el primer componente del complemento (C1q) con diferentes afinidades, lo que da como resultado diferentes funciones efectoras. La unión de IgG a los FcγR o C1q, por ejemplo, depende de residuos situados en la región bisagra de IgG y el dominio CH₂. Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples de estos residuos pueden afectar a la función efectora modulando la interacción de IgG con los FcγR o C1q. Se sabe que otras sustituciones afectan a la función efectora. Estas modificaciones se revisan en Strohl (2009) "Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal Antibodies", Curr. Opin. Biotechnol. 20:685-91, por ejemplo.

Modificaciones representativas de la región bisagra y/o Fc se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Modificaciones Representativas de la Bisagra y la Región Fc

Isotipo	Especie	Sustituciones	Unión a FcR/C1q	Función Efectora	Refs
IgG1	Ser Humano	T250Q/M428L	Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada	1
IgG1	Ser Humano	1M252Y/S254T/T256E H433K/N434F	+ Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada	2
IgG1	Ser Humano	E233P/L234V/L235A/G23 A327G/A330S/P331S	6 + Unión reducida a FcγRI	ADCC y CDC reducidos	3, 4
IgG1	Ser Humano	E333A	Unión aumentada a FcγRIIIa	Aumento de ADCC y CDC	5, 6
IgG1	Ser Humano	S239D/A330L/I332E	Unión aumentada a FcγRIIIa	ADCC aumentada	7, 8
IgG1	Ser Humano	P257I/Q311	Unión aumentada a FcRn	Semivida inalterada	9
IgG1	Ser Humano	K326W/E333S	Unión aumentada a C1q	CDC aumentada	10
IgG1	Ser Humano	S239D/I332E/G236A	Aumento de la relación FcγRIIIa/FcγRIIb	Aumento de la fagocitosis macrófago	11
IgG1	Ser Humano	K322A	Unión reducida a C1q	CDC reducido	5
IgG4	Ser Humano	S228P	--	Intercambio Fab-brazo reducido	12
IgG2a	Ratón	L235E + E318A/K320A/K322A	Unión reducida a FcγRI y C1q	ADCC y CDC reducidos	10

Isotipo	Especie	Sustituciones	Unión a FcR/C1q	Función Efectora	Refs
1.	Hinton et al. (2004)	J. Biol. Chem. 279(8):6213-16.			
2.	Vaccaro et al. (2005)	Nature Biotechnol. 23(10):1283-88.			
3.	Armour et al. (1999)	Eur. J. Immunol. 29(8):2613-24.			
4.	Shields et al. (2001)	J. Biol. Chem. 276(9):6591-604.			
5.	Idusogie et al. (2000)	J. Immunol. 164(8):4178-84.			
6.	Idusogie et al. (2001)	J. Immunol. 166(4):2571-75.			
7.	Lazar et al. (2006)	Proc. NAT'l Acad. Sci. USA 103(11): 4005-10.			
8.	Ryan et al. (2007)	Mol. Cancer Ther. 6: 3009-18.			
9.	Datta-Mannan et al. (2007)	Drug Metab. Dispos. 35: 86-94.			
10.	Steurer et al. (1995)	J. Immunol. 155(3):1165-74.			
11.	Richards et al. (2008)	Mol. Cancer Ther. 7(8):2517-27.			
12.	Labrijn et al. (2009)	Nature Biotechnol. 27(8):767-71.			

Además, pueden utilizarse modificaciones de aminoácidos recombinantes para disminuir la homogeneidad estructural de los polipéptidos expresados. Un ejemplo representativo es Peters et al. (2012) J. Biol. Chem. 287(29): 24525-33, que describe sustituciones de Cys a Ser en la región bisagra de IgG4 que reducen la heterogeneidad del enlace disulfuro y aumentan la estabilidad térmica del dominio Fab. De manera similar, Zhang et al (2010) Anal. Chem. 82: 1090-99 describen la modificación genética de la región bisagra de IgG2 para limitar la reorganización de enlaces disulfuro y la formación de isómeros estructurales en aplicaciones terapéuticas. También se pueden utilizar modificaciones de aminoácidos en un dominio CH3 para eliminar residuos de Lys carboxi-terminales para reducir el número de variantes de carga. También se pueden utilizar modificaciones de aminoácidos para mejorar la función farmacológica de anticuerpos recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, pueden utilizarse modificaciones de aminoácidos para aumentar la activación del complemento, potenciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentando la unión a FcγRIIIA o disminuyendo la unión a FcγRIIIB, y/o aumentar la semivida sérica aumentando la unión a FcRn. Modificaciones de aminoácidos de este tipo se revisan en Beck et al. (2010) Nature 10: 345-52, por ejemplo.

Ácidos Nucleicos y Métodos para Preparar Dímeros scFv-Fc

También se describen ácidos nucleicos que codifican dímeros scFv-Fc. El ácido nucleico aislado puede ser un ADN sintético, un ARNm que se produce de forma no natural o un ADNc, por ejemplo. Ejemplos incluyen los ácidos nucleicos que codifican los dominios VH y VL expuestos en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9 de la Patente de EE.UU. Nº 6.492.497. Ácidos nucleicos adicionales incluyen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13, que codifica el diacuerpo-5aa expuesto en SEQ ID NO: 14, y la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, que codifica el dímero derivado de péptido de cremallera de leucina que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16. Ácidos nucleicos adicionales incluyen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17, que codifica CAT191 (scFv-Fc), que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9. El ácido nucleico se puede insertar dentro de un plásmido, vector o casete de transcripción o expresión. Los ácidos nucleicos que codifican los dímeros scFv-Fc pueden prepararse y los anticuerpos expresados pueden testarse utilizando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en Borsi et al. (2002) Int. J. Cancer 102: 75-85.

Una célula huésped recombinante puede comprender una o más construcciones anteriores. Métodos para preparar dímeros scFv-Fc comprenden expresar el ácido nucleico codificante en una célula huésped en condiciones para producir los dímeros scFv-Fc y recuperar los anticuerpos. El proceso de recuperación de los anticuerpos puede comprender el aislamiento y/o purificación de los anticuerpos. El método de producción puede comprender formular los anticuerpos en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se pretende que la expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se utiliza en esta memoria, se refiera a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Debe entenderse que se pretende que expresiones y términos de este tipo se refieran no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie de una célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido

a mutación o influencias ambientales, una progenie de este tipo puede no ser, de hecho, idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión "célula huésped", tal como se utiliza en esta memoria. Preferentemente, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los Reinos de la Vida. Células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. De la manera más preferida, las células huésped incluyen, pero sin limitación, la línea celular procariota *E. coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insectos SF9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden elegir o construir vectores adecuados que comprenden un ácido nucleico que codifica dímeros scFv-Fc, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según proceda. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, fagémidos, adenovirales, AAV, lentivirales, por ejemplo. Técnicas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, son bien conocidos en la técnica

Se pretende que el término "vector", tal como se utiliza en esta memoria, se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episómicos de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados operativamente. Vectores de este tipo se denominan en esta memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, a menudo, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores de expresión tales como vectores víricos (p. ej., retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.

