

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 845 215**

(51) Int. Cl.:

**C12P 21/08** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 14/495** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 18181808 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3415633**

---

(54) Título: **Anticuerpos anti-TGF-β modificados genéticamente y fragmentos de unión a antígeno**

(30) Prioridad:

**11.03.2013 US 201361776430 P**

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

**26.07.2021**

(73) Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)  
50 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

(72) Inventor/es:

**WEI, RONNIE;  
MOULIN, AARON;  
MATHIEU, MAGALI;  
PAN, CLARK;  
PARK, SUNGHAE y  
QIU, HUAWEI**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 845 215 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-TGF- $\beta$  modificados genéticamente y fragmentos de unión a antígeno

### Campo técnico

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos están modificados genéticamente para unirse al Factor  $\beta$  de Crecimiento Transformante (TGF- $\beta$ ). Se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos o fragmentos de los mismos, y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades que implican la actividad de TGF- $\beta$ .

### Antecedentes

Muchas enfermedades graves están relacionadas con el mal funcionamiento de la ruta de señalización inducida por TGF- $\beta$ . Se cree que un aumento del nivel en los tejidos de TGF- $\beta$  es un factor en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática y de la fibrosis miocárdica, por ejemplo. Además, los elevados niveles tisulares locales de TGF- $\beta$  pueden permitir el mantenimiento y la progresión de algunos tipos de células cancerosas. La disminución de la señalización de TGF- $\beta$ , por lo tanto, puede reducir la viabilidad de dichas células tumorales.

Las isoformas de TGF- $\beta$  son moléculas de ~25 kDa homodímericas con un marco estructural similar, en el que dos monómeros están enlazados covalentemente a través de un puente de disulfuro. Las isoformas de mamíferos comparten una identidad de secuencia de 70-82%, pero tienen actividades no solapantes en el desarrollo vascular y la regulación de la función de las células inmunitarias. Tres isoformas de TGF $\beta$  están presentes en los seres humanos: TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 (números de acceso Swiss Prot P01137, P08112, y P10600, respectivamente). TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 desencadenan una cascada de señalización celular tras la unión a los dominios extracelulares de dos receptores transmembránicos, conocidos como receptores de TGF $\beta$  tipos I y II. Se cree también que la unión de TGF $\beta$ 2 implica los receptores de TGF $\beta$  tipos I y II, así como el receptor de TGF $\beta$  tipo III.

Se han generado moléculas de anticuerpo que pueden unirse a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3 (por ejemplo, patente U.S. nº 7.723.486 de Genzyme). Grüter et al. (2008) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 105(51): 20251-56, por ejemplo, describen GC1008, un anticuerpo monoclonal (MAb) IgG4 humano en desarrollo clínico para el tratamiento de neoplasias y enfermedades fibróticas. GC1008 es un anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  "pan-específico", ya que puede neutralizar las tres isoformas de TGF $\beta$  humanas. GC1008 se une a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3 humanos con afinidades similares. El epítopo de TGF $\beta$  reconocido por GC1008 se solapa en el sitio de unión de TGF $\beta$  para los receptores de TGF $\beta$  tipos I y II, lo que se cree que subyace a la capacidad neutralizante de GC1008. Grüter et al. describen la estructura tridimensional de un fragmento Fab de GC1008 en un complejo con TGF $\beta$ 3 a una resolución de 3,1 Å. El complejo consiste en un homodímero de TGF $\beta$ 3 flanqueado por dos fragmentos Fab de GC1008. Véase también la entrada 3eo0 de Proteopedia, "Structure of the Transforming Growth Factor-Beta Neutralizing Antibody GC-1008", en Internet en proteopedia.org/wiki/index.php/3eo0 (modificada por última vez el 20 de octubre de 2012); y la entrada 3eo1 de Proteopedia, "Structure of the Fab Fragment of GC-1008 in Complex with Transforming Growth Factor-Beta 3", en Internet en proteopedia.org/wiki/index.php/3eo1 (modificada por última vez el 20 de octubre de 2012).

### Sumario

Se describen anticuerpos de unión a TGF $\beta$  o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos de unión a TGF $\beta$  o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden ser pan-específicos para todas las isoformas de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3). Tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden neutralizar todas las isoformas de TGF $\beta$ . Alternativamente, o además, los anticuerpos de unión a TGF $\beta$  o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse selectivamente a TGF $\beta$ 1 humano, en comparación con TGF $\beta$ 2 humano y TGF $\beta$ 3 humano, o unirse selectivamente a TGF $\beta$ 3 humano, en comparación con TGF $\beta$ 1 humano y TGF $\beta$ 2 humano. Los antagonistas específicos de las isoformas de TGF $\beta$  pueden presentar menores efectos secundarios potenciales. El diseño de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se ve facilitado por una estructura co-crystalina de un fragmento Fab recombinante del anticuerpo monoclonal GC1008, GC1008(Fab) en la presente memoria, unido a TGF $\beta$ 2, y por otra estructura co-crystalina de la versión scFv de GC1008, conocida como GC1009 o GC1009(scFv) en la presente memoria, unido a TGF $\beta$ 1.

Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una variante de un dominio de la cadena pesada variable (VH) de PET1073G12 (SEQ ID NO: 1) que tiene un paratopo de TGF $\beta$  y restos no paratópicos, y un dominio de la cadena ligera variable (VL) de PET1073G12 (SEQ ID NO: 2) que tiene un paratopo de TGF $\beta$ 1 y restos no paratópicos,

en el que el dominio VH comprende hasta 20 sustituciones de restos paratópicos y hasta 20 sustituciones de restos no paratópicos;

en el que el dominio VL comprende hasta 20 sustituciones de restos paratópicos y hasta 20 sustituciones de restos no paratópicos; y

en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de unirse a TGF $\beta$  humano (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3).

- 5 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser capaz de unirse a las tres isoformas de TGF $\beta$  humano, incluyendo TGF $\beta$ 1 humano, TGF $\beta$ 2 humano, y TGF $\beta$ 3 humano. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a las tres isoformas de TGF $\beta$  humano con una afinidad de dos veces, 2,4 veces, tres veces, cinco veces, diez veces, o más, que GC1008 (Fab) o GC1009 (scFv). El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden comprender una sustitución del resto Y27, S30, S31, N32, I52, I54, V55, D56, N59, E74 y/o G101. Y27 puede ser sustituido por Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp. S30 puede ser sustituido por Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Tyr o Trp. S31 puede ser sustituido por Ala, Glu, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Arg, Thr, Val o Trp. N32 puede ser sustituido por Ala, Asp, Glu, Gly, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr. I52 puede ser sustituido por Val. 154 puede ser sustituido por Ala, Phe, His, Leu, Met, Pro, Thr, Val o Trp. V55 puede ser sustituido por Phe o Gly. D56 puede ser sustituido por Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Tyr o Val. N59 puede ser sustituido por Arg o Tyr. E74 puede ser sustituido por Ala, Cys, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp, o Tyr. G101 puede ser sustituido por Tyr. El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 19 sustituciones de restos paratópicos. Preferiblemente, el dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 18 sustituciones de restos paratópicos. Una sustitución en el paratopo se puede seleccionar de las sustituciones indicadas en la TABLA 5. El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 18 sustituciones de restos no paratópicos. Preferiblemente, el dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 12 sustituciones de restos no paratópicos.

Como alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser capaz de unirse selectivamente a TGF $\beta$ 1 humano, en comparación con TGF $\beta$ 2 humano y TGF $\beta$ 3 humano. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse selectivamente a TGF $\beta$ 1 con una afinidad de dos veces, 2,4 veces, tres veces, cinco veces, diez veces, o más, que GC1008 (Fab) o GC1009 (scFv). El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 20 sustituciones de restos paratópicos, preferiblemente hasta 19 sustituciones de restos paratópicos, y más preferiblemente hasta 12 sustituciones de restos paratópicos. Una sustitución en el paratopo se puede seleccionar de las sustituciones indicadas en la TABLA 5. El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 20 sustituciones de restos no paratópicos, preferiblemente hasta 18 sustituciones de restos no paratópicos, y más preferiblemente hasta 12 sustituciones de restos no paratópicos.

Como alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser capaz de unirse selectivamente a TGF $\beta$ 3 humano, en comparación con TGF $\beta$ 1 humano y TGF $\beta$ 2 humano. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse selectivamente a TGF $\beta$ 3 con una afinidad dos veces, 2,4 veces, tres veces, cinco veces, diez veces, o más, que GC1008 (Fab) o GC1009 (scFv). El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 20 sustituciones de restos paratópicos, preferiblemente hasta 19 sustituciones de restos paratópicos, y más preferiblemente hasta 12 sustituciones de restos paratópicos. Una sustitución en el paratopo se puede seleccionar de las sustituciones indicadas en la TABLA 5. El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 20 sustituciones de restos no paratópicos, preferiblemente hasta 18 sustituciones de restos no paratópicos, y más preferiblemente hasta 12 sustituciones de restos no paratópicos.

En cualquier caso anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG1, IgG2, o IgG4, por ejemplo una variante del anticuerpo monoclonal GC1008. El fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser un scFv, por ejemplo una variante de GC1009 (scFv), o un di-scFv, por ejemplo. Como alternativa, el dominio VH puede comprender adicionalmente un dominio constante de la cadena pesada humana, por ejemplo un dominio constante de IgG1, IgG2, o IgG4, y el dominio VL puede comprender adicionalmente un dominio constante de la cadena ligera humana, por ejemplo un dominio constante de cadena ligera  $\kappa$ . El dominio constante de la cadena pesada puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, y el dominio constante de la cadena ligera puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4. El fragmento de unión a antígeno en esta realización puede ser un Fab, un Fab', o un F(ab')<sub>2</sub>, por ejemplo una variante de GC1008 (Fab).

- 50 Un ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El ácido nucleico aislado puede ser un ADNc. Una célula hospedante puede comprender el ácido nucleico aislado. Un método de fabricación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender cultivar la célula hospedante en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo producido por este método se pueden purificar.

Una composición puede comprender uno de los anticuerpos mencionados anteriormente o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La composición puede comprender adicionalmente uno o más componentes biológicamente activos.

Un método para tratar una enfermedad o afección que resulta directa o indirectamente de la actividad de TGF $\beta$  en un ser humano puede comprender administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La enfermedad o afección se puede seleccionar del grupo que consiste en una enfermedad fibrótica, cáncer, o una enfermedad mediada por el sistema inmunitario. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en enfermedad fibrótica, cáncer, o una enfermedad mediada por el sistema inmunitario. El tratamiento de la enfermedad o trastorno puede comprender neutralizar TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y/o TGF $\beta$ 3. El tratamiento de la enfermedad o trastorno puede comprender inhibir la señalización de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y/o TGF $\beta$ 3. El tratamiento de la enfermedad o trastorno puede comprender inhibir la producción de fibronectina mediada por TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y/o TGF $\beta$ 3, la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), 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 o trastorno puede comprender aumentar la actividad de las células asesinas naturales.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 La FIG. 1 representa la estructura co-cristalina de GC1008(Fab) y TGF $\beta$ 2 humano (SEQ ID NO: 6).  
La FIG. 2 representa la estructura co-cristalina de GC1009(scFv) y TGF $\beta$ 1 humano (SEQ ID NO: 5).  
La FIG. 3 representa una porción de la estructura co-cristalina del dominio VH de GC1009(scFv) (SEQ ID NO: 1) y TGF $\beta$ 1 humano (SEQ ID NO: 5).  
La FIG. 4 representa una porción de la estructura co-cristalina del dominio VH de GC1008(Fab) (SEQ ID NO: 1) y TGF $\beta$ 3 humano (SEQ ID NO: 7).  
La FIG. 5 representa una porción de la estructura co-cristalina de GC1008(Fab) y TGF $\beta$  humano. El análisis de mapa térmico de la TABLA 7 se visualiza con respecto a los restos Y27, S30, S31, N32, I52, P53, I54, V55, D56, N59, E74, G101, V103 y L104 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 1), y el resto A93 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 2).

#### 25 Descripción detallada

Los presentes anticuerpos de unión a TGF $\beta$  o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son variantes que comprenden un dominio VH modificado del anticuerpo GC1008, en los que las variantes comprenden una sustitución de aminoácidos del dominio VH y/o VL (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente). Por ejemplo, los anticuerpos para TGF $\beta$  o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender un dominio VH con una sustitución de aminoácidos que confiere una unión comparable o mejor a TGF $\beta$  humano (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3) que la observada con el anticuerpo GC1008. Los anticuerpos selectivos de la isoforma de TGF $\beta$ , o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden unir selectivamente a TGF $\beta$ 1 humano, en comparación con TGF $\beta$ 2 humano y TGF $\beta$ 3 humano, o se pueden unir selectivamente a TGF $\beta$ 3 humano, en comparación con TGF $\beta$ 1 humano y TGF $\beta$ 2 humano. Se puede lograr una unión selectiva mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden un dominio VH (SEQ ID NO: 1).

“Unión selectiva” significa que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (i) se puede unir a una isoforma específica de TGF $\beta$  humano con una afinidad mayor que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio VH no modificado del anticuerpo GC1008, y/o (ii) se puede unir a las otras isoformas de TGF $\beta$  con una menor afinidad que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio VH no modificado del anticuerpo GC1008. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une selectivamente a la isoforma TGF $\beta$ 1 se puede unir a TGF $\beta$ 1 con una afinidad mayor que GC1008(Fab) o GC1009(scFv), por ejemplo dos veces, tres veces, cinco veces, diez veces mayor, o más. Como alternativa, o además, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 con una menor afinidad que GC1008(Fab) o GC1009(scFv), por ejemplo dos veces, tres veces, cinco veces, diez veces menor, o más.

