

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 790**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2016** **E 22180865 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 4163299**

54 Título: **Anticuerpos IgG modificados que se unen al factor de crecimiento transformante-beta1 con alta afinidad, avidez y especificidad**

30 Prioridad:

04.03.2015 US 201562128149 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2025

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

QIU, HUAWEI y
BIRD, JULIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 994 790 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 IgG modificados que se unen al factor de crecimiento transformante-beta1 con alta afinidad, avidez y especificidad

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 Anticuerpos IgG modificados, que comprenden cada uno una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica, que presentan alta afinidad y avidez por el factor de crecimiento transformante-β1 (TGFβ1), pero no por TGFβ2 o TGFβ3. Se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos IgG modificados y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades que implican actividad de TGFβ1.

15 Muchas enfermedades graves están ligadas a disfunciones de la ruta de señalización inducida por TGFβ. Por ejemplo, se cree que un nivel aumentado en el tejido de TGFβ es un factor en el desarrollo de fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis miocárdica. Además, niveles locales en el tejido altos de TGFβ pueden permitir el mantenimiento y progresión de algunos tipos de células cancerosas. La regulación por disminución de la señalización de TGFβ, por lo tanto, puede reducir la viabilidad de dichas células tumorales.

20 Las isoformas de TGFβ son moléculas homodiméricas de ~25 kDa con un entramado estructural similar en que dos monómeros se unen covalentemente mediante un puente disulfuro. Las isoformas de mamífero comparten una identidad de secuencia de un 70-82 %, pero tienen actividades no solapantes en el desarrollo vascular y la regulación de la función de los inmunocitos. Se ha informado de tres isoformas de TGFβ en seres humanos: TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 (números de acceso a Swiss Prot P01137, P08112 y P10600, respectivamente). TGFβ1 y TGFβ3 desencadenan una reacción en cadena de señalización celular tras la unión a los dominios extracelulares de dos receptores transmembranarios, conocidos como receptores de TGFβ de tipo I y II. TGFβ2 puede unirse a los receptores de TGFβ de tipo I y II, así como el receptor de TGFβ de tipo III.

25 Anticuerpos que se unen a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humano se han ensayado para uso clínico. Por ejemplo, Grütter *et al.* divulgaron GC1008, un anticuerpo monoclonal IgG4 humano (Mab; es decir, GC1008) en desarrollo clínico para tratar neoplasias y enfermedades fibróticas. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 105(51): 20251-56 (2008). GC1008 es un anticuerpo neutralizante de TGFβ "panespecífico", porque puede neutralizar las tres isoformas de TGFβ humano. Se divulgan anticuerpos que neutralizan selectivamente TGFβ1, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.492.497 y la patente de Estados Unidos n.º 7.151.169. Metelimumab, también conocido como CAT192 (IgG4), es un anticuerpo monoclonal IgG4 humano que neutraliza selectivamente TGF-β1. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.492.497. Metelimumab se ensayó para el tratamiento de esclerosis generalizada cutánea difusa, también conocida como esclerodermia, pero demostró eficacia insuficiente.

40 Breve resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de unión a TGFβ1 aislada para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica seleccionada de glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis, en la que la proteína de unión aislada es un IgG que comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica, una tercera cadena polipeptídica y una cuarta cadena polipeptídica, caracterizada por que

50 (a) se añade un conector a dicha primera y segunda cadena polipeptídica, que tienen, cada una de ellas, la fórmula de, del extremo N al extremo C: (dominio VL)-(conector1)-(dominio CL), o
(b) se añade un conector a dicha tercera y cuarta cadena polipeptídica, que tienen, cada una de ellas, la fórmula de, del extremo N al extremo C: (dominio VH)-(conector2)-(dominio CH1)-(bisagra)-(región Fc), o
(c) tanto (a) como (b);

55 en la que:

(i) el dominio VL de cada una de la primera y segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y
(ii) el dominio VH de cada una de la tercera y cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y

60 en la que el conector1, cuando está presente, y el conector2, cuando está presente, comprende el residuo aminoácido o secuencia de aminoácidos seleccionada de la lista que consiste en G, GG, GGS, GGGS y GGGGS. La presente divulgación proporciona anticuerpos IgG modificados que se unen a TGFβ1 que pueden unirse selectivamente y neutralizar TGFβ1 humano. Los anticuerpos IgG modificados divulgados derivan de metelimumab.