La introducción de ácidos nucleicos de este tipo en una célula huésped se puede lograr utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Para las células eucariotas, técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo. Para las células bacterianas, técnicas adecuadas pueden incluir la transformación, electroporación y transfección de cloruro de calcio utilizando bacteriófago. La introducción puede ir seguida de provocar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, p. ej., cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede integrar en el genoma, p. ej., cromosoma, de la célula huésped. La integración puede fomentarse mediante la inclusión de secuencias que fomenten la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándares.

Sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes son bien conocidos. Células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, células de insectos, hongos, levadura y plantas y animales transgénicos. Líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de melanoma de ratón, células de mieloma de rata, células de riñón embrionarias humanas, p. ej., células HEK293, células de retina embrionarias humanas y muchas otras. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas, tales como *E. coli*, está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo, Plückthun *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas cultivadas también está disponible para los expertos en la técnica, tal como se revisa en Andersen et al. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 117-23, por ejemplo.

Los dímeros scFv-Fc pueden estar glicosilados, ya sea de forma natural o la elección de células huésped de expresión, p. ej., CHO, HEK293 o NSO (ECACC 85110503), o pueden estar no glicosilados, por ejemplo, si se producen mediante expresión en una célula procariota. La glicosilación también se puede alterar intencionadamente, por ejemplo, inhibiendo la fucosilación, con el fin de aumentar la actividad ADCC del dímero de scFv-Fc resultante.

Métodos de Uso de Anticuerpos o Fragmentos de Unión a Antígeno de los Mismos

Los dímeros scFv-Fc pueden ser para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, tal como un tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano, que comprende administrar una cantidad eficaz para tratar al paciente. De acuerdo con la presente invención, afecciones tratables incluyen cualquiera en las que TGFβ1 desempeña un papel, p. ej., una enfermedad fibrótica, cáncer, una enfermedad mediada por el sistema inmune, esclerosis sistémica cutánea difusa, enfermedad de remodelación ósea y enfermedad renal.

Se ha demostrado que los anticuerpos específicos para TGFβ1 humano son eficaces en modelos animales para el tratamiento de la glomerulonefritis TGFβ1 (Border et al. (1990) Nature 346: 371-374), cicatrización neural (Logan et al. (1994) Eur. J. Neurosci. 6: 355-363), cicatrización dérmica (Shah et al. (1992) Lancet 339: 213-214; Shah et al. (1994) J. Cell Science 107: 1137-1157; Shah et al. (1995) J. Cell Science 108: 985-1002) y fibrosis pulmonar (Giri et al. (1993) Thorax 48: 959-966). Además, se ha demostrado que los anticuerpos contra TGFβ1, 2 y 3 son eficaces en modelos de fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por radiación (Patente de EE.UU. Nº 5.616.561), mielofibrosis, quemaduras, contractura de Dupuytren, úlceras gástricas, y artritis reumatoide (Wahl et al. (1993) Exp. Medicine 177: 225-230).

Los dímeros scFv-Fc son útiles para tratar una enfermedad y afección que resulta directa o indirectamente de la actividad de TGFβ1. Los dímeros scFv-Fc pueden inhibir selectivamente la actividad de una isoforma de TGFβ1 humana *in vitro* o *in vivo*. Las actividades de isoformas de TGFβ1 incluyen, pero no se limitan a señalización mediada por TGFβ, deposición de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), inhibición de la proliferación celular epitelial y endotelial, fomento de la proliferación del músculo liso, inducción de la expresión de colágeno de tipo III, inducción de la expresión de TGF-β, fibronectina, VEGF e IL-11, péptido asociado a la latencia de unión, inmunosupresión inducida por tumores, fomento de la angiogénesis, miofibroblastos activadores, fomento de metástasis e inhibición de la actividad de células NK. Por ejemplo, los dímeros scFv-Fc son útiles para tratar la glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS, por sus siglas en inglés), fibrosis hepática (HF, por sus siglas en inglés), infarto agudo de miocardio (AMI, por sus siglas en inglés), fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés), esclerodermia (Ssc, por sus siglas en inglés) y síndrome de Marfan.

Los dímeros scFv-Fc son útiles para tratar enfermedades y afecciones que incluyen, pero no se limitan a enfermedades fibróticas (tales como glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis de los pulmones, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis), quemaduras, enfermedades mediadas por el sistema inmune, enfermedades inflamatorias (incluyendo artritis reumatoide), rechazo de trasplante, cáncer, contractura de Dupuytren y úlceras gástricas. También son útiles para tratar, prevenir y reducir el riesgo de aparición de insuficiencia renal, incluyendo, pero no limitado a: nefropatía diabética (tipo I y tipo II), nefropatía inducida por radiación, nefropatía obstructiva, esclerosis sistémica difusa, fibrosis pulmonar, rechazo de aloinjerto, enfermedad renal hereditaria (p. ej., enfermedad renal poliquística, riñón de esponja medular, riñón en herradura), glomerulonefritis, nefroesclerosis, nefrocalcinosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, enfermedad de Berger, hipertensión sistémica o glomerular, nefropatía tubulointersticial, acidosis tubular renal, tuberculosis renal e infarto renal. En particular, son útiles cuando se combinan con antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona que incluyen, pero no se limitan a: Inhibidores de renina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés), antagonistas del receptor Ang II (también conocidos como "bloqueadores del receptor Ang II") y antagonistas de la aldosterona. Métodos para utilizar dímeros scFv-Fc en combinación con antagonistas de este tipo se exponen en el documento WO 2004/098637, por ejemplo.