Como se utiliza en la presente memoria, un primer elemento “y/o” un segundo elemento significa una descripción específica del primer o segundo elementos por separado, o el primer y segundo elementos combinados. Las formas singulares “un”, “uno”, “una” y “el” y “la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

#### 50 Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden un dominio VH modificado del anticuerpo GC1008 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos completos, por ejemplo IgG, tales como IgG1, IgG2, o IgG4, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, por ejemplo polipéptidos F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fab, o dAb. Los fragmentos de unión a antígeno monovalentes pueden incluir Fab, Fv, scFv, y di-scFv, que son dos moléculas scFv

unidas por un conector peptídico. Los fragmentos de unión a antígeno pueden ser multivalentes, por ejemplo dirigidos a TGF $\beta$  y a otro antígeno. Los fragmentos multivalentes incluyen F(ab')<sub>2</sub> y di-scFv, en los que los dos componentes de scFv se componen de diferentes dominios variables dirigidos contra antígenos separados. El presente anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, puede ser un GC1008 modificado (un anticuerpo IgG4 humano completo), GC1008(Fab) (un fragmento Fab de GC1008), o GC1009(scFv) (una versión 5 scFv de GC1008). GC1009(scFv) es un fragmento de unión a antígeno producido de forma recombinante que comprende un dominio VH de PET1073G12 de cadena pesada humana (SEQ ID NO: 1) y un dominio VL de PET1073G12 de cadena ligera humana (SEQ ID NO: 2) unidos por un conector peptídico, que permite que los dos dominios se asocien en un sitio de unión a antígeno. GC1008 y GC1009 se describen con más detalle en la patente 10 U.S. nº 7.723.486 y Grütter (2008). La secuencia de aminoácidos de GC1009(scFv) se expone a continuación, en la que el conector peptídico del motivo (Gly<sub>4</sub>/Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 10) está en negrita y en cursiva, y el péptido señal está destacado en color gris:

**KYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA***QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYT*  
 FSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTS  
 TTYYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVS**SGGGGSG**  
**GGGS GGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA**WYQ  
 QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY  
 YCQQYADSPITFGQGTRLEIKRHHHHHH (SEQ ID NO: 9).

15 Un dominio variable “modificado” o “variante” comprende sustituciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de referencia. Un “dominio VH variante del anticuerpo GC1008”, por ejemplo, puede comprender sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VH de PET1073G12 con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

20 El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender hasta 20 sustituciones de restos paratópicos, preferiblemente hasta 19 sustituciones de restos paratópicos, y más preferiblemente hasta 12 sustituciones de restos paratópicos. Por ejemplo, uno de los dos dominios puede comprender una sustitución de un resto del paratopo, mientras que el otro dominio no está modificado, o ambos dominios pueden comprender sustituciones de restos paratópicos. Una sustitución del paratopo se puede seleccionar de las sustituciones indicadas en la TABLA 5. Las sustituciones del paratopo pueden hacer que el anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno se unan a una isoforma de 25 TGF $\beta$  selectivamente, o las sustituciones pueden preservar la unión pan-específica del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a las isoformas de TGF $\beta$ . También se pueden realizar dos tipos de sustituciones en el paratopo. Por ejemplo, una sustitución en el paratopo puede hacer que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se unan a una isoforma de TGF $\beta$  selectivamente, mientras se realiza otra sustitución en el paratopo que conserva la unión pan-específica para desinmunizar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. La desinmunización se puede 30 realizar de acuerdo con el método de Harding et al. (2010) mAbs 2:256-265, por ejemplo.

El dominio VH y/o el dominio VL pueden comprender como alternativa o adicionalmente hasta 20 sustituciones de restos no paratópicos, preferiblemente hasta 18 sustituciones de restos no paratópicos, y más preferiblemente hasta 12 sustituciones de restos no paratópicos. Los restos no paratópicos pueden ser sustituidos, por diversas razones, por ejemplo para aumentar la termoestabilidad de un fragmento de unión a antígeno, para eliminar un resto de 35 aminoácido que es susceptible de oxidación o desamidación, para añadir un aminoácido que puede ser fácilmente conjugado con un fármaco o moléculas de PEG, por ejemplo, o para eliminar un sitio potencial de carboxilación.

Las modificaciones también pueden incluir delecciones de aminoácidos. Por ejemplo, uno o dos aminoácidos que no están en el paratopo se pueden eliminar de un dominio VH y/o VL variante. Los aminoácidos suprimidos pueden ser de los extremos carboxilo- o amino-terminales de los dominios VL y/o VH.

40 Un dominio variable de los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), cada una de las cuales está flanqueada por una región estructural (FW). Por ejemplo, un dominio VH puede comprender un conjunto de tres CDR de cadena pesada, HCDR1, HCDR2, y HCDR3. Un dominio VL puede comprender un conjunto de tres CDR de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Un conjunto de HCDR descrito en la presente memoria puede ser proporcionado en un dominio 45 VH que se utiliza combinado con un dominio VL. Un dominio VH puede proporcionarse con un conjunto de HCDR como se describe en la presente memoria, y si semejante dominio VH está emparejado con un dominio VL, en ese caso el dominio VL puede estar provisto de un conjunto de LCDR descrito en la presente memoria. Las estructuras y ubicaciones de las regiones CDR y FW del dominio variable de la inmunoglobulina se determinan en la presente memoria mediante la referencia a Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>a</sup> ed., U.S. 50 Department of Health and Human Services.

Los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos contienen restos de aminoácidos “paratópicos” y “no paratópicos”. Un aminoácido del “paratopo” de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

5 mismo de la presente memoria tiene un núcleo atómico dentro de los 4 Å de un núcleo atómico de la isoforma de TGF $\beta$  humano. Debido a que cada isoforma de TGF $\beta$  humano forma un complejo estructuralmente diferente con los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los restos paratópicos pueden ser diferentes para cada isoforma. Un "resto del paratopo de TGF $\beta$ 1", por ejemplo, tiene un núcleo atómico dentro de los 4 Å de un núcleo atómico de TGF $\beta$ 1 humano. La TABLA 3 muestra los restos paratópicos de los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para cada una de las isoformas TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3 humanas. Un resto del "paratopo de TGF $\beta$ " tiene un núcleo atómico dentro de los 4 Å de un núcleo atómico de las tres isoformas de TGF $\beta$  humano.

10 Un resto se denomina resto del paratopo independientemente de la ubicación dentro de una región CDR o FW, como se define por medio de la nomenclatura de Kabat. Muchos restos de paratopos se encuentran dentro de las regiones CDR, como se muestra en la TABLA 4, por ejemplo. Sin embargo, algunos restos de paratopos se encuentran dentro de las regiones FW. Un aminoácido "no paratópico" es cualquier aminoácido del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que no es un aminoácido del "paratopo", independientemente de si el resto se encuentra en una región CDR o FW.

15 15 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender sustituciones de aminoácidos en la cadena pesada y la cadena ligera seleccionadas de diferentes líneas germinales humanas. Por ejemplo, se puede introducir un conjunto de HCDR en un repertorio de dominios variables que carecen de CDR usando la tecnología de ADN recombinante. Los marcos de la línea germinal incluyen secuencias de la cadena pesada de la línea germinal DP-10 ( $V_H$  1-69) humana o DP-88 ( $V_H$  1-e) humana de la familia de  $V_H$ -1. Las secuencias de la cadena ligera pueden ser de la familia  $V_{\kappa}3$  humana, por ejemplo DPK-22 (A27) humana. Las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la línea germinal humana son descritas por VBASE2 en Internet en vbase2.org/vbstat.php, por ejemplo. Por ejemplo, un conjunto de HCDR y un conjunto de LCDR se pueden emparejar juntos para los anticuerpos PET1073G12, PET1074B9, o PET1287A10. El anticuerpo por lo tanto puede ser una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende un dominio VH PET1073G12 modificado y/o un dominio VL PET1073G12, por ejemplo. Las secuencias de aminoácidos de los dominios de PET1073G12, PET1074B9, o PET1287A10, incluyendo los conjuntos de HCDR y LCDR, se describen en la Patente U.S. nº 7.723.486.

20 30 Los fragmentos de unión a antígeno pueden comprender adicionalmente regiones constantes del anticuerpo o porciones de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo C-terminal a dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpo, incluyendo las cadenas  $C_{\kappa}$  o  $C_{\lambda}$  humanas. Del mismo modo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio VH puede comprender adicionalmente unido en su extremo C-terminal la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio CH1) derivado de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM, o cualquiera de las sub-clases de isotipo, concretamente IgG1, IgG2, o IgG4. Se prefiere IgG4 para algunas aplicaciones, ya que no se une al complemento y no crea funciones efectoras. Cuando se desea una función efectora, se prefiere IgG1. 35 En todos los casos, las regiones constantes del anticuerpo o las porciones de las mismas pueden ser secuencias humanas.

40 45 Se pueden realizar modificaciones en las regiones constantes de los anticuerpos para mejorar diversas propiedades de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, se pueden utilizar 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. Del mismo modo, Zhang et al. (2010) Anal. Chem. 82: 1090-99 describen la modificación genética de la región de bisagra de IgG2 para limitar la aleatorización de enlaces disulfuro y la formación de isómeros estructurales en las aplicaciones terapéuticas. Las modificaciones de aminoácidos a un dominio CH3 también se pueden utilizar para eliminar restos Lys carboxi terminales para disminuir el número de variantes de carga. Las modificaciones de aminoácidos también se pueden utilizar para mejorar la función farmacológica de los anticuerpos recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cuando los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno comprenden una región Fc, por ejemplo, se pueden utilizar modificaciones de aminoácidos para aumentar la activación del complemento, mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) 50 aumentando la unión a Fc $\gamma$ RIIA o disminuyendo la unión a Fc $\gamma$ RIIB, y/o aumentar la vida media en suero mediante el aumento de la unión a FcRn. Tales modificaciones de aminoácidos se revisan en Beck et al. (2010) Nature 10: 345-52, por ejemplo.

55 La siguiente TABLA 1 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio VH no modificado de PET1073G12 (SEQ ID NO: 1); el dominio CH1 (SEQ ID NO: 3); el dominio VL de PET1073G12 (SEQ ID NO: 2); y el dominio  $C_{\kappa}$  (SEQ ID NO: 4), que están presentes en GC1008(Fab). Las diversas regiones CDR y marco (FW) están marcadas; también se destacan los restos de CDR.

TABLA 1

Dominio VH:				
HFW1	HCDR1	HFW2	HCDR2	
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDI				
HCDR2	HFW3	HCDR3	HFW4	
ANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWQGT				
LTVVSS (SEQ ID NO: 1)				
Dominio CH1:				
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQS				
SGLYSLSSVVTPSSSLGTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP				
(SEQ ID NO: 3)				
Dominio VL:				
LFW1	LCDR1	LFW2	LCDR2	
ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAP				
LFW3	LCDR3	LFW4	LCDR2	
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK				
(SEQ ID NO: 2)				
Dominio Ck:				
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ				
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC				
(SEQ ID NO: 4)				

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden ser mono-específicos para TGF $\beta$  humano, o pueden ser bi-específicos. Los anticuerpos bi-específicos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden fabricar en una variedad de maneras, como describen, por ejemplo, Holliger et al. (1993) Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología de IgG de dominio variable dual (DvD-IgG) o de la tecnología BiTE™, en la que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden utilizar y conectar directamente a través de péptidos cortos flexibles.

Dominios VH y/o VL modificados recombinantemente

- El dominio variable de cadena pesada y/o cadena ligera de los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos puede ser modificado de manera recombinante para alterar la secuencia de aminoácidos de una secuencia de la línea germinal. Por ejemplo, una o más de las CDR del conjunto de CDR de la cadena pesada pueden ser modificadas, una o más de las CDR del conjunto de CDR de la cadena ligera pueden ser modificadas, y/o una de las regiones marco de los dominios VH y/o VL puede ser modificada. Las sustituciones se pueden realizar para aminoácidos del paratopo, por ejemplo, que refuerzan o debilitan la afinidad de unión a una isoforma de TGF $\beta$ , o pueden dejar la afinidad de unión relativamente inalterada. Se pueden realizar otras sustituciones para los restos de aminoácido que no están en el paratopo para conferir diversas características a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, mejorando la estabilidad o introduciendo un grupo reactivo de la superficie del dominio que se puede modificar covalentemente. Por consiguiente, las siguientes cuatro categorías de sustituciones de aminoácidos para el dominio VH y/o VL de los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se encuentran entre las contempladas en la presente memoria: (1) sustituciones que confieren la unión selectiva a una isoforma de TGF $\beta$  humano; (2) sustituciones que mantienen la unión pan-específica a las tres isoformas de TGF $\beta$  humano; (3) sustituciones de los aminoácidos que no están en el paratopo; y (4) múltiples sustituciones de aminoácidos. Estas categorías de sustituciones de aminoácidos no son mutuamente excluyentes.

1. Sustituciones que confieren unión selectiva.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos selectivos de isoformas de TGF $\beta$  pueden comprender una sustitución de aminoácidos dentro del dominio VH (SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden unir selectivamente a TGF $\beta$ 1 humano, en comparación

5 con TGF $\beta$ 2 humano y TGF $\beta$ 3 humano, o se pueden unir selectivamente a TGF $\beta$ 3 humano, en comparación con TGF $\beta$ 1 humano y TGF $\beta$ 2 humano. La unión selectiva se puede lograr sustituyendo uno o más aminoácidos del paratopo.