Los dominios VH y VL de los anticuerpos IgG modificados presentan una afinidad de unión y avidez por TGFβ1 y capacidad neutralizante de TGFβ1 similares a las de metelimumab.

Los anticuerpos IgG modificados de la presente invención comprenden un dominio variable que puede unirse a TGFβ1. De acuerdo con una realización, los anticuerpos IgG modificados divulgados comprenden una proteína de unión que presenta una Kd por TGFβ1 humano al menos un 50 % menor que la Kd de la misma proteína de unión por TGFβ2 humano, medida por resonancia de plasmones superficiales.

En una realización, la región Fc se conecta al dominio CH1 mediante una bisagra. La bisagra puede comprender secuencias de aminoácidos derivadas de una región de bisagra de IgG1 o IgG4 humana. Por ejemplo, la bisagra puede comprender la secuencia de aminoácidos PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP (SEQ ID NO: 5), o una variante de la misma, que tiene hasta cinco modificaciones aminoacídicas. En una realización, la longitud de la bisagra puede variar de 1-15 aminoácidos.

En otra realización, se realiza mutagénesis dirigida al sitio sobre las regiones de codo de Fab CAT192 para mejorar la afinidad de unión por TGFβ1. Se inserta de uno a cinco aminoácidos (G, GG, GGS, GGGS y GGGGS) en la región de codo de la cadena ligera para aumentar la flexibilidad de la bisagra, que pueden requerirse para presentar un parátipo de unión funcional a partir de las dos cadenas. Los medios acondicionados de una transfección de Expi293 muestran buena expresión y mejora significativa en la unión a TGFβ1 por Octet. Los mutantes se purifican mediante Ni-NTA y las altas afinidades de unión a TGFβ se confirman usando Biacore. Los mutantes CAT192 con 1 a cinco aminoácidos insertados en la región de codo de LC vuelven a adquirir la unión de alta afinidad de scFv a TGFβ1. Estos mutantes de inserción en el codo manipulados también conservan la selectividad de isoforma y pueden servir como antagonistas específicos de TGFβ1.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos IgG modificados de la presente invención pueden ser un elemento de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos IgG modificados. La composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

Los dibujos presentados en este documento son con fines ilustrativos y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención.

La figura 1 representa los resultados de un ensayo de unión a TGFβ1 Biacore que mostró la pérdida de afinidad cuando el scFv (CAT191) se convertía en una molécula IgG4 de longitud completa (CAT192).

La figura 2 representa elementos estructurales de un scFv, un Fab, una molécula IgG y las regiones de codo que se manipularon para restablecer la afinidad.

La figura 3 muestra los resultados de un gel de SDS-PAGE de variantes de IgG purificadas con aminoácidos adicionales en las regiones de codo de la cadena pesada y ligera. La SDS-PAGE muestra la pureza de las variantes de IgG purificadas en condiciones reductoras y no reductoras.

La figura 4 muestra un ensayo de unión Biacore de variantes de IgG purificadas con aminoácidos adicionales en las regiones de codo de la cadena pesada y ligera. El resultado del ensayo Biacore demuestra la unión selectiva de isoforma y de alta afinidad por las variantes.

La figura 5 muestra un bioensayo celular A549 de variantes de IgG purificadas con aminoácidos adicionales en las regiones de codo de la cadena ligera. El ensayo de A549 compara los efectos inhibidores mediante diversas construcciones de anticuerpo sobre la producción de IL-11 estimulada por TGFβ1, que muestra que las variantes manipuladas en el codo son muy potentes en este ensayo de potencia basado en células.