Los dímeros scFv-Fc también son útiles para tratar enfermedades y afecciones asociadas con la deposición de ECM, incluyendo esclerosis sistémica, adherencias posoperatorias, cicatrización queloide e hipertrófica, vitreorretinopatía proliferativa, cirugía de drenaje de glaucoma, lesión corneal, catarata, enfermedad de Peyronie, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, cirrosis del hígado, cicatrización post infarto de miocardio, re-estenosis post angioplastia, cicatrización después de hemorragia subaracnoidea, esclerosis múltiple, fibrosis después de laminectomía, fibrosis después de tendón y otras reparaciones, cicatrices debidas a extirpación del tatuaje, cirrosis biliar (incluyendo colangitis esclerosante), pericarditis, pleuritis, traqueostomía, lesión penetrante del sistema nervioso central, síndrome miálgico eosinófilo, reestenosis vascular, enfermedad veno-oclusiva, pancreatitis y artropatía psoriática.

Los dímeros scFv-Fc son además útiles para fomentar la re-epitelialización en enfermedades y afecciones tales como úlceras venosas, úlceras isquémicas (llagas por presión), úlceras diabéticas, sitios de injerto, sitios donantes de injerto, abrasiones y quemaduras, enfermedades del epitelio bronquial, tales como asma, ARDS, enfermedades del epitelio intestinal, tales como mucositis asociada con tratamiento citotóxico, úlceras esofágicas (enfermedad de reflujo), úlceras estomacales, lesiones del intestino delgado y del intestino grueso (enfermedad inflamatoria del intestino).

Los dímeros scFv-Fc también pueden utilizarse para fomentar la proliferación de células endoteliales, por ejemplo, en la estabilización de placas ateroscleróticas, el fomento de la cicatrización de anastomosis vasculares, o para inhibir la proliferación de células del músculo liso, tal como en enfermedades arteriales, reestenosis y asma.

Los dímeros scFv-Fc son útiles para potenciar la respuesta inmunitaria a infecciones mediadas por macrófagos. También son útiles para reducir la inmunosupresión provocada, por ejemplo, por tumores, SIDA o enfermedades granulomatosas. Los dímeros scFv-Fc son útiles para tratar enfermedades hiperproliferativas, tales como cánceres que incluyen, pero no se limitan a los cánceres de mama, próstata, ovario, estómago, renal, pancreático, colorrectal, piel, pulmón, de cuello uterino y de vejiga, glioma, mesotelioma, así como diversas leucemias y sarcomas tales como el sarcoma de Kaposi, y son útiles para tratar o prevenir recidivas o metástasis de tumores de este tipo. Los dímeros scFv-Fc de la invención también son útiles para inhibir metástasis mediadas por ciclosporina.

En el contexto de la terapia contra el cáncer, "tratamiento" incluye cualquier intervención médica que dé como resultado la ralentización del crecimiento del tumor o la reducción de las metástasis tumorales, así como la remisión parcial del cáncer con el fin de prolongar la esperanza de vida de un paciente.

Los tratamientos descritos en esta memoria pueden comprender administrar un dímero scFv-Fc o composiciones farmacéuticas que comprenden el dímero scFv-Fc. Los dímeros scFv-Fc pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento para la administración. Por ejemplo, un método para preparar un medicamento o composición farmacéutica comprende formular un dímero scFv-Fc con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiente de la afección a tratar.

La administración es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" suficiente para mostrar beneficio para un paciente. Un beneficio de este tipo puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o afección particular. La cantidad real administrada, y la velocidad y el transcurso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad o afección que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones sobre la dosificación, etc., se puede determinar basándose en estudios preclínicos y clínicos cuyo diseño está bien dentro del nivel de experiencia en la técnica.

La dosis precisa dependerá de un cierto número de factores, incluyendo si el dímero scFv-Fc es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona a tratar, y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al dímero scFv-Fc. Una dosis típica de un dímero scFv-Fc, por ejemplo, puede estar en el intervalo de 100 µg a 1 gramo para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. La dosis para un tratamiento único de un paciente adulto puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales, mensuales u otros, a discreción del médico. El tratamiento puede ser periódico, y el período entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, preferiblemente de aproximadamente tres semanas o más, más preferiblemente de aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes.

Se espera que niveles de dosis de aproximadamente 0,1, 0,3, 1, 3, 10 o 15 mg por kg de peso corporal del paciente sean útiles y seguros. Por ejemplo, 0,5-5 mg/kg en ratas y ratones ha sido una dosis eficaz en un entorno agudo. Por lo tanto, para la dosificación a largo plazo, se pueden administrar 0,3-10 mg/kg a seres humanos, basándose en una semivida esperada de 21 días. Las dosis pueden ser suficientes para la eficacia, mientras que lo suficientemente bajas para facilitar una administración óptima. Por ejemplo, una dosis de menos de 50 mg facilita la administración subcutánea. La administración intravenosa se puede utilizar como vía de administración para enfermedades graves, donde pueden ser necesarias dosis altas e intervalos de dosificación prolongados. La inyección subcutánea puede aumentar la respuesta inmunitaria potencial a un producto. La administración local para la enfermedad localizada puede reducir la cantidad de producto administrado y aumentar la concentración en el sitio de acción, lo que puede mejorar la seguridad.

Los dímeros scFv-Fc de la invención se pueden administrar mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intracavidad (p. ej., después de la resección del tumor), intralesional, intraperitoneal o intramuscular. Los dímeros scFv-Fc también se pueden suministrar por inhalación o por vía tópica (p. ej., intraocular, intranasal, rectal, en heridas, sobre la piel), u oralmente.

Habitualmente se administrará un dímero scFv-Fc en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del dímero scFv-Fc. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un excipiente, soporte, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos materiales deben ser atóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. Materiales de este tipo podrían incluir, por ejemplo, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción. Algunos ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o sustancias auxiliares, tales como agentes emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o la eficacia.

La naturaleza precisa del soporte u otro material dependerá de la vía de administración. Para la inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene una PK (farmacocinética), isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los expertos relevantes en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer e inyección de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Un dímero scFv-Fc puede formularse en formas líquidas, semisólidas o sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración previsto, la aplicación terapéutica, las propiedades físico-químicas de la molécula y la vía de suministro. Las formulaciones pueden incluir excipientes o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir una amplia gama de concentraciones

de dímero scFv-Fc y pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir por liofilización, secado por pulverización o secado mediante tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo.