La predicción de cómo afectará una sustitución de aminoácido a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para interaccionar con una isoforma de TGF $\beta$  se ve facilitada por una estructura co-cristalina con cada una de las isoformas de TGF $\beta$ . La estructura co-cristalina de GC1008(Fab) y TGF $\beta$ 3 es descrita por Grütter (2008). La estructura co-cristalina de GC1008(Fab) y TGF $\beta$ 1 se representa en la FIG. 1. La estructura co-cristalina de GC1009(scFv) y TGF $\beta$ 1 se representa en la FIG. 2.

10 La TABLA 2 representa la secuencia de aminoácidos de las isoformas TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3 humanas. La comparación de las estructuras co-cristalinas revela diferencias en los paratopos entre las tres isoformas. Los restos 15 de TGF $\beta$  en cada isoforma que interaccionan con GC1008 están en negrita en la TABLA 2.

TABLA 2

	1	10	20	30	40	50	60
TGF $\beta$ 1	ALDTNYCFSSTEKNCCVRLQYIDFRKDL <b>GWKW</b> IHEPKGYHANFCLGCP <b>PYI</b> WSDLTOYS <b>K</b>						
TGF $\beta$ 2	ALDAAYCFRNQDNCCRLP <b>YIDFKRDLGWKW</b> IHEPKGYNANFCAGACPY <b>LWSSDTQHSR</b>						
TGF $\beta$ 3	ALDTNYCFSSTEKNCCVRLQYIDFRQD <b>LGWKWV</b> HEPKGYYANFCAGACPY <b>LRSADTT</b> HST						
	61	70	80	90	100	112	
TGF $\beta$ 1	VLALYNQ <b>HNP</b> GASAAPCCVPQALEPLPIVYY <b>GRKPKV</b> EQLSNMIVRSCKCS	(SEQ ID NO: 5)					
TGF $\beta$ 2	VLSLYNT <b>I</b> NPEASASPCCVSQDLEPLTILYY <b>IGKTP</b> KIEQLSNMIVKSCKCS	(SEQ ID NO: 6)					
TGF $\beta$ 3	VLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYY <b>VGRTP</b> KVEQLSNMVVKSCCKCS	(SEQ ID NO: 7)					

20 La siguiente TABLA 3 enumera restos paratópicos del dominio VH (SEQ ID NO: 1) y el dominio VL (SEQ ID NO: 2), según se determina por medio de las estructuras co-cristalinas con cada isoforma de TGF $\beta$  humano. Los restos paratópicos de GC1008 en negrita son compartidos entre las tres isoformas de TGF $\beta$ . Tres regiones del epítopo de TGF $\beta$  se designan como "punta", " parche hidrófobo", y "hélice tres". Los restos del dominio VH y VL que tienen núcleos atómicos dentro de los 4 Å de un núcleo atómico en el "parche hidrófobo" de TGF $\beta$ , que tiene la secuencia L<sub>28</sub>GWK<sub>32</sub> (SEQ ID NO: 8), se conservan para las tres isoformas. Los restos de GC1008 que interaccionan con las regiones de la "punta" y la "hélice tres", sin embargo, muestran una mayor variabilidad. Mediante la comparación de las tres estructuras co-cristalinas, es evidente que GC1008 cambia la orientación y ajusta las posiciones de bucle de CDR y las conformaciones de la cadena lateral para dar cabida a las tres isoformas de TGF $\beta$  con una afinidad similar. Véanse la FIG. 1 y la FIG. 2. Por ejemplo, Grütter (2008) describió que GC1008 mostraba afinidades similares para las tres isoformas: valores de Cl<sub>50</sub> de 1 ± 2 nM, 14 ± 5 nM, y 7 ± 2 nM contra TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3, respectivamente en un ensayo de proliferación de células epiteliales de pulmón de visón (MLEC). Sin embargo, los restos 67 y 68 de las tres isoformas de TGF $\beta$  difieren en sus interacciones con el resto Y27 del paratopo de VH. El resto de VH Y27 presenta interacciones de enlaces de hidrógeno con los restos de TGF $\beta$ 1 Q67 y H68. Por el contrario, el resto de VH Y27 presenta interacciones hidrófobas con T67 e Y50 de TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. Esto provoca un reordenamiento del bucle de HCDR1 en el complejo de TGF $\beta$ 1, en comparación con los complejos de TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3.

35

TABLA 3

Comparación de paratopos de GC1008 para TGF $\beta$ 1/2/3	Paratopo de TGF $\beta$ 1	Paratopo de TGF $\beta$ 2	Paratopo de TGF $\beta$ 3
"Punta" de TGF $\beta$	VH: N59, V103, <b>L104</b> ; VL: G30, Y33, <b>A93</b>	VH: N59, V103, <b>L104</b> ; VL: Q27, S28, <b>A93</b> , D94, S95	VH: <b>L104</b> ; VL: Y33, Y92, <b>A93</b>
"Parche hidrófobo" de TGF $\beta$	VH: <b>S31, N32, I52, 154, V55, I57</b> , N59, <b>L100, G101, L102</b>	VH: <b>S31, N32, I52, 154, V55, I57</b> , N59, <b>L100, G101, L102</b>	VH: <b>S31, N32, I52, 154, V55, I57, L100, G101, L102</b>
"Hélice tres" de TGF $\beta$	VH: Y27, <b>S30, E74</b>	VH: Y27, <b>S30, D56, E74</b>	VH: <b>S30, E74</b>

La información de la TABLA 3 se vuelve a formatear en la TABLA 4 para indicar los restos de los dominios VH y VL que están dentro de los 4 Å de un núcleo atómico de TGF $\beta$ 3 en el co-cristal. Los restos paratópicos están en negrita. La mayoría, pero no todos, los restos paratópicos se encuentran dentro de las HCDR.

TABLA 4

Secuencia de VH (SEQ ID NO: 1)					
HFW1		HCDR1	HFW2		HCDR2
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTF	<b>SSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDI</b>				
10	20	30	40	50	
HCDR2		HFW3		HCDR3	HFW4
ANYAQRFKGRVTITADE	<b>STSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT</b>				
60	70	80	90	100	110
LTVVSS					
120					
Secuencia de VL (SEQ ID NO: 2)					
LFW1		LCDR1	LFW2		LCDR2
ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSY	<b>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAP</b>				
10	20	30	40	50	
LFW3		LCDR3	LFW4		
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ	<b>YADSPITFGQGTRLEIK</b>				
60	70	80	90	100	108

Una comparación de las estructuras co-cristalinas puede guiar las sustituciones de los restos de los dominios VH y/o

5 VL para alterar la afinidad de GC1008 para las isoformas de TGFβ. En particular, las sustituciones de aminoácidos pueden estar basadas en la localización de cada resto de VH y/o VL en las tres estructuras cristalinas, teniendo en cuenta si el resto interacciona con el antígeno o está implicado en interacciones con otras CDR o elementos estructurales que estabilizan los bucles de CDR. Por ejemplo, I97 en LCDR3 no interactúa directamente con TGFβ en cualquiera de las tres estructuras; sin embargo, I97 se enfrenta al interior del anticuerpo y en un bolsillo hidrófobo que también se compone de V103 y L104 de la HCDR3. Puesto que V103 y L104 son paratopos importantes para la unión a TGFβ, la sustitución de I97 por restos débilmente polares o hidrófobos medianos o pequeños podría ser tolerada sin cambiar significativamente la afinidad hacia TGFβ, por ejemplo, más de diez veces.

La región hélice 3 muestra la mayor variabilidad en la secuencia del epítopo. La lisina y la arginina en la posición 60

15 de TGFβ1 y TGFβ1 causan una rotación de GC1008 unido a TGFβ1 y TGFβ2 en comparación con TGFβ3. En los restos 67 y 68, TGFβ1 tiene glutamina e histidina, respectivamente, en lugar de treonina e isoleucina/leucina como en TGFβ2 y TGFβ3 (Figura 3). Cuando S30 se muta a restos hidrófobos tales como A, W, se favorecen interacciones hidrófobas adicionales con L64 de TGFβ conservado, y por lo tanto aumenta la afinidad por los tres TGFβ. Este aumento de afinidad es más pronunciado para TGFβ 2 y 3, debido a la treonina e isoleucina/leucina mencionadas anteriormente como en TGFβ2 y TGFβ3 en los restos 67 y 68, lo que favorece restos hidrófobos por encima de Q y H de TGFβ1. En TGFβ1 y TGFβ2, las cadenas laterales cargadas positivamente en la posición 60 presentan interacciones iónicas con E74 en la cadena pesada. La sustitución de E74 con restos cargados positivamente es menos favorecida para la unión de GC1008 a TGFβ1, pero más favorecida para TGFβ3, que tiene una treonina en la posición 60 (Figura 4). Debido al pequeño tamaño de la cadena lateral de T60 de TGFβ3, se pueden tolerar la mayoría de las mutaciones en E74 en la cadena pesada. Debido a la naturaleza parcialmente hidrófoba de T60, las sustituciones hidrófobas en E74 también pueden aumentar drásticamente la afinidad de unión a TGFβ3, conduciendo a menudo a una mejora de más del doble en las razones  $k_d^{\text{var}}:k_d^{\text{wt}}$ .

Para seleccionar rápidamente en busca de anticuerpos contra TGFβ o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con mayores afinidades para una isoforma de TGFβ concreta o con una selectividad para una isoforma sobre las otras, las posiciones enumeradas en la TABLA 3 pueden ser asignadas al azar a los otros 19 aminoácidos.

30 Esto se puede lograr por medio de presentación in vitro de GC1009(scFv), fragmento Fab de GC1008, o bibliotecas de GC1008 usando mecanismos bien conocidos en la técnica (Bradbury et al. (2011) *Nature Biotechnol.* 29(3): 245-254). Sin las estructuras cristalinas de TGFβ1 y TGFβ2 formando complejo con Fab de GC1009 y de GC1008, respectivamente, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con mayores afinidades solo para

TGF $\beta$ 3 pueden ser identificados usando esta tecnología de presentación in vitro basada en los aminoácidos que contactan con TGF $\beta$ 3 derivados de la estructura compleja de TGF $\beta$ 3 descrita por Grütter (2008). Con el nuevo TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 formando complejo con las estructuras de Fab de GC1009 y GC1008 que los autores de la presente invención han determinado, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con afinidades más altas para TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 también se pueden identificar rápidamente por medio de la tecnología de presentación. Por otra parte, contar con información sobre las tres estructuras permite elaborar bibliotecas más orientadas para identificar variantes selectivas de las isoformas. Las bibliotecas orientadas a TGF $\beta$ 1 por ejemplo, solo requerirían la aleatorización de las posiciones 27 y 30 del dominio VH (SEQ ID NO: 1). Los  $32^2$  (1024) posibles mutantes serían abarcados por las bibliotecas de fagos con un tamaño de la biblioteca de solo  $\sim 10^5$  especies. (Los 20 aminoácidos pueden estar representados por 32 codones con una secuencia de NNG/C, con cualquiera de los cuatro ácidos nucleicos en las dos primeras posiciones y G o C en la tercera posición). Sin las estructuras cristalinas de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 1 formando complejo con GC1009/GC1008, habría que aleatorizar los 14 aminoácidos que contactan con TGF $\beta$ 3 derivados de la estructura compleja de TGF $\beta$ 3 descrita por Grütter (2008). Una biblioteca de fagos con una diversidad de  $32^{14}$  ( $10^{21}$ ) no estaría representada plenamente ni siquiera en la mejor de cualquiera de las bibliotecas conocidas, que no presentan más de aproximadamente  $\sim 10^{11}$  especies. Por lo tanto, los datos de estructura proporcionados en la presente memoria permitirían el rápido escrutinio e identificación de antagonistas selectivos de TGF $\beta$ .

## 2. Sustituciones que mantienen la unión pan-específica.

Las sustituciones se pueden realizar de manera que no alteren significativamente la afinidad de unión hacia una isoforma de TGF $\beta$ . Una sustitución que no “altera significativamente” la afinidad de unión hacia una isoforma TGF $\beta$  no aumenta la razón de la tasa de disociación de la variante ( $k_d^{var}$ ) en comparación con la tasa de disociación del tipo salvaje ( $k_d^{wt}$ ) en más de 2,4 (es decir,  $k_d^{var}/k_d^{wt}$  es menor o igual a 2,4). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que presentan “unión pan-específica” para este propósito pueden tener una constante de unión aparente para TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3) de al menos 10 nM, 30 nM, o 100 nM. La afinidad para las isoformas de TGF $\beta$  se puede medir usando cualquier mecanismo apropiado en la técnica, por ejemplo, el ensayo de proliferación de MLEC descrito por Grütter (2008) o un ensayo de unión Biacore® 3000 (GE Healthcare). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que presentan una “unión pan-específica” para este propósito pueden tener una afinidad de unión aparente ( $k_d^{var}:k_d^{wt}$ ) para TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3) menor o igual a 2,4 veces, menor o igual a 3 veces, menor o igual a 5 veces, o menor o igual a 10 veces en comparación con el tipo salvaje, preferiblemente menor o igual a 2,4 veces en comparación con el tipo salvaje ( $k_d^{var}:k_d^{wt}$ ). Estas sustituciones pueden ser guiadas por las tres estructuras co-cristalinas entre GC1008/GC1009 y las tres isoformas de TGF $\beta$ . Véase Oberlin et al. (2012) J. Chem. Inf. Model. 52: 2204-2214.