La figura 6 representa un ensayo Biacore de unión a TGFβ1 que muestra que se vuelve a lograr unión de alta afinidad cuando se insertan aminoácidos adicionales en la región de codo tanto de la cadena pesada como de la ligera de Fab CAT192.

La figura 7 muestra los resultados de un análisis de fluorimetría diferencial de barrido (DSF) de la termoestabilidad de los mutantes de Fab CAT192.

La figura 8 muestra los resultados de un análisis de fluorimetría diferencial de barrido (DSF) de la termoestabilidad de los mutantes de IgG4 CAT192.

La figura 9 muestra las estructuras cristalinas resueltas para las variantes de Fab CAT192.

Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos IgG modificados divulgados se unen a y neutralizan TGFβ1 selectivamente y con alta afinidad y avidez. Los anticuerpos IgG modificados ventajosamente muestran mayor eficacia en neutralizar TGFβ1 que cuando se usan los dominios variables en otros formatos.

Como se usa en este documento, un primer elemento "y/o" un segundo elemento significa una divulgación específica del primer o segundo elemento por separado, o el primer y segundo elemento en combinación. Las formas singulares "un/o", "una", y "el/la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Un polinucleótido (o ácido nucleico) o proteína "aislada" se retira y/o altera de su forma natural usando tecnologías de ingeniería genética. Un ácido nucleico o proteína "purificada" puede ser sustancialmente pura, por ejemplo, al menos un 90 % pura, o en forma homogénea.

"Unión selectiva" o "que se une selectivamente" a TGFβ1 humano, significa que la proteína de unión (por ejemplo, dímero de scFv-Fc) puede unirse a TGFβ1 humano con una afinidad mayor que la unión a TGFβ2 humano o TGFβ3 humano, por ejemplo, con una constante de disociación con TGFβ1 humano al menos un 50 % menor que su constante de disociación con TGFβ2 humano o TGFβ3 humano, medida por resonancia de plasmones superficiales.

Un "dominio variable" (VD) se refiere a un dominio de unión hipervariable de una inmunoglobulina, o un dominio de unión a ligando de un receptor, implicado en la unión de antígeno/ligando como es sabido por los expertos en la materia. Los dominios variables se denominan de forma rutinaria por su ubicación u origen dentro de una inmunoglobulina; por ejemplo, dominios variables de la cadena ligera de una inmunoglobulina (VL), dominios variables de la cadena pesada de una inmunoglobulina (VH), dominios variables de la cadena pesada de una inmunoglobulina de camélido (VHH).

Un dominio variable "variante" comprende adiciones, sustituciones y/o eliminaciones aminoacídicas, en comparación con la secuencia de referencia. Una "variante" de los dominios VH o VL puede tener hasta cuatro de dichas modificaciones aminoacídicas. Por ejemplo, uno de los dos dominios puede comprender una sustitución aminoacídica, mientras que el otro dominio está sin modificar, o ambos dominios pueden comprender sustituciones aminoacídicas. Pueden hacerse modificaciones que añaden o eliminan residuos aminoacídicos en el extremo N o extremo C del dominio VH o VL. Por ejemplo, puede eliminarse el residuo N terminal del dominio VH.

Para los fines de esta divulgación, los términos "entre", "de", "a" y "al menos" son inclusivos. Por ejemplo, un número entero "de 0 a 5" significa cualquier número entero igual a o mayor de 0, pero igual a o menor de 5.

Puede tolerarse una sustitución de un aminoácido flanqueante con un aminoácido que existe en cualquiera de estas secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, un residuo de un dominio VH de SEQ ID NO: 1 puede sustituirse con un aminoácido que aparece en una posición correspondiente en cualquier secuencia de la línea germinal de VH, por ejemplo, la secuencia de la línea germinal de DP-10 (V_H 1-69) o DP-88 (V_H 1-e). Las posiciones correspondientes en este caso se determinan mediante una alineación de secuencias entre las diversas secuencias de la línea germinal, usando técnicas de alineación bien conocidas en la técnica, por ejemplo, ClustalW.