Las composiciones terapéuticas se pueden formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de fármaco elevada. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el dímero scFv-Fc en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente estéril filtrada del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula de una dispersión o utilizando tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

El compuesto activo se puede preparar con un soporte que protegerá el dímero scFv-Fc contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinilo y etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de formulaciones de este tipo están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

Un método para utilizar un dímero scFv-Fc puede comprender provocar o permitir la unión a TGFβ. Dicha unión puede tener lugar *in vivo*, p. ej., después de la administración de un dímero scFv-Fc a un paciente, o puede tener lugar *in vitro*, p. ej., en ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad o ensayos basados en células, o en métodos terapéuticos basados *ex vivo*, p. ej., métodos en los que las células o los fluidos corporales se ponen en contacto *ex vivo* con un dímero scFv-Fc y después se administran a un paciente.

También se describe un kit que comprende un dímero scFv-Fc. El dímero scFv-Fc puede marcarse para permitir que se determine su reactividad en una muestra. Los kits se pueden emplear en análisis de diagnóstico, por ejemplo. Un kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes. En el kit se pueden incluir materiales auxiliares para ayudar o permitir la realización de un método de este tipo.

La reactividad de un dímero scFv-Fc en una muestra puede determinarse por cualquier medio apropiado, p. ej., radioinmunoensayo (RIA). El antígeno marcado radiactivamente se puede mezclar con el antígeno no marcado (la muestra de ensayo) y se permite que se una al dímero scFv-Fc. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo unido al dímero scFv-Fc. También se puede utilizar un ensayo de unión competitiva con antígeno no radiactivo, utilizando un antígeno o un análogo enlazado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o colorante. Fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red. Colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas tal como perlas de látex que son coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológica o químicamente activos que pueden provocar, directa o indirectamente, que las señales detectables se observen visualmente, se detecten electrónicamente o se registren de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian colores o provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de modo que las transiciones electrónicas entre estados energéticos dan como resultado absorciones espectrales o emisiones características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas conjuntamente con biosensores. Se pueden emplear sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina. Las señales generadas por conjugados de anticuerpo-indicador pueden utilizarse para obtener datos cuantificables absolutos o relativos de la unión del anticuerpo relevante en muestras.

El dímero scFv-Fc también se puede utilizar para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición. El dímero scFv-Fc se puede enlazar a una molécula informadora de modo que se produzca un cambio físico u óptico al unirse, por ejemplo. La molécula informadora puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferiblemente medibles. Las moléculas informadoras pueden unirse directa o indirectamente, de forma covalente, p. ej., mediante un enlace peptídico o de forma no covalente. El dímero scFv-Fc y un indicador proteico pueden estar unidos por un enlace peptídico y expresarse de manera recombinante como una proteína de fusión.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación, incluyendo la siguiente ejemplificación experimental.

Ejemplos

Ejemplo 1: Afinidad y Potencia del Anticuerpo scFv e IgG4

CAT192(IgG4) (metelimumab) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humana que neutraliza selectivamente TGF- β 1. TGF β 1 (20-600RU) se inmovilizó en un chip CM5 en Biacore utilizando química NHS/EDC. Se inyectaron varias cantidades de CAT192(IgG4) sobre la superficie para monitorizar la unión a TGF β 1 determinada por resonancia de plasmón superficial. Los datos se analizaron con un modelo de unión 1:1 para determinar las constantes de unión. Se encontró que CAT192(IgG4) se une a TGF β 1 con una afinidad relativamente baja según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, cuando se compara con la unión por el CAT191scFv precursor tal como se muestra en la FIG. 2. CAT192(IgG4) también mostró una eficacia relativamente baja (CI50 = ~10 nM) en un ensayo de potencia basado en células A549, que midió la inhibición de la producción de IL-11 estimulada por TGF β 1. Resultados representativos de un ensayo basado en A549 se muestran en la FIG. 3. El ensayo basado en A549 se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en Rapoza et al. (2006) "Development of an in vitro potency assay for therapeutic TGF β antagonists: The A549 cell bioassay," J. Immunol. Methods 316: 18-26. Aunque una constante de disociación aparente de ~10 nM mostró unión específica a TGF β 1, las aplicaciones terapéuticas de CAT192 (IgG4) se beneficiarían de una mayor potencia relativa.

Ejemplo 2: Anticuerpo IgG1 modificado

La afinidad de CAT192(IgG4) puede potenciarse ligeramente mediante determinadas condiciones desnaturalizantes, lo que sugiere que el plegamiento de anticuerpos puede haber provocado la pérdida de afinidad durante la conversión de scFv en IgG4. Se ha propuesto que el plegamiento de IgG4 sea único (Aalberse y Schuurman "IgG4 breaking the rules", Immunology 105:9-19). El intercambio de brazos Fab en IgG4 y la interacción de Fab con el dominio Fc CH2 pueden explicar posiblemente esta pérdida de afinidad por CAT192(IgG4). Por lo tanto, CAT192 se remodeló para producir la versión de IgG1 reemplazando Fc de IgG4 (dominios CH1, CH2 y CH3) por la secuencia de IgG1 consenso. El ADN que codifica CAT192 (IgG1) se sintetizó a partir de GeneArt y se subclonó en el vector de expresión pCEP4(-E+I)Dest.

Se produjo CAT192(IgG1) a partir de la transfección HEK293 y se purificó con columna de Proteína A. Sin embargo, la remodelación de CAT192 de IgG4 a IgG1 no aumentó su afinidad. Los fragmentos Fab generados a partir de IgG1 e IgG4 tampoco aumentaron su afinidad. Se concluyó que la alta afinidad de CAT191(scFv) (SEQ ID NO: 12) durante la conversión a un formato de anticuerpo de longitud completa, ya sea una IgG1 o IgG4. Esto era inesperado, porque los componentes de scFv obtenidos de una colección a menudo se modifican por ingeniería genética en un formato de IgG de longitud completa para el desarrollo terapéutico.

Ejemplo 3: Diversos Diseños de Dímeros

Se encontró que CAT191(SCFV) (SEQ ID NO: 12) se unía a TGF β 1 con alta afinidad, utilizando resonancia de plasmón superficial, pero CAT191(scFv) carecía de la avidez necesaria para la neutralización eficaz de TGF β 1. Por consiguiente, se testaron diversos otros formatos, utilizando el componente scFv como un bloque básico de construcción. Los formatos generales de fragmentos de anticuerpo, incluidos los formatos testados, se representan en la FIG. 1.