Se espera que las sustituciones que mantienen una unión pan-específica con TGF $\beta$  no creen ningún impedimento estérico con los restos de aminoácidos de TGF $\beta$  ni tengan un efecto perjudicial significativo sobre la estabilidad de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Las sustituciones que tienen un efecto perjudicial significativo en la estabilidad pueden promover la agregación y la inactivación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, causando un despliegamiento o un mal plegamiento local. Los anticuerpos, agregados desestabilizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden inducir inmunogenicidad, porque el sistema inmunitario del paciente puede reconocer tales agregados como moléculas foráneas.

Un ejemplo de una sustitución que mantiene la unión pan-específica es R24 en LCDR1. R24 se orienta lejos del sitio de unión a TGF $\beta$  y está expuesto sobre la superficie de dominio VL. Esta posición puede albergar una sustitución con la mayoría de los restos polares excepto Pro y Cys, que generalmente se evitan. Por otro lado, I52 en HCDR2 presenta una interacción hidrófoba estrecha con el “ parche hidrófobo” de TGF $\beta$  (L<sub>28</sub>GWKW<sub>32</sub> (SEQ ID NO: 8)), de modo que las sustituciones I52 se limitan a restos hidrófobos de tamaño mediano, con la posibilidad de una sustitución por Val, mientras que una sustitución por restos hidrófobos más grandes podría crear un impedimento estérico en el complejo unido.

La TABLA 5 proporciona ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos del dominio VL del SEC ID NO: 2 (TABLA 5A) y el dominio VH del SEC ID NO: 1 (TABLA 5B). En algunos casos se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en los restos del marco dentro del paratopo, por ejemplo, el resto Y50 de VL en la región FW2. Se espera que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno con una o más de las sustituciones siguientes tengan una pan-especificidad similar y una afinidad mejor hacia TGF $\beta$  que GC1008/GC1009, es decir, para unirse a todas las isoformas de TGF $\beta$  con isoformas con una afinidad de unión ( $k_d^{var}:k_d^{wt}$ ) menor o igual a 2,4 veces, menor o igual a 3 veces, menor o igual a 5 veces, o menor o igual a 10 veces en comparación con el tipo salvaje.

TABLA 5A

LCDR1		LFW2/LCDR2		LCDR3	
R24	K, N, Q, H, S, T, Y, A, D, E, G, I, L, M, F, P, W, V	Y50	A, F, W, V, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T	Q90	N, A, R, D, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V

# ES 2 845 215 T3

LCDR1		LFW2/LCDR2		LCDR3	
A25	G, V, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y	G51	A, R, N, D, Q, E, K, S, T, H, I, L, M, F, P, W, Y, V	Q91	A, R, N, D, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V
S26	A, R, N, Q, G, K, M, T, D, E, H, I, L, F, P, W, Y, V	A52	G, S, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V	Y92	S, F, N, A, R, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, P, T, W, V
Q27	N, A, D, E, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V	S53	A, R, D, N, Q, E, G, K, T, H, I, L, M, F, P, W, Y, V	A93	G, S, N, D, F, T, Y, V
S28	A, N, G, T, D, Q, E, H, I, L, M, F, P, W, Y, V	S54	A, N, D, Q, E, G, H, K, Y, R, I, L, M, F, P, T, W, V	D94	A, N, Q, E, S, T, H, G, I, L, M, F, P, W, Y, V
L29	A, V, R, N, D, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y	R55	A, N, K, Q, G, S, T, D, E, H, I, L, M, F, P, W, Y, V	S95	A, H, N, D, Q, E, G, I, L, M, F, P, T, W, Y, V
G30	A, N, D, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V	A56	G, S, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V	P96	A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V
S31	A, N, Q, G, T, R, D, E, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V			I97	L, V, A, G, S, T
S32	A, N, Q, G, T, R, D, E, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V			T98	A, N, G, S, R, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V
Y33	D, N, E, Q, A, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, V				
L34	V, A, I, R, N, D, Q, E, G, H, K, M, F, P, S, T, W, Y				

TABLA 5B

HFW1/HCDR1		HCDR2/HFW3		HCDR3	
G26	A, S, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V	G50	A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V	T99	S, A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V
Y27	A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, V	V51	A, G, I, S, T, R, N, D, Q, E, H, L, K, M, F, P, W, Y	L100	A, I, V, M, F, W, Y, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S, T
T28	A, S, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V	I52	V	G101	A, N, D, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V
F29	A, S, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, P, T, W, Y, V	P53	A, G, V	L102	A, N, Q, M, V, R, D, E, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y
S30	A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, M, F, P, T, W, Y, V, C	I54	L, A, F, H, M, P, T, V, W	V103	A, I, L
S31	N, Q, T, A, R, D, E, G, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V	V55	F, G, H	L104	A, I, V
N32	D, Q, A, R, E, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V	D56	A, N, Q, E, S, T, R, G, H, I, L, K, M, F, V, C	D105	A, R, N, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V
V33	A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y	I57	V, L, A, M	A106	S, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V
I34	V, A, R, N, D, Q, E, G, H, L, K, M, F, P, S, T, W, Y	A58	G, S, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V	M107	L, I, A, R, N, D, Q, E, G, H, K, F, P, S, T, W, Y, V
S35	T, A, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, W, Y, V	N59	D, Q, E, Y, A, K, R, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, V	D108	N, Q, E, G, H, S, T, Y, A, R, I, L, K, M, F, P, W, Y

HFW1/HCDR1		HCDR2/HFW3		HCDR3	
	Y60	A, N, Q, H, S, W, R, D, E, G, I, L, K, M, F, P, T, V		Y109	N, V, I, M, F, A, R, D, Q, E, G, H, L, K, P, S, T, W
	A61	G, S, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V			
	Q62	A, N, G, H, S, T, Y, R, D, E, I, L, K, M, F, P, W, V			
	R63	K, A, N, D, Q, E, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V			
	F64	A, V, R, N, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y			
	E74	D, A, R, N, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, C			

3. Sustituciones de restos de aminoácidos que no están en el paratopo.

Los aminoácidos que no están en el paratopo pueden ser sustituidos de forma recombinante para elaborar un dominio ligero o pesado variable con propiedades similares o alteradas en comparación con el dominio variable de la línea germinal. Los dominios variables "modificados" también incluyen delecciones de aminoácidos, así como sustituciones. Por ejemplo, el resto de aminoácido N-terminal o C-terminal se puede eliminar en un dominio variable modificado.

Se pueden elaborar sustituciones de aminoácidos que no están en el paratopo, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y/o disminuir la tendencia a agregarse. La escasa estabilidad puede afectar a la capacidad de un fragmento de unión al antígeno, por ejemplo, para plegarse correctamente cuando se expresa de forma recombinante, lo que da como resultado que una fracción de los fragmentos expresados no sean funcionales. Los anticuerpos de baja estabilidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden ser propensos a formar agregados potencialmente inmunogénicos o pueden presentar una avidez o una vida útil deterioradas. Los polipéptidos scFv en particular pueden mostrar problemas con la estabilidad, solubilidad, expresión, agregación, productos de degradación, y capacidad de fabricación global en sistemas de expresión tanto bacterianos como de mamíferos. Las sustituciones de aminoácidos en el marco que se espera que aumenten la estabilidad y/o disminuyan la tendencia a agregarse de un dominio VH y/o VL, por ejemplo, en un polipéptido scFv, se describen en el documento WO 2007/109254, por ejemplo. De manera similar se espera que las sustituciones en los correspondientes restos en los presentes dominios VH y VL aumenten la estabilidad y/o disminuyan la tendencia a agregarse.

Se espera que las sustituciones que pueden ser toleradas incluyan aquellas que reemplazarían un aminoácido que no está en el paratopo del SEQ ID NO: 1 o 2 por un aminoácido correspondiente que existe en otra secuencia de la línea germinal de un dominio VH o VL humano. En la actualidad, se conocen en la técnica aproximadamente 40 secuencias de la línea germinal pesadas variables, como se conocen aproximadamente 40 secuencias de la línea germinal kappa variables y aproximadamente 30 secuencias de la línea germinal lambda variables. Se espera que una sustitución de un aminoácido que no está en el paratopo por un aminoácido que existe cualquiera de estas secuencias de la línea germinal sea tolerada. Por ejemplo, un resto de un dominio VH del SEC ID NO: 1 podría ser sustituido por un aminoácido que aparece en una posición correspondiente en cualquier secuencia de la línea germinal VH, por ejemplo, la secuencia de la línea germinal de DP-10 (V<sub>H</sub> 1-69) o DP-88 (V<sub>H</sub> 1-e). Las posiciones correspondientes en este caso son determinadas por un alineamiento de secuencias entre las diferentes secuencias de la línea germinal, utilizando mecanismos de alineamiento bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ClustalW.

Las sustituciones adicionales que se espera que sean toleradas son las realizadas en un aminoácido con la mayor parte de su cadena lateral expuesta al disolvente, tal como se determina por medio de análisis de las tres estructuras co-crystalinas. El área de superficie accesible al disolvente de un resto se puede estimar usando mecanismos bien conocidos en la técnica. Además, se espera que las sustituciones de aminoácidos sepultados dentro de los dominios variables sean mejor toleradas si la cadena lateral del aminoácido no crea un impedimento estérico con los restos adyacentes. Por esta razón, los aminoácidos sepultados generalmente son sustituidos por aminoácidos con cadenas laterales de tamaño similar o más pequeño. Por ejemplo, se espera que una sustitución de un resto de Ile sepultado por Leu, Val, Ala, o Gly sea tolerada. El posible impedimento estérico creado por una sustitución se puede predecir mediante el análisis de las tres estructuras co-crystalinas. Otras sustituciones que se espera que sean toleradas son las que mantienen las interacciones electrostáticas existentes dentro de los dominios variables, por ejemplo, interacciones dipolo-dipolo, interacciones dipolo inducido, enlaces de hidrógeno o enlaces iónicos.

Las sustituciones de aminoácidos adicionales de los 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 supuestos sitios de N-glicosilación en los dominios VH y/o VL se pueden eliminar para prevenir o reducir la formación de N-glicoformas. El resto amino-terminal puede estar sustituido por un resto de Gln para causar la

5 piroglutamilación, lo que puede disminuir el número de variantes de carga. Las sustituciones de aminoácidos se pueden utilizar para disminuir el punto isoelectrónico, lo que puede disminuir la tasa de eliminación de los anticuerpos polipeptídicos IgG, por ejemplo.

Los restos superficiales de los dominios variables pueden estar sustituidos por restos de Cys o Lys, por ejemplo, que 10 pueden ser modificados a continuación de forma covalente y acoplados a moléculas que confieren características útiles a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, una marca detectable, toxina, radical de direccionamiento, o proteína. Por ejemplo, el resto de Cys se puede acoplar a un fármaco citotóxico para formar un producto conjugado con fármaco. Los restos de Cys también pueden ser acoplados a moléculas que aumentan la vida media en suero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o albúmina de suero. Tales modificaciones de aminoácidos son revisadas por Beck et al. (2010) *Nature* 10: 345-52, por ejemplo.

15 Las marcas detectables incluyen radiomarcas tales como <sup>131</sup>I o <sup>99</sup>Tc, que se pueden unir a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos utilizando métodos conocidos en la técnica. Las marcas también incluyen marcas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante. Las marcas incluyen adicionalmente radicales químicos tales como biotina que pueden ser detectados por medio de la unión a un radical detectable cognado específico, por ejemplo, avidina marcada. Se pueden unir otros radicales que faciliten la purificación. Por ejemplo, los anticuerpos o 20 fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden estar etiquetados con His utilizando métodos bien conocidos de modificación y expresión recombinantes.

#### 4. Sustituciones múltiples de aminoácidos en los dominios variables

Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos en los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de 25 los mismos. Como regla general, se espera que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos mantengan la estabilidad y la funcionalidad después de al menos varias sustituciones de aminoácidos seleccionadas al azar. Véase, por ejemplo, Wells, *Biochemistry* 29: 8509-17 (1990). Sin embargo, cuantas más sustituciones se introducen al azar en un dominio variable, por ejemplo, la estabilidad global del dominio puede disminuir, su tendencia a agregarse puede aumentar, su afinidad hacia TGFβ puede disminuir, y su posible inmunogenicidad puede aumentar. Por lo tanto, cuando se realizan múltiples sustituciones de aminoácidos, las sustituciones preferidas se seleccionan entre las descritas anteriormente, que se espera que mantengan la estabilidad y 30 funcionalidad. La funcionalidad de los dominios variables modificados se puede someter a ensayo utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados al ensayo de proliferación de MLEC descrito por Grütter (2008).

#### Ácidos nucleicos y métodos para elaborar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

35 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. El ácido nucleico aislado puede ser un ADN sintético, un ARNm de origen no natural, o un ADNc, por ejemplo. El ácido nucleico se puede insertar dentro de un plásmido, un vector, o un casete de transcripción o expresión. Una célula hospedante recombinante puede comprender uno o más de los constructos anteriores. Un ácido nucleico "aislado" (o anticuerpo o fragmento de unión a 40 antígeno del mismo) se retira de su entorno natural, y puede estar adicionalmente en una forma sustancialmente pura, por ejemplo, al menos puro en 90%, u homogénea.

45 Los métodos para preparar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden expresar el ácido nucleico codificante en una célula hospedante en condiciones que producen los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y la recuperación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El procedimiento de recuperación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos puede comprender el aislamiento y/o purificación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El método de producción puede comprender la formulación de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Los vectores adecuados que comprenden un ácido nucleico que codifica los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias intensificadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, fagémidos, adenovirales, AAV, lentivirales, por ejemplo. Los mecanismos y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, son bien conocidos en la técnica.