Sustituciones adicionales que se espera que se toleren son las realizadas en un aminoácido con la mayor parte de su cadena lateral expuesta al disolvente, como se determina por análisis de las tres estructuras cocrystalinas. El área superficial accesible al disolvente de un residuo puede estimarse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, se espera que sustituciones en aminoácidos enterrados dentro de los dominios variables se tolerarán mejor si la cadena lateral del aminoácido no crea impedimento estérico con los residuos colindantes. Por esta razón, los aminoácidos enterrados en general se sustituyen con aminoácidos con cadenas laterales de tamaño similar o más pequeño. Por ejemplo, una sustitución de un residuo de Ile enterrado con una Leu, Val, Ala o Gly se espera que se tolere. Pueden predecirse posibles impedimentos estéricos creados por una sustitución por análisis de las tres estructuras cocrystalinas. Sustituciones adicionales que se espera que se toleren son las que mantienen interacciones electrostáticas existentes dentro de los dominios variables, por ejemplo, interacciones de dipolo-dipolo, interacciones de dipolo inducido, enlaces de hidrógeno o enlaces iónicos.

Sustituciones aminoacídicas adicionales de dominios variables incluyen las que se espera que confieran nuevas propiedades útiles a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, pueden eliminarse supuestos sitios de N-glucosilación en los dominios VH y/o VL para evitar o reducir la formación de N-glucóformas. El residuo aminoterminal puede sustituirse con un residuo de Gln para provocar piroglutamilación, que puede disminuir el número de variantes de carga. Las sustituciones aminoacídicas pueden usarse para reducir el punto isoelectrico, que puede disminuir la tasa de eliminación de anticuerpos de polipéptido de IgG, por ejemplo.

Los residuos superficiales de los dominios variables pueden sustituirse con residuos de Cys o Lys, por ejemplo, que entonces pueden modificarse covalentemente y acoplarse a moléculas que confieren características útiles a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, un marcador detectable, toxina, resto de dirección o proteína. Por ejemplo, puede acoplarse un residuo de Cys a un fármaco citotóxico para formar un conjugado de fármaco. También pueden acoplarse residuos de Cys a moléculas que aumentan la semivida en suero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o soroalbúmina. Dichas modificaciones aminoacídicas se revisan en Beck *et al.* (2010) Nature 10: 345-52, por ejemplo.

Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que pueden fijarse a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos usando métodos conocidos en la técnica. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano rústico. Los marcadores incluyen además restos químicos tales como biotina, que pueden detectarse mediante unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada. Pueden fijarse otros restos que facilitan la purificación. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos

de unión a antígeno de los mismos pueden marcarse con His usando métodos bien conocidos de modificación recombinante y expresión.

Los dominios VL de los anticuerpos IgG modificados se ligan opcionalmente a los dominios CL mediante un conector, denominado conector1 en este documento. Los dominios VH de los anticuerpos IgG modificados se ligan opcionalmente a los dominios CH1 mediante un segundo conector, denominado conector2 en este documento. Esto puede realizarse fusionando los ácidos nucleicos codificantes dentro del marco de lectura y expresando la proteína de fusión en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo.

En otra realización, opcionalmente se inserta una bisagra entre el dominio CH1 y la región Fc de los anticuerpos IgG modificados. En un aspecto, la región de bisagra es un dominio flexible que une opcionalmente la parte CH1 a la región Fc. La flexibilidad de la región de bisagra en moléculas de IgG puede permitir que los brazos Fab adopten una amplia gama de ángulos, permitiendo la unión a epítomos espaciados en distancias variables. En otro aspecto, una región de bisagra adecuada incluye, por ejemplo, la región de bisagra de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP (SEQ ID NO: 5). Esta secuencia corresponde a una parte de la bisagra superior de IgG1 humana, la bisagra media y una parte N terminal del dominio CH₂, como se divulga en la figura 4B de la patente de Estados Unidos n.º 8.048.421, por ejemplo.