Los formatos testados incluían un diacuerpo, un dímero derivado de péptidos (*p. ej.*, un dímero derivado de péptido de cremallera de leucina) y un dímero scFv-Fc. El diacuerpo CAT191 de scFv tuvo el enlazador de tipo (Gly4Ser)3 reemplazado por un enlazador corto de 5aa (GSSGG) (SEQ ID NO: 19) para crear un aglutinante divalente no covalente (dímero de diacuerpo). Cada uno de los monómeros tenía la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14. Cada uno de los monómeros del dímero derivado de péptido de cremallera de leucina tenía la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 16. Finalmente, cada uno de los monómeros del dímero scFv-Fc tenía la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9. El diacuerpo y el dímero derivado de péptidos se expresaron en *E. coli* y el scFv-Fc se expresó en células HEK293.

El dímero derivado de péptido con cremallera de leucina fue difícil de expresar, y el dímero parcialmente purificado solo mostró afinidad intermedia, medida por resonancia de plasmón superficial. El diacuerpo (scFv 5aa) solo mostró afinidad intermedia, pero no avidez. Por el contrario, se descubrió que un dímero scFv-Fc producido a partir de transfección HEK293 transitoria se unía a TGF β 1 específicamente con alta afinidad y avidez. Los resultados de unión expresados como constantes de disociación aparentes obtenidas con resonancia de plasmón superficial se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados de Unión para Dímero scFv-Fc

Muestra	24 RU TGF β 1 K _D (nM)	105 RU TGF β 1 K _D (nM)	544 RU TGF β 1 K _D (nM)
ScFv-Fc	0,5	0,2	0,09
CAT191 scFv	1,7	1,6	1,3

Muestra	24 RU TGFβ1 K _D (nM)	105 RU TGFβ1 K _D (nM)	544 RU TGFβ1 K _D (nM)	
ScFv 5aa	4,1	3,9	4,8	Avidity
				No Avidity

La potencia neutralizante de TGFβ1 de diversos formatos también se comparó en el bioensayo basado en células A549. La FIG. 3 muestra los resultados del bioensayo A549 para el diacuerpo ("diacuerpo scFv 5aa"), CAT191(scFv) ("scFv"), el dímero scFv-Fc ("CAT191(scFv-Fc)") y CAT192(IgG4) ("CAT192"). Tal como se observa en la FIG. 3, el dímero scFv-Fc demostró una constante de disociación aparente en este ensayo a lo largo de cuatro órdenes de magnitud inferior a CAT192 (~10⁻³ nM frente a ~10¹ nM).

Ejemplo 4: Clon scFv-Fc

Se clonó CAT191(scFv-Fc) y se produjo a mayor escala en células CHO. La secuencia codificante de scFv-Fc CAT191 se amplificó por PCR a partir de un vector de expresión basado en pCEP4 utilizando un conjunto de cebadores directos e inversos específicos para genes. Como parte de la amplificación por PCR, se introdujeron los siguientes cambios en la secuencia codificante de scFv-Fc CAT191: 1) adición de sitios de endonucleasa en los extremos 5' y 3', 2) adición de la secuencia consenso de Kozak inmediatamente cadena arriba del codón de inicio, 3) cambio del codón de parada "ETIQUETA" a "TAA" y 4) mutación de los 4 nucleótidos de timidina cadena arriba del codón de parada a una guanosina, eliminando así un sitio donante de corte y empalme endógeno. La mutación en el sitio donante de corte y empalme no dio como resultado un cambio de aminoácido.

La secuencia codificante de CAT191 amplificada por PCR se subclonó en un vector lanzadera para facilitar la verificación de la secuencia y la clonación molecular. Después de la verificación de la secuencia, la secuencia codificante de CAT191 se clonó en vectores de expresión de Genzyme pGZ600 y pGZ620. Ambos vectores utilizaron el promotor de β-actina de hámster para dirigir la expresión del transgén CAT191. También contenían el marcador seleccionable DHFR que estaba dirigido por un promotor separado (SV40) para permitir la selección en células CHO. La línea celular huésped CHO-8D6 se transfectó con el plásmido de expresión pGZ600-CAT191 o pGZ620-CAT191. Después de un breve periodo de recuperación, las células transfectadas se colocaron en medio de crecimiento deficiente en nucleótidos para la selección para generar combinaciones de transfectantes estables. Después de que los grupos se recuperaran de la selección, se realizó una segunda ronda de selección en presencia de metotrexato 20 nM. Las combinaciones de CHO seleccionadas de esta manera se aumentaron progresivamente y el medio acondicionado se utilizó para la purificación utilizando columna de proteína A.

La proteína producida por células CHO se caracterizó por SDS-PAGE, unión a Biacore, SEC-HPLC y el ensayo de potencia celular A549. Los resultados confirmaron que el dímero scFv-Fc tenía una mayor afinidad y potencia, y neutralizó específicamente TGFβ1. La potencia se comparó favorablemente con el anticuerpo GC1008 pan-específico (FIG. 6 y FIG. 7).

Ejemplo 5: Semivida de Circulación

La semivida de circulación de CAT191(scFv-Fc) se ensayó en un modelo de ratón utilizando el diseño del estudio representado en la Tabla 3.

Tabla 3: Semivida de Circulación del Dímero scFv-Fc

Grupo	Nº Animal	Artículo de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Ruta de la Dosis	Puntos Temporales
1	1-8	ScFv-Fc	1,0	IP	2, 6, 24, 72, 144, 240, y 336 horas post-dosis
2	9-16	ScFv-Fc	1,0	IV	0,25, 6, 24, 72, 144, 240 y 336 horas post-dosis

Se extrajo sangre del plexo retro-orbital en los tiempos especificados después de la administración intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV). Se recogieron aproximadamente 60 µL de sangre entera en tubos de hematocrito y se procesaron para determinar el suero. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. La concentración de CAT191(scFv-Fc) se determinó mediante ELISA. Los resultados de este estudio farmacocinético se representan en la FIG. 4 y la FIG. 5. Los resultados sugirieron una semivida de circulación de 1,5-2,0 días, mucho más larga que la de una molécula scFv típica, que es de varias horas.