55 La introducción de tales ácidos nucleicos en una célula hospedante se puede realizar utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Para las células eucariotas, los mecanismos adecuados 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, los mecanismos adecuados pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación, y transfección usando bacteriófagos. La introducción puede estar seguida de, causar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de 5 células hospedantes en condiciones para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma, por ejemplo, cromosoma, de la célula hospedante. La integración puede ser promovida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.
- 10 Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedantes son bien conocidos. Las células hospedantes adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, células de insectos, hongos, levaduras y plantas, y animales transgénicos. Las 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 cría de hámster, células de melanoma de ratón, células de mieloma de rata, células de riñón embrionarias humanas, células de retina embrionarias humanas, y muchas otras. La expresión 15 de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos 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 en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica, tal como fue revisado por Andersen et al. (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13: 117-23, por ejemplo.
- 20 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden estar glicosilados, bien de forma natural o bien mediante la elección de las células hospedantes de expresión, por ejemplo, CHO 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 mediante la inhibición de la fucosilación, con el fin de aumentar la actividad ADCC del anticuerpo resultante.
- Métodos de utilización de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos
- 25 Los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden usar en un método de tratamiento o diagnóstico del organismo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir el tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano, que comprende la administración de una cantidad eficaz al paciente. Las afecciones tratables incluyen cualquiera en la que el TGF $\beta$  juegue un papel, por ejemplo, enfermedad fibrótica, cáncer, una enfermedad mediada por el sistema inmunitario, y cicatrización de 30 heridas.
- Los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles para tratar una enfermedad y afección que resulta directa o indirectamente de la actividad de TGF $\beta$ . Los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden inhibir selectivamente la actividad de una isoforma de TGF $\beta$  humano *in vitro* o *in vivo*. Las actividades de las isoformas de TGF $\beta$  incluyen, pero no se limitan a, la señalización mediada por 35 TGF $\beta$ , el depósito en la matriz extracelular (ECM), la inhibición de la proliferación de células epiteliales y endoteliales, la promoción de la proliferación del músculo liso, la inducción de la expresión de colágeno de Tipo III, la inducción de la expresión de TGF $\beta$ , fibronectina, VEGF, e IL-11, la unión al Péptido Asociado con la Latencia, la inmunosupresión inducida por tumores, la promoción de la angiogénesis, la activación de miofibroblastos, la promoción de la metástasis, y la inhibición de la actividad de las células NK. Por ejemplo, los presentes anticuerpos 40 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles para tratar la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), la fibrosis hepática (FH), el infarto agudo de miocardio (IAM), la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la esclerodermia (ScS), y el Síndrome de Marfan.
- Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles para tratar enfermedades y afecciones, 45 incluyendo, pero no limitadas a, enfermedades fibróticas (tales como la glomerulonefritis, la cicatrización neural, la cicatrización dérmica, la fibrosis pulmonar, fibrosis del pulmón, la fibrosis inducida por la radiación, la fibrosis hepática, la mielofibrosis), quemaduras, enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades inflamatorias (incluyendo artritis reumatoide), rechazo de trasplantes, cáncer, contractura de Dupuytren, y úlceras 50 gástricas. También son útiles para tratar, prevenir y reducir el riesgo de aparición de insuficiencias renales incluyendo pero no limitadas a: nefropatía diabética (tipo I y tipo II), nefropatía inducida por radiación, nefropatía obstructiva, esclerosis sistémica difusa, fibrosis pulmonar, rechazo de aloinjertos, enfermedad renal hereditaria (por ejemplo, enfermedad poliquística del riñón, riñón esponjoso 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, 55 incluyendo, pero no limitados a: inhibidores de la renina, inhibidores de la enzima conversora de angiotensina (ACE), antagonistas del receptor de Ang II (también conocidos como "bloqueadores del receptor de Ang II"), y antagonistas de aldosterona. Los métodos para el uso de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos combinados con tales antagonistas se exponen en el documento WO 2004/098637, por ejemplo.
- 60 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también son útiles para tratar enfermedades y afecciones asociadas con el depósito de ECM, incluyendo, esclerosis sistémica, adherencias postoperatorias,

- cicatrización queloe e hipertrófica, vitreoretinopatía proliferativa, cirugía de drenaje del glaucoma, lesión corneal, cataratas, enfermedad de Peyronie, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, cirrosis del hígado, cicatrización post-infarto de miocardio, restenosis post-angioplastia, cicatrización después de hemorragia subaracnoidea, esclerosis múltiple, fibrosis después de laminectomía, fibrosis después de reparación de tendón y otras reparaciones, cicatrices debido a la eliminación de tatuajes, cirrosis biliar (incluyendo colangitis esclerosante), pericarditis, pleuresia, traqueotomía, lesión penetrante del sistema nervioso central, síndrome miálgico eosinófilo, restenosis vascular, enfermedad veno-oclusiva, pancreatitis y artropatía psoriásica.
- 5 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos además son útiles para promover la reepitelización en enfermedades y afecciones, tales como úlceras venosas, úlceras isquémicas (llagas por presión), úlceras diabéticas, sitios de injertos, sitios donantes de injertos, abrasiones y quemaduras, enfermedades del epitelio bronquial, tales como el asma, SDRA, enfermedades del epitelio intestinal, tales como la mucositis asociada con el tratamiento citotóxico, úlceras esofágicas (enfermedad de reflujo), úlceras de estómago, lesiones del intestino delgado y del intestino grueso (enfermedad inflamatoria intestinal).
- 10 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar para promover la proliferación de células endoteliales, por ejemplo, en la estabilización de las placas ateroscleróticas, la promoción de la cicatrización de las anastomosis vasculares, o para inhibir la proliferación de las células del músculo liso, tal como en la enfermedad arterial, la restenosis y el asma.
- 15 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar para promover la proliferación de células endoteliales, por ejemplo, en la estabilización de las placas ateroscleróticas, la promoción de la cicatrización de las anastomosis vasculares, o para inhibir la proliferación de las células del músculo liso, tal como en la enfermedad arterial, la restenosis y el asma.
- 20 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles para mejorar la respuesta inmunitaria a las infecciones mediadas por macrófagos. También son útiles para reducir la inmunosupresión causada, por ejemplo, por tumores, SIDA o enfermedades granulomatosas. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles para tratar enfermedades hiperproliferativas, tales como cánceres, incluyendo, pero no limitados a, mama, próstata, ovario, estómago, riñón, pancreático, colorrectal, de piel, de pulmón, cánceres de cuello uterino y de vejiga, glioma, mesotelioma, así como varias leucemias y sarcomas, tales como el sarcoma de Kaposi, y son útiles para tratar o prevenir las recurrencias o metástasis de dichos tumores. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también son útiles para inhibir la metástasis mediada por ciclosporina.
- 25 En el contexto de la terapia del cáncer, "tratamiento" incluye cualquier intervención médica que da como resultado la ralentización del crecimiento del tumor o la reducción en las metástasis tumorales, así como la remisión parcial del cáncer con objeto de prolongar la esperanza de vida de un paciente.
- 30 Los métodos de tratamiento comprenden la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede usar en la fabricación de un medicamento para su administración. Por ejemplo, un método de fabricación de un medicamento o composición farmacéutica comprende formular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición se puede administrar sola o combinada con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección que se vaya a tratar.
- 35 La administración se lleva a cabo preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" suficiente para mostrar un beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejoría de al menos un síntoma de una enfermedad o afección concreta. La cantidad real administrada, y la velocidad y el curso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o afección que esté siendo tratada. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., se puede determinar basándose en estudios preclínicos y clínicos cuyo diseño está dentro del nivel del experto en la técnica.
- 40 La dosis precisa dependerá de numerosos factores, incluyendo si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es para el diagnóstico o para el tratamiento, el tamaño y la ubicación del área a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento Fab o scFv, y la naturaleza de cualquier marca detectable u otra molécula unida al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Una dosis típica de un anticuerpo completo, por ejemplo, puede estar en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. La dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto puede ser ajustada proporcionalmente para niños y bebés, y también se puede ajustar a otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular y la actividad. Los tratamientos se pueden repetir a diario, dos veces por semana, semanalmente, mensualmente u otros intervalos, a discreción del médico. El tratamiento puede ser periódico, y el período entre las administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, preferiblemente aproximadamente tres semanas o más, más preferiblemente aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes.
- 45 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 rata y ratón ha sido una dosis eficaz en un entorno agudo. Por lo tanto, para la dosificación a largo plazo, se pueden administrar de 0,3 - 10 mg/kg a los seres humanos, basándose en una vida media esperada de 21 días. Las dosis pueden ser suficientes para la eficacia, a la vez que suficientemente bajas como para facilitar la administración óptima. Por ejemplo, una dosis de menos de 50 mg facilita la administración subcutánea. La administración intravenosa se puede utilizar como ruta de liberación para

enfermedades graves, donde pueden ser necesarias dosis altas y largos intervalos de tiempo de dosificación. La inyección subcutánea puede aumentar el potencial de respuesta inmunitaria 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.

5 Se pueden administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por medio de inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intracavitaria (por ejemplo, después de la resección del tumor), intralesional, intraperitoneal, o intramuscular. También se pueden administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por medio de inhalación o por vía tópica (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en las heridas, en la piel), o por vía oral.

10 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos por lo general se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por lo tanto, composiciones farmacéuticas pueden comprender excipientes, portadores, amortiguadores, estabilizadores, u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica, farmacéuticamente aceptables. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. Tales 15 materiales podrían incluir, por ejemplo, cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables son agua, disolución salina, disolución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la 20 composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son los agentes humectantes o las sustancias coadyuvantes, tales como agentes emulsionantes, conservantes o amortiguadores, que aumentan la vida útil o la eficacia.

La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración. Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de la aflicción, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa 25 parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pK, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la técnica son bien capaces de preparar disoluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, e inyección de Ringer con lactato añadido. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, amortiguadores, antioxidantes y/u otros aditivos.

30 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede formular en formas líquidas, semisólidas o sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración, de la aplicación terapéutica, de las propiedades físico-químicas de la molécula, y de la ruta de suministro. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y agentes tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir una amplia gama de concentraciones de anticuerpo 35 y pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir mediante liofilización, secado por pulverización, o secado mediante tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo.

40 Las composiciones terapéuticas se pueden formular en forma de una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y otros ingredientes de los enumerados anteriormente. 45 En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado a vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo. La fluidez apropiada de una disolución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula de una dispersión, o mediante el uso de tensioactivos. Se puede facilitar una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato de gelatina.

50 En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, polí(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales 55 formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

60 Un método de utilización de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender causar o permitir la unión a TGF $\beta$ . Tal unión puede tener lugar in vivo, por ejemplo, después de la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a un paciente, o puede tener lugar in vitro, por ejemplo, en ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, o ensayos basados en células, o métodos terapéuticos ex vivo, por ejemplo, métodos en los que se ponen en contacto células

o fluidos corporales ex vivo con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y luego se administran a un paciente.

Se proporciona un kit que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede marcar para permitir la determinación de su reactividad en una muestra. Los kits pueden ser empleados en ensayo de diagnóstico, por ejemplo. Un kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes. Se pueden incluir en el kit materiales coadyuvantes para ayudar en o para permitir la realización de un procedimiento de semejante método.

La reactividad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en una muestra se puede determinar por medio de cualquier método apropiado, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA). El antígeno marcado radiactivamente se puede mezclar con el antígeno no marcado (la muestra de ensayo) y se deja que se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo unido al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. También se puede utilizar un ensayo de unión competitiva con antígeno no radiactivo, utilizando un antígeno o un análogo ligado a una molécula informadora. La molécula informadora puede ser un fluorocromo, fósforo, o colorante. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros informadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o materiales particulados tales como cuentas de látex que están coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológicamente o químicamente activos que pueden causar directamente o indirectamente señales detectables para ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian los colores o causan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser excitables molecularmente, de tal manera que las transiciones electrónicas entre estados de energía dan como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas junto con biosensores. Se pueden emplear sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina. Las señales generadas por los productos conjugados de anticuerpo-informador se pueden utilizar para obtener datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo relevante en las muestras.

La presente divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición. Una posibilidad es la conexión de una molécula informadora al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de manera que se produzca un cambio físico u óptico en la unión. La molécula informadora puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferiblemente medibles. La unión de las moléculas informadoras puede ser directamente o indirectamente, covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace peptídico, o no covalentemente. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y una proteína informadora pueden estar unidos por un enlace peptídico y ser expresados de forma recombinante como una proteína de fusión.

### 35 EJEMPLO 1

Se puede preparar un Fv de cadena sencilla (scFv) anti-TGF $\beta$  de acuerdo con el siguiente ejemplo no limitante descrito en el Ejemplo 1 de la Patente U.S. nº 7.723.486. Las potencias de neutralización para TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y/o TGF $\beta$ 3 se pueden aumentar utilizando la mutagénesis y/o técnicas combinatorias. El scFv con potencias mejoradas para TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y/o TGF $\beta$ 3 puede ser generado por medio de selección y escrutinio de bibliotecas de anticuerpos en fagos tal como se describe en el Ejemplo 1 de la Patente U.S. nº 7.723.486. Los scFv generados en ese ejemplo se compararon con 1D11.16, que se describe en la Patente U.S. nº 7.723.486, en el ensayo de proliferación de MLEC.