En otra realización, las regiones Fc adecuadas de los anticuerpos IgG modificados contienen dos o tres regiones constantes. Las regiones Fc pueden incluir las de IgG1 humana, como se expone en SEQ ID NO: 6, o IgG4, como se expone en los dominios CH₂ y CH₃ de SEQ ID NO: 17. La región Fc de un anticuerpo media su semivida en suero y las funciones efectoras, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

Pueden hacerse modificaciones a la región de bisagra y Fc para mejorar diversas propiedades de los anticuerpos IgG modificados. En una realización, puede modificarse uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta diez aminoácidos de una región Fc humana de origen natural, además de modificaciones de la región de bisagra. Por ejemplo, la región Fc puede modificarse para aumentar la semivida en suero de los anticuerpos IgG modificados. La semivida de una IgG depende de su unión dependiente del pH al receptor FcRn. FcRn, que se expresa en la superficie de células endoteliales, se une a la IgG de una manera dependiente del pH y la protege de la degradación. Se ha demostrado que mutaciones ubicadas en la superficie de contacto entre los dominios CH₂ y CH₃, por ejemplo, aumentan la afinidad de unión a FcRn y la semivida de IgG1 *in vivo*. Dichas modificaciones se revisan en Strohl WR., 2009. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol. 20(6):685-91; y Vaccaro C. *et al.*, 2005. La manipulación de la región Fc de inmunoglobulina G modula los niveles de anticuerpos *in vivo*. Nat Biotechnol. 23(10): 1283-8, por ejemplo.

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

Se resumen modificaciones representativas de la región de bisagra y/o Fc en la tabla 1.

Tabla 1: Modificaciones representativas de la región de bisagra y Fc

Isotipo	Especie	Sustituciones	Unión a FcR/C1q	Función efectora	Ref.
IgG1	Humana	T250Q/M428L	Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada	1
IgG1	Humana	1M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada	2
IgG1	Humana	E233P/L234V/L235A/G236 + A327G/A330S/P331S	Unión reducida a FcγRI	ADCC y CDC reducidas	3,4
IgG1	Humana	E333A	Unión aumentada a FcγRIIIa	ADCC y CDC aumentadas	5,6
IgG1	Humana	S239D/A330L/I332E	Unión aumentada a FcγRIIIa	ADCC aumentada	7, 8
IgG1	Humana	P257I/Q311	Unión aumentada a FcRn	Semivida inalterada	9
IgG1	Humana	K326W/E333S	Unión aumentada a C1q	CDC aumentada	10

Isotipo	Especie	Sustituciones	Unión a FcR/C1q	Función efectora	Ref.
IgG1	Humana	S239D/I332E/G236A	Relación de FcγRIIIa/FcγRIIIb aumentada	Fagocitosis de macrófagos aumentada	11
IgG1	Humana	K322A	Unión reducida a C1q	CDC reducida	5
IgG4	Humana	S228P	-	Intercambio reducido de brazo Fab	12
IgG2a	Ratón	L235E + E318A/K320A/K322A	Unión reducida a FcγRI y C1q	ADCC y CDC reducidas	10
1. Hinton <i>et al.</i> (2004) J. Biol. Chem. 279(8):6213-16. 2. Vaccaro <i>et al.</i> (2005) Nature Biotechnol. 23(10): 1283-88. 3. Armour <i>et al.</i> (1999) Eur. J. Immunol. 29(8):2613-24. 4. Shields <i>et al.</i> (2001) J. Biol. Chem. 276(9):6591-604. 5. Idusogie <i>et al.</i> (2000) J. Immunol. 164(8):4178-84. 6. Idusogie <i>et al.</i> (2001) J. Immunol. 166(4):2571-75. 7. Lazar <i>et al.</i> (2006) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 103(11): 4005-10. 8. Ryan <i>et al.</i> (2007) Mol. Cancer Ther. 6: 3009-18. 9. Datta-Mannan <i>et al.</i> (2007) DrugMetab. Dispos. 35: 86-94. 10. Steurer <i>et al.</i> (1995) J. Immunol. 155(3):1165-74. 11. Richards <i>et al.</i> (2008) Mol. Cancer Ther. 7(8):2517-27. 12. Labrijn <i>et al.</i> (2009) Nature Biotechnol. 27(8):767-71.					