Ejemplo 6: Estabilidad del Dímero scFv-Fc

La estabilidad de CAT191(scFv-Fc) almacenada a -80 °C se monitorizó durante un año mediante SEC-HPLC, unión a Biacore TGFβ1 y el ensayo de potencia de A549. No se observó cambio alguno en la agregación, afinidad o potencia durante el periodo de ensayo. El material almacenado a 4 °C muestra un ligero pero constante aumento de la agregación a lo largo de 1 año. La combinación única de menor tamaño, alta selectividad, potencia contra TGFβ1 y larga semivida *in vivo* hizo que CAT191(scFv-Fc) fuera un candidato ideal para aplicaciones terapéuticas.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 SEQ ID NO: 1: Clon SL15 del dominio VH de IgG1 humana (SQN4 US6492497)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDT
DPQYSWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 2: Clon JT182 del dominio VH de IgG1 humana (SQN10 US6492497)

15 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDT
PASPDWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 3: Enlazador sintético

20 SGGGSGGGGSGGGGGS

SEQ ID NO: 4: Enlazador sintético

GGGGSGGGGSGGGGGS

25 SEQ ID NO: 5: Dominio Vk de IgG1 humana Clon SL15A: (SQN6 US6492497)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

30 SEQ ID NO: 6: Dominio Vk de IgG1 humana Clon SL15S: (SQN8 US6492497)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 7: Región bisagra de IgG1 humana

35 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

SEQ ID NO: 8: Región Fc de IgG1 humana

40 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 9: CAT191(scFv-Fc)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDT
DPQYSWGQGTTTVTVSSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCR
SSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPE
DFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGSGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPKPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

45 SEQ ID NO: 10: Cadena Ligera de CAT192 (IgG4)

EWLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQS
GVPSRFGSGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRTVAA
PSVFIIPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 11: Cadena Pesada de CAT192 (IgG4)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDT
DPQYSWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKITYTCNV DHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 12: CAT191(scFv)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDT
DPQYISWGGQGTIVTVSSSSGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR
SSQIGGDDLGGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPE
DFATYYCLODSNYPLTFGGGTREIK

SEQ ID NO: 13: Ácido nucleico que codifica diacuerpo-Saa

atgaccatgatacggccaagcttggagaccttttttggagatttcaacgltgaaaaaattatattacgcaatccctttagttgtctcttc
taigcggcccaacggcccatggccgaggtgcagctgtgtggagctcggggaggcggtgtccagcctgggaggtccctgaga
ctctctgtgcagcctctggtatcaacctcagtagctatggcagtcacatgggttcggccagggtccaggccaaggagctggagtggtg
gtggcagttatafcafaagatggaagtattaaatactatgcagactccgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaa
gaaacgcgttatctgcaaaagaacagcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgttgccgaaactgtgaalalagtgg
ctacgatacggacccccagtaactctgtggggcaaggagaccacggtaacggctctctcaggttctctgtgctgggtgaanaftgtct
gactcagctccatctctctgtctgcactgttaggaacagagtcacatcacttccgggtcaagtcaaggccattggagatgatt
gggctgtgtacgcaagaagccagggaagcccctatccctcagatcattggtacatcaaccattcaaaaagtggggtcccgtaag

gttcacgaggcagttggaactgacacagatttcaactctacatcaacagccgcagcctgaagattttgcaacttattactgtctaca
agattccaattaccgcctcactttcggggggaggacacgactggagattaaaagtgcggccgcacatcatcaccatcagg
ggccgcagaaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaalggggccgcagtagctcgagalcacacgggctagccagcca
gaactcggcccggaagaccccgaggatgtcgaagcaccaccaccaccac

SEQ ID NO: 14: Diacuerpo-Saa

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTESYGMHWVRQAPGKLEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARTGEYSGYDT
DPQYSWGQGT TTVTVSSGSSGGEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQGIGDDL
G WYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQ
DSNYPLTFGGGT RLEIKRAAAHHHHHHHGA AEOKLISEEDLNGAA

SEQ ID NO: 15: Dímero derivado de péptido de cremallera de leucina que codifica ácido nucleico

gaagtgacagctgggagctctggggagggcgtggtccagcctggaggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcac
cttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggtccaggaagagagctggagtggtggcagttatcatatgatggaag
tattaaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaaca
gcttgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcggaactgtggaatatagtggctacgatacggacccccagtactct
gggggcaaggagaccacggtcaccgtctctcaagtggaggggttcagggcggaggtggcagcgcggtggcggtatcgga
attgtctgactcagctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcaactgcccgtcaagtcaggcgattgga
gatgatttggcgtgtatcagcagaagccagggaagccccatccctctgtatctgtgacatccactflacaagtggtgggtccc
gtcaagggttcagcgggcagtggtatcggcagatctcactctcaccatcaacagcctgcagcctgaagatttgcacttattactg
tctacaagattccaattaccgctcacttccggcgaggggacacgactggagattaaacgtggcgcgacatcatcatccat
cacggggcgcgagaaacaaacatcactcagaaggagatctggaatggggcgccagcccaagccagtaacccccagggtctt
cagcggaactggagaaactgctgaaacatctgaaagaactgctgaaagcccgctaaaggcgaaactggagaaactgctgaa
acatctgaagaactgctgaaaggcggtgctggcgggcggtcatcatcatcaccatcat

SEQ ID NO: 16: Dímero derivado del péptido de cremallera de leucina

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISY
DGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARTGEYSGYDT
DPQYSWGQGTITVTVSSSGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR
SSQIGDDLGWYQKPKGAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSQSGSGTDFTLTINSIQPE
DFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRAAAHHHHHHHGA AEQKLISEEDLNGAAP
KPSPTPPGSSGELEELKHLKELLKGPRKGELEELKHLKELLKGGAPGGHHHHHHH

SEQ ID NO: 17: Ácido nucleico que codifica CAT191(scFv-Fc)

gaagtgacagctgggagctctggggagggcgtggtccagcctggaggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcac
cttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggtccaggaagagagctggagtggtggcagttatcatatgatggaag
tattaaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaaca
gcttgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcggaactgtggaatatagtggctacgatacggacccccagtactct
gggggcaaggagaccacggtcaccgtctctcaagtggaggggttcagggcggaggtggcagcgcggtggcggtatcgga
attgtctgactcagctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcaactgcccgtcaagtcaggcgattgga
gatgatttggcgtgtatcagcagaagccagggaagccccatccctctgtatctgtgacatccactflacaagtggtgggtccc
gtcaagggttcagcgggcagtggtatctggcagagatctcactcaccatcaacagcctgcagcctgaagatttgcacttattactg
tctacaagattccaattaccgctcacttccggcgaggggacacgactggagattaaagggtggcagcgacctaactctgtgac
aaaactcacacatgccacccgtgccagcaccctgaactccggggggaocgctcagttctctcttcccccaaaacccaaggac
accctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgtgtgtggacgtgagccaggaagaccctgaggtcaagtcaactg
gtacgtggagcggtggaggtgcataatgccagacaaagccggcgaggagcagtaacacagcagctaccgtgtgtgtcag
cgtctcaccgtctctcaccaggaactgctgaatggcaaggagtaacagtcaggtctccaaacaaagccctccagccccca
tcgagaaaaccatctccaagccaaaggcgagcccggaaccacaggtgtacacccctgccccatccgggagtgagctgac
caagaaccaggtcagcctgacgtgctgtgcaagggttctatccagcgacatcgccgtggaatgggagagcaatgggcag
ccggagaaactacaagaccacgctccctgctgtgactccgacggctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaag
agcagatggcagcaggggaactctctcatgctcctgtatgcatgaggtctctgcacaaacctaacgcagagaagacccctc
ccgtgctccgggtaaatagtag