En el Ejemplo 1 de la Patente U.S. nº 7.723.486, se encontró que líneas germinales concretas estaban altamente representadas en la población de scFv neutralizadores de TGF $\beta$  de alta potencia. Estas fueron DP-10/1-69 y DP-88/1-e (ambas miembros de la familia de la línea germinal de VH1) para la cadena pesada, y DPK22/A27 (familia V $\kappa$ 3) para la cadena ligera. Estas líneas germinales parecen proporcionar un marco estructural especialmente adecuado para los anticuerpos pan-neutralizadores de TGF $\beta$  de alta potencia. Los scFv de PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 mostraron potencias que se aproximaban a o superaban las de 1D11.16 en las tres isoformas de TGF $\beta$  en el ensayo de proliferación de MLEC.

Las secuencias de aminoácidos derivadas de los segmentos génicos de VH y VL de PET1073G12, PET1074B9, y PET1287A10 se alinearon con las secuencias de líneas germinales humanas conocidas en la base de datos VBASE (Tomlinson, directorio de secuencias V-BASE, MRC Center for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido, en el protocolo de transferencia de hipertexto vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk (1997)), y la línea germinal humana más cercana fue identificada por la similitud de secuencia. El gen de la línea germinal humana más cercano para el segmento genético de VH de PET1073G12 y PET1074B9 fue identificado como DP-10/1-69 (familia de la línea germinal de VH1), y el gen de la línea germinal humana más cercano para el segmento genético de VH de PET1287A10 fue identificado como DP-88/1-e (familia de la línea germinal de VH1). El gen de la línea germinal humana más cercano para el segmento genético de VL de PET1073G12, PET1074B9, y PET1287A10 fue identificado como DPK22/A27 (familia de la línea germinal de V $\kappa$ 3). Se utilizó la mutagénesis dirigida al sitio para sustituir los restos del marco que

diferían de la línea germinal para el resto de la línea germinal, siempre que tales cambios no produjeran una pérdida de potencia en el ensayo de proliferación de MLEC de más de tres veces en el anticuerpo resultante en cualquier isoforma de TGF $\beta$ . Si se observaba semejante pérdida de potencia, el aminoácido que no era del marco de la línea germinal se mantuvo en el anticuerpo final.

- 5 En PET1073G12 convertido a la línea germinal y PET1074B9 convertido a la línea germinal, todos los restos del marco son de la línea germinal a excepción de dos restos de VH y un resto de VL. Las secuencias de aminoácidos para PET1073G12 convertido a la línea germinal se describen en SEQ ID NO: 2 para VH y en SEQ ID NO: 7 para VL de la Patente U.S. nº 7.723.486. Las secuencias de aminoácidos para PET1074B9 convertido a la línea germinal se describen en SEQ ID NO: 12 para VH y en SEQ ID NO: 17 para VL de la Patente U.S. nº 7.723.486. En  
10 PET1287A10 convertido a la línea germinal, todos los restos del marco de VH y VL son de la línea germinal. Las secuencias de aminoácidos para PET1287A10 convertido a la línea germinal se describen en SEQ ID NO: 22 para VH y en SEQ ID NO: 27 para VL de la Patente U.S. nº 7.723.486.

#### EJEMPLO 2A

La potencia de neutralización de los anticuerpos anti-TGF $\beta$  o fragmentos de unión a antígeno del mismo se puede analizar utilizando el ensayo de proliferación de MLEC dependiente de TGF $\beta$  descrito en el Ejemplo 4 de la Patente U.S. nº 7.723.486. El ensayo de proliferación de MLEC se basa en un ensayo descrito por Danielpour et al., J. Cell. Physiol., 138:79-86 (1989). Este ensayo trabaja sobre el principio de que TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, o TGF $\beta$ 3 añadidos a células epiteliales de pulmón de visón inhiben la proliferación celular inducida por suero. Los anticuerpos se analizaron para determinar la neutralización de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, o TGF $\beta$ 3 que da como resultado la restauración de la proliferación celular. La proliferación se midió mediante la absorción de [ $^3$ H]-timidina. La potencia del anticuerpo se definió como la concentración del anticuerpo que neutralizaba una sola concentración de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, o TGF $\beta$ 3 a un nivel de 50% ( $Cl_{50}$ ) en nM.

Protocolo del ensayo de proliferación de MLEC: la línea MLEC se obtuvo de la American Type Culture Collection (Núm. de Cat. CCL-64.). Las células se hicieron crecer en Medio Esencial Mínimo (MEM, Gibco) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco), penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco) y MEM con disolución de aminoácidos no esenciales al 1% (Gibco). Las células confluentes de los matraces T-175 se disociaron del matraz, se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en medio de ensayo de MLEC que se elaboró con MEM que contenía FBS al 1%, penicilina/estreptomicina al 1% y disolución de aminoácidos no esenciales en MEM al 1%. Una alícuota de las células se marcó a continuación con azul de tripano, se contaron en un hemocitómetro, y la disolución de partida celular se diluyó a  $1,75 \times 10^5$  células por ml utilizando medio de ensayo. 100  $\mu$ l de esta suspensión se añadieron a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante 3 a 5 horas.

Preparación de disoluciones de TGF $\beta$ /anticuerpo: las disoluciones de trabajo de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 a 6 ng/ml (seis veces la concentración final del ensayo) y los anticuerpos (incluyendo controles tales como 1D11.16) a tres veces la concentración final de ensayo máxima se prepararon en medio de ensayo MLEC. La concentración final de TGF $\beta$  en el ensayo (1 ng/ml o 40 pM) correspondió a la concentración que inducía una inhibición de aproximadamente 80% de la proliferación celular en comparación con el control sin TGF $\beta$  (es decir, valor CE<sub>80</sub>).

Entorno de la placa de dilución: se titularon las muestras de anticuerpos de ensayo y de control en etapas de dilución a la tercera parte en medio de ensayo MLEC y se incubaron en presencia y ausencia de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3. Todos los controles relevantes se incluyeron en cada experimento: el ensayo del anticuerpo 1D11.16 y/o de referencia según sea apropiado y la realización de las titulaciones de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, o TGF $\beta$ 3. Las placas completadas se dejaron en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada durante 1 hora  $\pm$  15 minutos.

Adición de disoluciones de TGF $\beta$ /anticuerpo a las células cultivadas en placa: después de los tiempos de incubación apropiados, se transfirieron 100  $\mu$ l de cada pocillo de las placas de dilución a MLEC cultivadas en placa y las placas se devolvieron a la incubadora durante 44  $\pm$  2 horas. Se añadieron 25  $\mu$ l de [ $^3$ H]-timidina de 10  $\mu$ Ci/ml diluida en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) a cada uno de los pocillos (0,25  $\mu$ Ci/pocillo). Las placas se devolvieron a la incubadora durante 4 horas  $\pm$  30 minutos.

Recolección de células: se añadieron 100  $\mu$ l de tripsina-EDTA (0,25%, Gibco) a cada pocillo, las placas se incubaron durante 10 minutos en la incubadora, y las células se recogieron usando un cosechador celular de 96 pocillos Tomtec o Packard.

50 Acumulación de datos y análisis: los datos de las células recolectadas se leyeron usando un lector de placas beta (TopCount, Packard). Se analizaron los datos para obtener la  $Cl_{50}$  y los valores de desviación típica. Los valores de  $Cl_{50}$  se obtuvieron utilizando el soporte lógico Prism 2.0 (GraphPad).

Resultados: Las IgG4 PET1073G12, PET1074B9, y PET1287A10 purificadas convertidas a la línea germinal se sometieron a ensayo junto con 1D11.16 en el ensayo de proliferación de MLEC. Las IgG4 se produjeron como se describe en el Ejemplo 3 de la Patente U.S. nº 7.723.486. Los datos de la  $Cl_{50}$  media para las IgG4 de PET1073G12

y PET1287A10 demostraron que estos anticuerpos tienen potencias similares o cercanas a las de 1D11.16 sobre TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3.

Los datos de la  $C_{I50}$  media sugieren que la IgG4 de PET1074B9 es más potente sobre TGF $\beta$ 1, aunque no se obtuvo una curva completa de respuesta a la dosis en el ensayo MLEC. Como comparación, 1D11.16 mostró 12% de neutralización en TGF $\beta$ 1 a una concentración de 91 pM, y PET1074B9 mostró una neutralización de 78% a una concentración similar de 92 pM.

### EJEMPLO 2B

Adicionalmente, se midió la afinidad de unión a las isoformas de TGF $\beta$  del anticuerpo GC1008 usando un aparato Biacore® 3000 (GE Healthcare). Se diluyeron TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2, de producción propia, a ~ 1  $\mu$ g/ml en acetato 10 mM, pH 4,5, y TGF $\beta$ 3 (R & D Systems) se diluyó a ~ 2  $\mu$ g/ml en acetato 10 mM, pH 4,0. Las celdas de flujo 2, 3, y 4 de un chip sensor CM5 se inmovilizaron covalentemente con 50 a 100 UR de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3, respectivamente, utilizando el kit de acoplamiento de amina convencional de GE Healthcare. La celda de flujo 1 se utilizó como una superficie de control. Para el ensayo de unión cinética, GC1008 se diluyó seriadamente 1:3 de 33,3 nM a 1,2 nM en amortiguador HBS-EP y se inyectó por triplicado a las cuatro celdas de flujo durante 5 min., seguido de 5 min. de disociación en amortiguador a un caudal de 30  $\mu$ l/min. La superficie se regeneró con dos inyecciones de 30 s de HCl 40 mM a 75  $\mu$ l/min. Los sensogramas se ajustaron utilizando un modelo de unión 1:1 después de la sustracción del amortiguador y el cambio en el índice de refracción de la celda de flujo de control con BIA Evaluation Software Kit (GE Healthcare). Las  $K_D$  mostradas en la TABLA 6 son un promedio de más de 25 ensayos independientes.

20

TABLA 6

Isoforma	$K_D$ (nM)
TGF $\beta$ 1	1,7 ± 0,6
TGF $\beta$ 2	3,0 ± 1,2
TGF $\beta$ 3	2,0 ± 1,2

### EJEMPLO 3

La eficacia biológica de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y otras indicaciones clínicas se puede determinar usando el modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU) de rata expuesto en el Ejemplo 7 de la Patente U.S. nº 7.723.486. Ratas Sprague Dawley (Taconic Farms, Germantown, NY) adultas que pesaban de 250- 280 gramos (aproximadamente 6 semanas) fueron alojadas en un entorno con aire, temperatura y luz controlados. Las ratas sometidas a OUU recibieron una pequeña incisión abdominal en la línea media ventral para exponer el riñón izquierdo y el uréter superior. El uréter se ligó a nivel del polo inferior del riñón con sutura de seda y una segunda vez aproximadamente 0,2 cm por debajo de la primera. Las ratas con cirugía simulada recibieron el mismo protocolo quirúrgico, pero sin ligadura ureteral.

Las ratas obstruidas fueron tratadas con PBS, un anticuerpo monoclonal murino pan-neutralizador (1D11), un anticuerpo de control de isotipo coincidente (13C4), o un anticuerpo monoclonal para TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano como se describe en la Patente U.S. nº 7.723.486. Los anticuerpos se administraron a las ratas por vía intraperitoneal comenzando el día de la ligadura ureteral durante un transcurso de 3 semanas. Se administraron 13C4 y 1D11 a 5 mg/kg (3 veces/semana), y el anticuerpo pan-neutralizador humano se administró a las ratas a 5 mg/kg (cada 5 días). Al final de 3 semanas, se sacrificaron las ratas, los riñones fueron perfundidos con PBS durante 3 minutos, y los riñones perfundidos fueron cosechados para el análisis del ARNm, la determinación del contenido de colágeno, y el examen histológico.

Para evaluar el grado de fibrosis del tejido, se determinó el contenido total de colágeno del tejido mediante análisis bioquímico de hidroxiprolina en extractos hidrolizados de acuerdo con Kivirikko et al. También se llevó a cabo un ensayo de colágeno Sircol para determinar el contenido total de colágeno. El ensayo de colágeno Sircol mide la cantidad de colágenos solubles en ácido/pepsina totales basándose en la unión específica de colorante rojo Sirius con la cadena lateral del colágeno tisular.

Las ratas UUO tratadas con el anticuerpo monoclonal pan-neutralizador humano mostraron una reducción de 43,4% en el contenido de hidroxiprolina ( $1,98 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido seco) cuando se comparó con el grupo tratado con PBS ( $3,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido seco,  $p < 0,05$ ). La disminución en la fibrosis renal fue apoyada además por la reducción de colágeno solubilizado total en los riñones afectados, según lo determinado por un ensayo basado en

colorante rojo Sirius (simulado:  $18,5 \pm 2,6$ , PBS:  $69,3 \pm 3,8$ , y anticuerpo monoclonal pan-neutralizador humano:  $35,6 \pm 5,2 \mu\text{g}/100 \text{ mg de tejido}$ ,  $p < 0,05$  vs. PBS).

También se evaluó la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano para reducir la fibrosis del tejido por medio de examen inmunohistoquímico. En los animales de control, la obstrucción ureteral durante tres semanas causó la interrupción generalizada de la arquitectura tubular renal con distensión marcada, atrofia celular y necrosis/apoptosis, inflamación de los tejidos y expansión tubulointersticial con fibrosis evidente. Hubo poca evidencia de daño glomerular. Las ratas tratadas con 1D11 o anticuerpo monoclonal pan-neutralizador humano, por otra parte, mostraron preservación de la arquitectura renal a juzgar por la dilatación y la desorganización tubulares atenuadas, la reducción de productos infiltrados inflamatorios (celularidad) y la disminución de la expansión y la fibrosis tubulointersticiales.