Además, pueden usarse modificaciones aminoacídicas 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 divulga sustituciones de Cys a Ser en la región de bisagra de IgG4 que reducen la heterogeneidad de los enlaces disulfuro y aumentan la estabilidad térmica de dominio Fab. Asimismo, Zhang *et al.* (2010) Anal. Chem. 82: 1090-99 divulgan la manipulación de la región de bisagra de IgG2 para limitar la mezcla de enlaces disulfuro y la formación de isómeros estructurales en aplicaciones terapéuticas. También pueden usarse modificaciones aminoacídicas en un dominio CH3 para eliminar los residuos de Lys carboxiterminales para disminuir el número de variantes de carga. También pueden usarse modificaciones aminoacídicas para mejorar la función farmacológica de anticuerpos recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, pueden usarse modificaciones aminoacídicas para aumentar la activación del complemento, potenciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentando la unión a FcγRIIIA o disminuyendo la unión a FcγRIIIb, y/o aumentar la semivida en suero aumentando la unión a FcRn. Dichas modificaciones aminoacídicas se revisan en Beck *et al.* (2010) Nature 10: 345-52, por ejemplo.

Ácidos nucleicos y métodos de preparación de anticuerpos IgG modificados

También se divulgan, pero no forman parte de la presente invención, ácidos nucleicos que codifican anticuerpos IgG modificados. El ácido nucleico aislado puede ser un ADN sintético, un ARNm que no es de origen natural o un ADNc, por ejemplo. Ejemplos incluyen los ácidos nucleicos que codifican los dominios VH y VL expuestos en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9 de la patente de Estados Unidos n.º 6.492.497. Una célula hospedadora recombinante puede comprender una o más construcciones anteriores. Los métodos de preparación de anticuerpos IgG modificados comprenden expresar el ácido nucleico codificante en una célula hospedadora en condiciones para producir los anticuerpos IgG modificados, y recuperar los anticuerpos. El proceso de recuperar los anticuerpos puede comprender el aislamiento y/o purificación de los anticuerpos. El método de producción puede comprender formular los anticuerpos en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una célula en que se ha introducido ADN exógeno. Debe entenderse que se pretende que dichas expresiones se refieran no solamente a la célula en cuestión particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Como pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser, de hecho, idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en este documento. Preferiblemente, las células hospedadoras incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas de cualquiera de los reinos de seres vivos. Células eucarióticas preferidas incluyen células de protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células hospedadoras incluyen, aunque sin limitación, la línea celular procariótica *E. coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que comprenden un ácido nucleico que codifica anticuerpos IgG modificados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según lo apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, fagómidos, adenovíricos, AAV, lentivíricos, por ejemplo. Las

técnicas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, son bien conocidos en la técnica.

El término "vector", como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se pueden integrar en el genoma de la célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma funcional. Dichos vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

La introducción de dichos ácidos nucleicos en una célula hospedadora puede realizarse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Para células eucarióticas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos. La introducción puede estar seguida por provocar o permitir la expresión desde el ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen. Por ejemplo, el ácido nucleico se integra en el genoma, por ejemplo, cromosoma, de la célula hospedadora. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

Los sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, células de insecto, 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 embrionario humano, por ejemplo, células HEK293, células de retina embrionaria humana y muchas otras. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procarióticas, 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 eucarióticas cultivadas también está disponible para los expertos en la materia, como se revisa en Andersen *et al.* (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13: 117-23, por ejemplo.

En otra realización, los anticuerpos IgG modificados divulgados pueden glucosilarse, de forma natural o por la elección del hospedador de expresión, por ejemplo, células CHO, HEK293 o NSO (ECACC 85110503), o pueden ser aglucosilados, por ejemplo, si se producen por la expresión en una célula procariótica. La glucosilación también puede alterarse intencionadamente, por ejemplo, inhibiendo la fucosilación, para aumentar la actividad ADCC de los anticuerpos IgG modificados resultantes.