SEQ ID NO: 18: TGFβ1 humano

ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSL
DTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRS
CKCS

SEQ ID NO 19

GSSGG

SEQ ID NO 20

GGSG

SEQ ID NO 21

CPPCP

SEQ ID NO 22

SYGMH

5 **SEQ ID NO 23**

VISYDGSIKYADSVKG

SEQ ID NO 24

10 TGEYSGYDTSGVEL

SEQ ID NO 25

15 TGEYSGYDTPQYS

SEQ ID NO 26

20 TGFYSGYDTPASPD

SEQ ID NO 27

RASQGIGDDL

25 **SEQ ID NO 28**

GTSTLQS

SEQ ID NO 29

30 QDSNYPLT

SEQ ID NO 30

35 TGX₁YSGYDTX₂X₃X₄X₅X₆

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión aislada que se une selectivamente al TGFβ1 humano, en donde dicha proteína de unión es un homodímero de una cadena polipeptídica que tiene la fórmula de, desde el extremo N al extremo C:
5 dominio VH-enlazador 1 -dominio VL-enlazador 2 -bisagra -región Fc,
en donde
el dominio VH comprende SEQ ID NO: 1 y el dominio VL comprende SEQ ID NO: 6;
el enlazador 1 comprende SEQ ID NO: 3 O SEQ ID NO: 4;
el enlazador 2 comprende SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma, en donde la variante difiere de SEQ ID NO: 20
10 al tener hasta dos sustituciones de aminoácidos de glicina a serina o de serina a glicina; y
la bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y
la región Fc es una región Fc de IgG1 humana o una región Fc de IgG4 humana.
- 15 2. La proteína de unión aislada de la reivindicación 1, en donde la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
3. La proteína de unión aislada de la reivindicación 1 o 2, en donde la cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9.
- 20 4. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el enlazador 2 es SEQ ID NO: 20.
5. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibir la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es una enfermedad fibrótica.
- 30 7. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibir la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es cáncer.
- 35 8. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibición de la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario.
- 40 9. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibir la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es esclerosis sistémica cutánea difusa.
- 45 10. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibir la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es una enfermedad de remodelación ósea.
- 50 11. La proteína de unión aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un ser humano que necesita inhibir la actividad de TGFβ1, en donde la enfermedad es una enfermedad renal.