También se midió el efecto del tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano sobre la expresión de genes regulados por TGF- $\beta$ . El ARNm de TGF- $\beta$ 1 se redujo en los animales UOO tratados con anticuerpo monoclonal pan-neutralizador humano en comparación con los animales tratados con PBS o tratados con anticuerpo de control 13C4. También se observó una disminución significativa en los niveles de ARNm de colágeno de tipo III en los riñones obstruidos tratados con los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  humano y murino en comparación con los tratados con PBS o 13C4 que indicaba una disminución en la síntesis de colágeno.

La eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano para reducir la síntesis de TGF- $\beta$  auto-inducida se confirmó además mediante la medición de la proteína TGF- $\beta$ 1 renal total. En comparación con los animales con cirugía simulada, los riñones obstruidos exhibieron un marcado aumento en el TGF- $\beta$ 1 tisular total. Las ratas obstruidas con dosis de anticuerpo monoclonal pan-neutralizador humano, sin embargo, mostraron una reducción de 75% de los niveles de TGF- $\beta$ 1 tisular, por debajo de los niveles registrados para los dos grupos de control. En comparación, el anticuerpo murino 1D11 redujo los niveles de TGF- $\beta$ 1 tisular en 45%, en comparación con los grupos de control. Los resultados anteriormente descritos demuestran que la neutralización de TGF- $\beta$  con un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano interrumpió el bucle de la regulación autocrina de TGF- $\beta$  concomitante con la prevención de la producción de TGF- $\beta$ 1 y la expresión de ARNm de colágeno III.

Se determinó adicionalmente el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano sobre la expresión de la actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) como un indicador indirecto de la inhibición de TGF- $\beta$ . La expresión de la actina del músculo liso es un indicador de miofibroblastos activados, que están asociados con la fibrosis del tejido y producen tejido conjuntivo fibroso. El TGF- $\beta$  es un inductor de la activación y la transformación fenotípica de los fibroblastos del estroma y las células epiteliales residentes en células miofibroblásticas. La proteína  $\alpha$ -SMA se detectó por medio de ensayo de transferencia Western convencional.

Cuando se compararon con los animales con cirugía simulada, las ratas con riñones obstruidos mostraron una regulación al alza drástica en la proteína  $\alpha$ -SMA medida por la transferencia Western de productos homogeneizados de tejido. Las ratas obstruidas que recibieron dosis de anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano mostraron una reducción significativa (75% en comparación con los controles de PBS) en la expresión medible de  $\alpha$ -SMA.

Estos resultados demuestran la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  pan-neutralizador humano en la reducción del depósito de colágeno en los riñones fibróticos, indicando claramente que el anticuerpo es un potente inhibidor de la producción y el depósito de colágeno renal en este modelo de lesión renal grave y fibrosis tubulointersticial. Debido a que el proceso de fibrosis tisular en órganos tales como el pulmón, el hígado o el riñón posee mecanismos o vías comunes, el experto en la técnica apreciará que el anticuerpo es útil en el tratamiento de enfermedades renales crónicas, así como otras indicaciones clínicas caracterizadas por fibrosis patogénica.

#### EJEMPLO 4

La estructura del complejo GC1008(Fab)-TGF $\beta$ 2 se determinó como sigue. Se expresó transitoriamente GC1008(Fab) recombinante con una etiqueta His6 C-terminal (SEQ ID NO: 11) en células HEK293FS y se purificó sobre resina de afinidad de níquel-NTA, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. GC1008(Fab) purificado se mezcló con homodímero de TGF $\beta$ 2 y el complejo se aisló usando la cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo de GC1008(Fab)-TGF $\beta$ 2 se cristalizó en PEG400 al 35%, ácido 2-(N-morfolina)etanosulfónico 100 mM (pH 6,0) a 20°C, y adicionalmente se optimizó mediante siembra y optimización del pH. El conjunto de datos final se recogió a 2,83 Å en el grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, y la estructura se resolvió utilizando el reemplazo molecular con la estructura GC1008(Fab)-TGF $\beta$ 3 descrito por Grütter (2008). La estructura del complejo de GC1008(Fab)-TGF $\beta$ 2 se representa en la FIG. 1.

#### EJEMPLO 5

La estructura del complejo de GC1009(scFv)-TGF $\beta$ 1 se determinó como sigue. GC1009(scFv) recombinante con una etiqueta His6 C-terminal (SEQ ID NO: 11) se expresó en exceso en E. coli y se purificó sobre una resina de afinidad de níquel-NTA, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. GC1009(scFv) purificado se mezcló con

homodímero de TGF $\beta$ 1, y el complejo se aisló usando cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo de GC1009(scFv)-TGF $\beta$ 1 se cristalizó en PEG 4K al 16%, citrato 0,1 M (pH 5,0), 2-propanol al 4% a 21°C. La estructura se determinó a 3,00 Å en el grupo espacial C2, y la estructura se resolvió utilizando el reemplazo molecular con la estructura GC1008(Fab)-TGF $\beta$ 2 determinada en el EJEMPLO 4. La estructura del complejo de GC1009(scFv)-TGF $\beta$ 1 se representa en la FIG. 2.

#### EJEMPLO 6

Los plásmidos que codifican cualquiera de la cadena pesada o la cadena ligera de GC1008 fueron utilizados como molde en las reacciones de mutagénesis basadas en PCR. Se realizaron mutaciones en el ADN codificante para crear 155 sustituciones de aminoácidos individuales de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada codificada y una única sustitución de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera codificada. Se utilizó un kit QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara CA) según las instrucciones del fabricante para crear mutaciones de ADN utilizando un conjunto de cebadores directos e inversos, ya sean diseñados para un aminoácido específico o para los 20 aminoácidos con un codón degenerado (NNK). Después de la confirmación de la secuenciación, el ADN mutante identificado fue emparejado con ADN de cadena pesada o ligera de tipo salvaje para la transfección en una suspensión de células hospedantes Expi293F™ (Life Techonologies Corp., Grand Island, NY). A los 4 días de la transfección, el medio acondicionado (1 ml) se recogió y se purificó usando una columna PhyTip® con Proteína A de 1 ml (PhyNexus, Inc., San José, CA) y una pipeta de 12 canales Purespeed™ (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA). Se analizaron las muestras de anticuerpo variante purificadas por duplicado en un Biacore® 3000 (GE Healthcare) a concentraciones de 50 nM, usando superficies con TGF $\beta$ 1, 2, y 3 inmovilizados a un nivel de 100 UR. La velocidad de disociación ( $k_d$ ) de las variantes se dividió entre la  $k_d$  del control de tipo salvaje para obtener el factor de cambio en la  $k_d$ . Se indicó un aumento en la afinidad si ( $k_d^{\text{var}}/k_d^{\text{WT}}$ ) era de menos de 1, y se indicó una reducción, si el valor era mayor que 1. Se generó un mapa térmico para visualizar los resultados. Las variantes que perdieron por completo la afinidad por TGF $\beta$  se muestran en negro sin números. Los resultados se muestran en las TABLAS 7A, 7B y 7C.

25

TABLA 7A

	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3
P53I	<b>4.3</b>	1.6	1.3
N59R	<b>2.4</b>	1.1	1.5
N59Y	1.3	1.1	1.5
G101Y	<b>1.9</b>	1.5	<b>2.0</b>
V103R			
L104K			
L104R			
L104W	<b>4.7</b>	<b>2.9</b>	<b>5.1</b>
A93R(LC)			



< 0.5                    1.0 (WT)                    > 3.0

# ES 2 845 215 T3

TABLA 7B

	Y27			S30			S31			NF32			IS2			IS4			V55			D56			E74		
	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3			
A	1.6	3.4	3.5	6.7	6.6	6.5	1.2	1.2	1.1	1.3	1.4	1.5	N/A	N/A	N/A	4.8	2.5	1.9	2.4	1.7	1.7	1.7	1.9	0.6	0.4	A	
C	N/A	N/A	N/A	1.2	1.1	1.0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6.3	3.9	3.8	5.0	3.2	2.2	1.4	1.3	0.8	1.7	1.7	1.7	0.6	0.7	C
D	1.2	1.3	1.2	1.8	1.5	1.5	N/A	N/A	N/A	1.3	1.4	1.8	N/A	N/A	N/A	6.0	2.3	5.2	N/A	N/A	N/A	N/A	0.9	0.8	0.5	D	
E	1.2	1.6	1.5	3.2	3.1	3.1	1.2	1.4	1.4	0.6	0.8	0.7	N/A	N/A	N/A	5.6	2.9	5.0	N/A	N/A	N/A	N/A	1.0	1.2	0.9	E	
F	1.3	1.2	1.3	3.0	0.9	6.7	N/A	N/A	N/A	4.5	4.9	4.8	N/A	N/A	N/A	6.3	2.7	1.2	3.2	3.5	3.5	3.5	1.5	0.4	0.5	F	
G	1.5	1.6	1.3	0.9	0.7	0.9	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.5	N/A	N/A	N/A	4.2	3.8	3.2	3.4	3.9	3.4	3.4	1.1	1.0	0.7	G	
H	1.5	1.6	1.6	0.6	0.9	0.9	0.4	1.5	1.3	1.4	1.4	1.6	N/A	N/A	N/A	3.1	2.4	1.6	N/A	N/A	N/A	N/A	0.7	0.9	0.5	H	
I	1.3	1.3	1.5	0.4	1.1	1.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	WT	WT	WT	3.8	3.8	1.7	1.8	1.5	1.4	1.4	N/A	1	N/A	K	
K	1.3	3.6	1.3	2.6	1.5	1.6	1.8	1.2	1.6	1.4	1.8	1.9	N/A	N/A	N/A	6.7	4.4	4.4	N/A	N/A	N/A	N/A	1.1	1.3	0.7	N/A	
L	1.5	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.2	1.5	1.6	1.7	N/A	N/A	N/A	6.7	3.5	3.5	1.8	1.8	1.8	1.8	1.0	0.8	0.5	N/A	
M	1.3	1.4	1.3	0.7	0.9	1.0	N/A	N/A	N/A	1.3	1.3	1.2	WT	WT	WT	3.2	3.1	3.1	3.3	3.3	3.3	3.3	N/A	N/A	N/A	M	
N	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	N/A	N/A	N/A	1.3	1.3	1.2	WT	WT	WT	3.5	3.3	3.3	3.7	3.7	3.7	3.7	N/A	N/A	N/A	N	
P	1.7	1.6	1.6	1.2	1.2	1.2	0.9	1.5	1.2	1.2	1.1	1.3	N/A	N/A	N/A	4.9	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	1.2	1.4	0.9	P	
Q	1.5	1.4	1.4	1.2	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	0.8	0.8	0.7	N/A	N/A	N/A	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	1.1	1.0	1.2	Q	
R	2.3	1.5	1.7	1.9	1.2	1.3	1.4	1.2	1.5	1.3	1.2	1.7	N/A	N/A	N/A	7.6	5.2	4.8	4.9	2.3	3.8	3.8	1.0	0.8	0.7	R	
S	1.6	1.5	1.6	WT	WT	WT	1.3	1.3	1.2	1.2	1.2	1.2	N/A	N/A	N/A	2.7	2.7	2.5	3.8	4.7	3.7	3.7	1.1	1.0	0.8	S	
T	1.4	1.5	1.5	1.2	1.2	1.1	1.6	1.5	1.5	1.2	1.1	1.8	N/A	N/A	N/A	7.1	3.3	3.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	1.2	0.8	T	
V	1.7	1.6	1.5	1.4	1.2	1.1	1.4	1.0	1.4	1.5	1.1	1.4	N/A	N/A	N/A	WT	WT	WT	WT	1.6	1.5	1.5	N/A	N/A	V		
W	1.4	1.3	1.4	0.7	0.4	0.3	1.7	1.4	1.6	1.9	1.2	1.1	N/A	N/A	N/A	2.0	2.0	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	0.8	0.3	0.3	W	
Y	WT	WT	WT	0.9	0.9	0.8	N/A	N/A	N/A	2.1	2.1	2.1	N/A	N/A	N/A	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	0.7	0.4	0.3	Y	

TABLA 7C

	kd mutante/kd wt			KD mutante/KD wt		
	TGFb1	TGFb2	TGFb3	TGFb1	TGFb2	TGFb3
Y27H	1.5	1.4	1.4	1.2	1.3	1.1
S30E	1.2	1.4	1.1	1.5	1.6	0.8
S30W	0.7	0.4	0.3	0.7	0.4	0.3
S31W	1.7	1.4	1.6	1.3	1.3	1.3
N32E	0.6	0.8	0.7	1.0	0.8	1.0
N32K	2.7	1.4	1.8	4.0	2.6	3.7
I52L	3.0	1.4	1.6	4.1	2.4	2.6
I54F	1.3	0.7	1.2	1.3	0.6	1.2
I54N	4.9	2.4	4.3	7.0	4.5	13.1
I54R	7.6	5.2	4.8	11.0	5.3	11.4
I54T	2.1	1.3	1.7	2.1	2.1	3.2
I54W	2.0	1.2	1.7	1.7	1.4	3.1
V55F	1.2	0.9	1.2	1.0	0.6	0.8
D56R	1.0	0.8	0.7	1.0	0.6	0.6
E74L	0.8	0.6	0.1	0.9	0.7	0.3
E74R	2.0	1.0	0.7	2.1	1.3	0.8
E74W	0.8	0.3	0.3	0.9	0.5	0.6