Métodos de uso de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

La presente invención se refiere a la proteína de unión a TGFβ1 aislada para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica seleccionada de glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis de pulmón, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis. Los métodos de tratamiento mencionados en este documento no forman parte de la invención y se divulgan con fines de referencia únicamente. Los anticuerpos IgG modificados pueden usarse en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano, que comprende administrar una cantidad eficaz para tratar al paciente. Las afecciones tratables incluyen cualquiera en que TGFβ1 desempeñe una función, por ejemplo, una enfermedad fibrótica, cáncer, una enfermedad mediada por el sistema inmunitario y curación de heridas, por ejemplo, esclerosis generalizada difusa, enfermedad del remodelado óseo, nefropatía y/o una combinación de las mismas.

Los anticuerpos específicos para TGFβ1 humano han demostrado ser eficaces en modelos animales para el tratamiento de glomerulonefritis por TGFβ1 (Border *et al.* (1990) Nature 346: 371-374), cicatrización neural (Logan *et al.* (1994) Eur. J. Neurosci. 6: 355-363), cicatrización dérmica (Shah *et al.* (1992) Lancet 339: 213-214; Shah *et al.* (1994) J. Cell Science 107: 1137-1157; Shah *et al.* (1995) J. Cell Science 108: 985-1002) y fibrosis pulmonar (Giri *et al.* (1993) Thorax 48: 959-966). Además, los anticuerpos contra TGFβ1, 2 y 3 han demostrado ser eficaces en modelos de fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por radiación (patente de Estados Unidos n.º 5.616.561.), mielofibrosis, quemaduras, contractura de Dupuytren, úlceras gástricas y artritis reumatoide (Wahl *et al.* (1993) Exp. Medicine 177: 225-230).

Los anticuerpos IgG modificados son útiles para tratar una enfermedad y afección resultante directa o indirectamente de la actividad de TGFβ1. Los anticuerpos IgG modificados pueden inhibir selectivamente la actividad de una isoforma TGFβ1 humana *in vitro* o *in vivo*. Las actividades de isoformas TGFβ1 incluyen, aunque sin limitación, señalización mediada por TGFβ, depósito de la matriz extracelular (ECM), inhibición de proliferación de células epiteliales y endoteliales, promoción de la proliferación de músculo liso, inducción de la expresión de colágeno de tipo III, inducción de la expresión de TGF-β, fibronectina, VEGF e IL-11, unión del péptido asociado a latencia, inmunosupresión inducida por tumor, promoción de angiogénesis, activación de miofibroblastos, promoción de metástasis e inhibición de la actividad de linfocitos NK. Por ejemplo, los anticuerpos IgG modificados son útiles para tratar la glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS), fibrosis hepática (HF), infarto de miocardio agudo (AMI), fibrosis pulmonar idiopática (IPF), esclerodermia (SSc) y síndrome de Marfan.

Los anticuerpos IgG modificados son útiles para tratar enfermedades y afecciones que incluyen, aunque sin limitación, enfermedades fibróticas (tales como glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis de los pulmones, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis), quemaduras, enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades inflamatorias (incluyendo artritis reumatoide), rechazo de trasplantes, cáncer, contractura de Dupuytren y úlceras gástricas. Los anticuerpos IgG modificados también son útiles para tratar, prevenir y reducir el riesgo de aparición de insuficiencias renales incluyendo, aunque sin limitación: nefropatía diabética (de tipo I y tipo II), nefropatía inducida por radiación, nefropatía obstructiva, esclerosis generalizada difusa, fibrosis pulmonar, rechazo de aloinjertos, nefropatía hereditaria (por ejemplo, poliquistosis renal, espongirosis medular renal, riñón en herradura), glomerulonefritis, nefroesclerosis, nefrocalcinosis, lupus eritematoso diseminado, síndrome de Sjogren, enfermedad de Berger, hipertensión sistémica o glomerular, nefropatía tubulointersticial, acidosis tubular renal, tuberculosis renal e infarto renal. En particular, los anticuerpos IgG modificados son útiles cuando se combinan con antagonistas del sistema de renina-angiotensina-aldosterona incluyendo, aunque sin limitación: inhibidores de renina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas del receptor Ang II (también conocidos como "bloqueantes del receptor Ang II") y antagonistas de aldosterona. A modo de ejemplo, se exponen métodos para usar anticuerpos IgG modificados en combinación con dichos antagonistas en el documento WO 2004/098637.