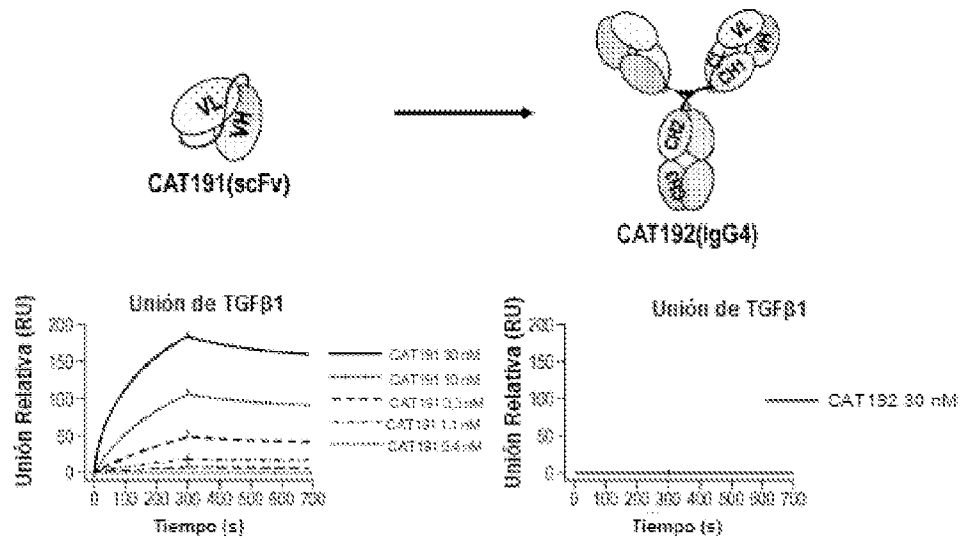


Fig. 2

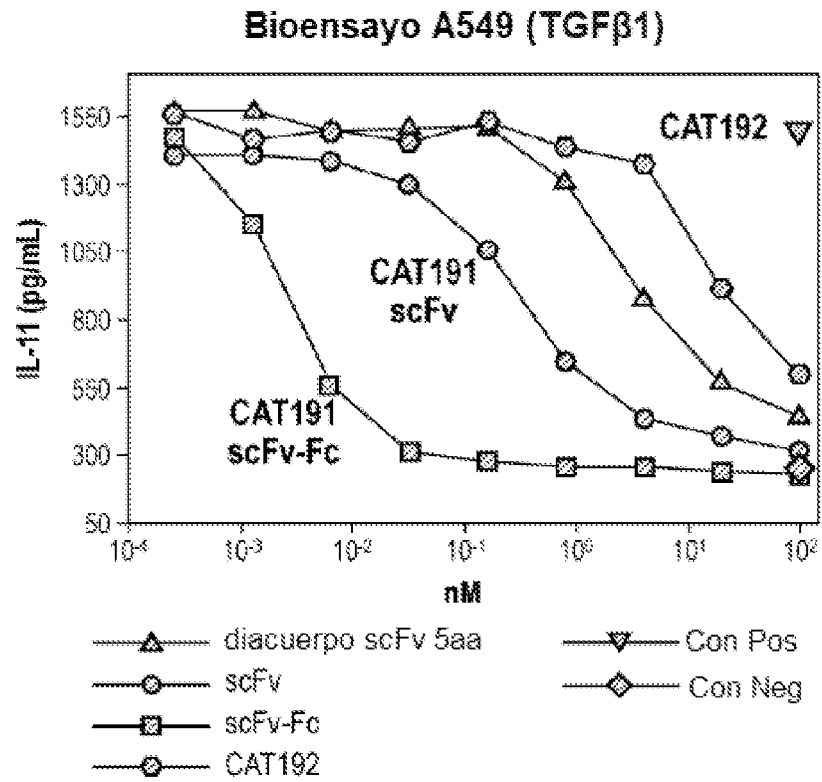


Fig. 3

IV

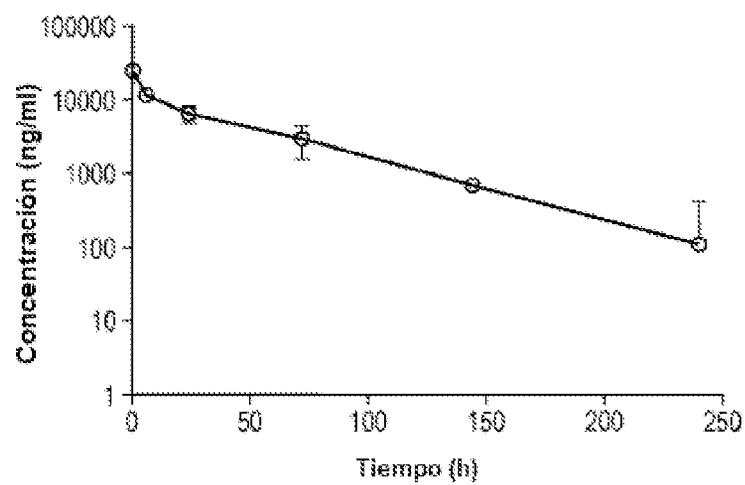


Fig. 4

IP

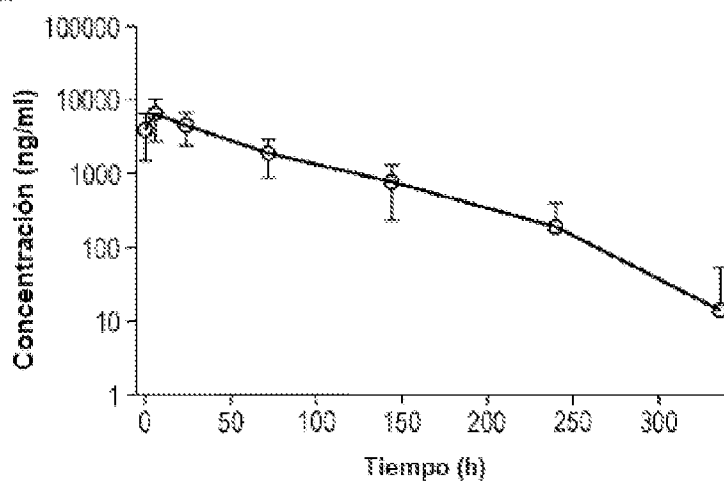


Fig. 5

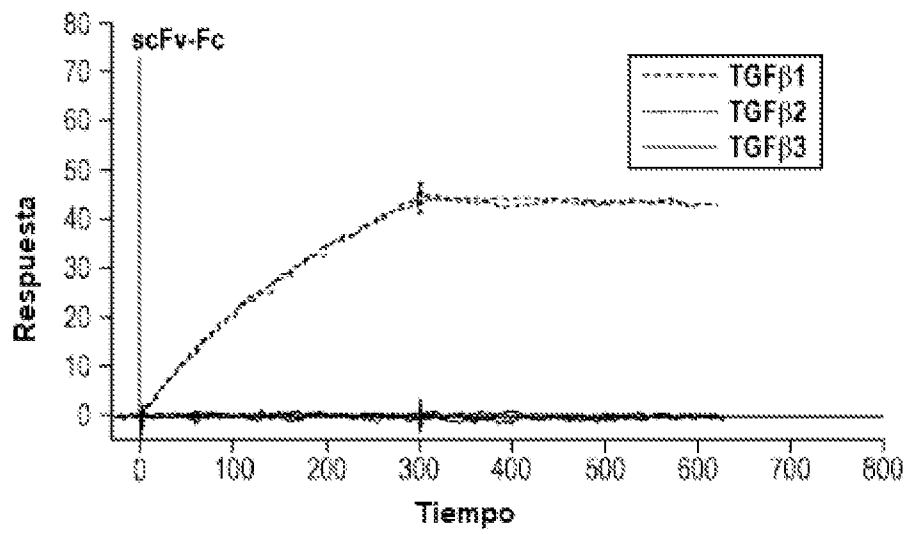


Fig. 6

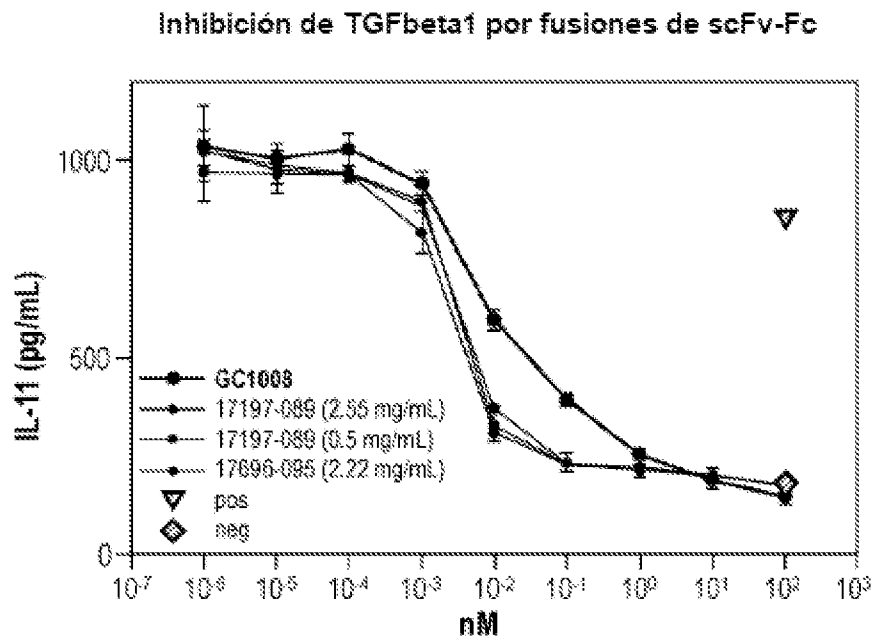


Fig. 7