- 5 Se seleccionaron diecisiete mutantes y se ampliaron a escala para producir suficiente cantidad de proteína purificada para el ensayo de KD (constante de equilibrio = kd/ka) por medio de Biacore. Se utilizaron múltiples concentraciones (90, 30, 10 y 3,33 nM) por duplicado sobre superficies de TGF $\beta$ 1, 2, y 3 inmovilizado a un nivel de 150 UR. La KD se calculó utilizando ensayo de ajuste de curva global para un modelo de unión de Langmuir 1-a-1. Los datos experimentales de las cuatro concentraciones se utilizaron para el cálculo excepto para los mutantes I54N e I54R, en los que se utilizaron solo las 2 primeras concentraciones. Se compararon los factores de cambio en KD con los factores de cambio en kd (disociación) presentados en la TABLA 7B y se generó un mapa térmico para la visualización. Se observaron factores de cambio similares a partir de los dos conjuntos de datos, lo que confirma la validez de utilizar kd como un parámetro para el escrutinio de 155 mutantes simples como se muestra en la TABLA 7B.
- 10 El ensayo del mapa térmico de la TABLA 7 se visualiza en la FIG. 5, que muestra la estructura 3D de GC1008 unido a TGF $\beta$ . La cadena de color gris representa GC1008, y la cadena de color negro representa TGF $\beta$ 2. Los restos I52, I54 y V55 son las letras marcadas de color negro; los restos Y27, S31, N32 y D56 están marcados en color gris; y los restos S30 y E74 están marcados en color blanco de acuerdo con el esquema de color que se utiliza para el análisis del mapa térmico, mostrado en la parte inferior de la TABLA 7A. Seis restos adicionales marcados en letra más pequeña, P53, N59, G101, V103, L104 y A93 (cadena ligera), se colorean de manera similar de acuerdo con el análisis del mapa térmico. Basándose en el análisis de mutagénesis, las posiciones más sensibles (I52, I54, V55 en letras de color negro) son los restos paratípicos que interaccionan con el núcleo de la región del parche hidrófobo de TGF $\beta$  completamente conservada, mientras que las posiciones más tolerantes (S30, E74 en letras de color blanco) están más lejos e interaccionan con la región de hélice tres de TGF $\beta$ .

# ES 2 845 215 T3

## Listado de secuencias

<110> GENZYME CORPORATION

<120> ANTICUERPOS ANTI-TGF-BETA MODIFICADOS GENÉTICAMENTE Y FRAGMENTOS DE UNIÓN A ANTÍGENO DE LOS MISMOS

5 <130> BET 18M2416

<150> 61/776.430

< 151> 2013-03-11

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

< 211> 120

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 1

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 Tyr Thr Phe Ser Ser Asn  
20                       25                                   30

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe  
50                       55                                   60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr  
65                       70                                   75                       80

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

Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100                      105                               110

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115                      120

<210> 2

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

20 <400> 2

ES 2 845 215 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser  
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 3

< 211> 105

< 212> PRT

5

< 213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
100 105

<210> 4

< 211> 107

10

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 845 215 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 5

< 211> 112

< 212> PRT

5

< 213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu  
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro  
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

10

<210> 6

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 845 215 T3

<400> 6

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro  
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 7

< 211> 112

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys  
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp  
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys  
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu  
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro  
85 90 95

10 Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser  
100 105 110

<210> 8

< 211> 5

< 212> PRT

ES 2 845 215 T3

< 213> Homo sapiens  
<400> 8  
Leu Gly Trp Lys Trp  
1 5  
<210> 9  
5 < 211> 273  
< 212> PRT  
< 213> Secuencia artificial  
<220>  
< 223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético  
10 <400> 9  
Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
20 25 30  
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
35 40 45  
Thr Phe Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
50 55 60  
Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn  
65 70 75 80  
Tyr Ala Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser  
85 90 95  
Thr Ser Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr  
100 105 110  
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met  
115 120 125  
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

ES 2 845 215 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr  
145 150 155 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
165 170 175

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu  
180 185 190

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
195 200 205

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
210 215 220

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu  
225 230 235 240

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr  
245 250 255

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg His His His His His  
260 265 270

His

<210> 10

< 211> 5

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

10 <210> 11

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> Descripción de la secuencia artificial: etiqueta de 6xHis sintética

<400> 11

His His His His His  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, glioma, mesotelioma, leucemia o un sarcoma en un paciente que lo necesita, en el que el anticuerpo comprende
- 5        un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende SEQ ID NO: 1 con una sustitución seleccionada del grupo que consiste en S30A, S30H, S30W, E74A, E74C, E74D, E74F, E74G, E74H, E74L, E74P, E74Q, E74R, E74S, E74T, E74W, y E74Y; y
- un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende SEQ ID NO: 2; y
- 10      en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de unirse al factor de crecimiento transformante humano (TGF)  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ .
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende además una región constante de IgG humana.
- 15      3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 2, en el que la región constante de IgG es una región constante de IgG4 humana.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo comprende además una región constante  $\kappa$  humana.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de la reivindicación 4, en el que la región constante de IgG4 humana comprende SEQ ID NO: 3, y la región constante  $\kappa$  humana comprende SEQ ID NO: 4.
- 20      6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer de ovario.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer colorrectal.
- 25      8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer de pulmón.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer cervicouterino.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer de vejiga.
- 30      11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer de mama.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer de próstata.
- 35      13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer renal.
14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer pancreático.
15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el paciente tiene cáncer de piel.



GC1008(Fab)

Homodímero de TGF $\beta$ 2

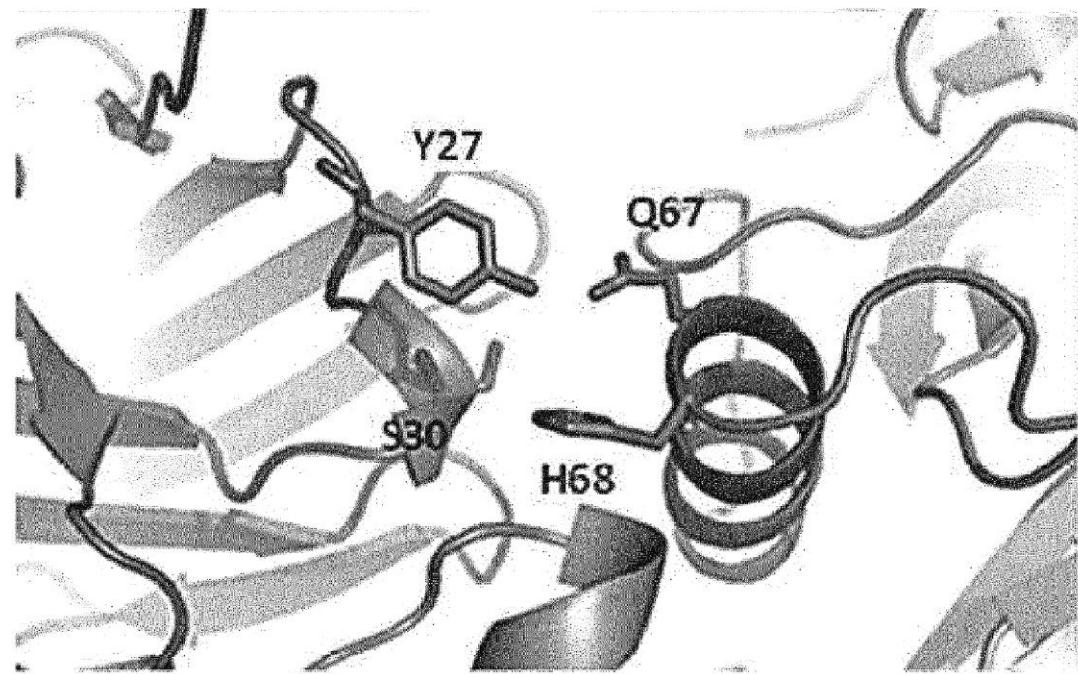
GC1008(Fab)

**FIG.1**



GC1009(scFv) Homodímero de TGF $\beta$ 1 GC1009(scFv)

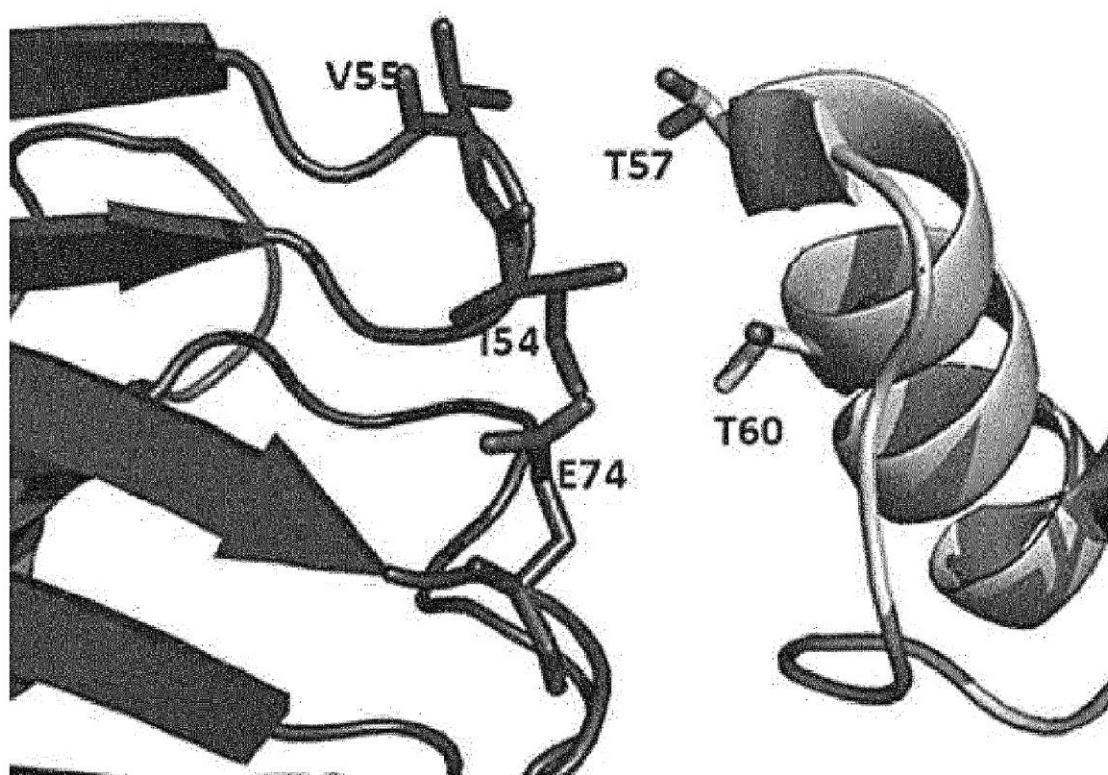
**FIG.2**



Dominio VH

TGF $\beta$ 1

FIG.3



Dominio VH

TGF $\beta$ 3

FIG.4

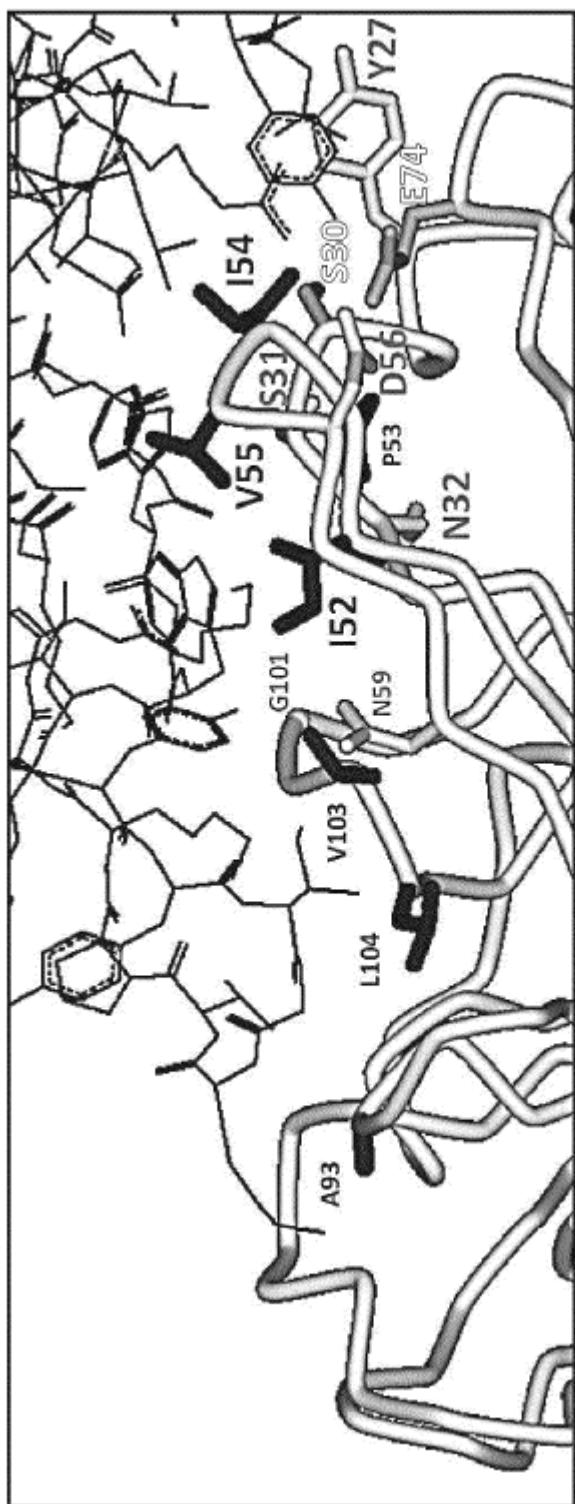


FIG.5