Los anticuerpos IgG modificados también son útiles para tratar enfermedades y afecciones asociadas con el depósito de ECM, incluyendo, esclerosis generalizada, adhesiones posoperatorias, cicatrización queloide e hipertrófica, vitreorretinopatía proliferativa, cirugía para drenaje de glaucoma, lesión de la córnea, cataratas, enfermedad de La Peyronie, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, cirrosis hepática, cicatrización posterior a infarto de miocardio, reestenosis tras angioplastia, cicatrización después de hemorragia subaracnoidea, esclerosis múltiple, fibrosis después de laminectomía, fibrosis después de reparación de tendón y otras reparaciones, cicatrización debido a eliminación de tatuaje, cirrosis biliar (incluyendo colangitis esclerosante), pericarditis, pleuritis, traqueostomía, lesión penetrante del sistema nervioso central, síndrome miálgico eosinofílico, reestenosis vascular, enfermedad venooclusiva, pancreatitis y artropatía psoriásica.

Los anticuerpos IgG modificados son útiles además para promover la reepitelialización en enfermedades y afecciones tales como úlceras venosas, úlceras isquémicas (úlceras por presión), úlceras diabéticas, sitios de injerto, sitios donadores de injerto, abrasiones y quemaduras, enfermedades del epitelio bronquial, tales como asma, ARDS, enfermedades del epitelio intestinal, tales como mucositis asociada con tratamiento citotóxico, úlceras esofágicas (enfermedad de reflujo), úlceras de estómago, lesiones del intestino delgado y el intestino grueso (enfermedad inflamatoria del intestino).

Los anticuerpos IgG modificados también pueden usarse para promover la proliferación de células endoteliales, por ejemplo, en la estabilización de placas ateroscleróticas, promoción de curación de anastomosis vascular, o para inhibir la proliferación de células del músculo liso, tal como en arteriopatía, reestenosis y asma.

Los anticuerpos IgG modificados son útiles para potenciar la respuesta inmunitaria a infecciones mediadas por macrófagos. También son útiles para reducir la inmunosupresión provocada, por ejemplo, por tumores, SIDA o enfermedades granulomatosas. Los anticuerpos IgG modificados son útiles para tratar enfermedades hiperproliferativas, tales como cánceres, incluyendo, aunque sin limitación, cáncer de mama, próstata, ovario, estómago, renal, pancreático, colorrectal, de piel, pulmonar, cervicouterino y de vejiga, glioma, mesotelioma, así como diversas leucemias y sarcomas, tales como sarcoma de Kaposi, y son útiles para tratar o prevenir recidivas o metástasis de dichos tumores. Los anticuerpos IgG modificados también son útiles para inhibir las metástasis mediadas por ciclosporina.

En el contexto del tratamiento contra el cáncer, "tratamiento" incluye cualquier intervención médica que provoque ralentización del crecimiento del tumor o reducción en las metástasis del tumor, así como remisión parcial del cáncer para prolongar la esperanza de vida de un paciente.

Los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo IgG modificada o composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo IgG modificado. Los anticuerpos IgG modificados pueden usarse en la fabricación de un medicamento para administración. Por ejemplo, un método de preparación de un medicamento o composición

farmacéutica comprende formular un anticuerpo IgG modificado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición puede administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos, simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar.

La administración es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o afección particular. La cantidad real administrada, y la tasa y evolución temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad o afección que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre dosificación, etc., puede determinarse basándose en estudios preclínicos y clínicos, cuyo diseño pertenece al nivel de habilidades en la técnica.

La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo IgG modificado es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y ubicación de la zona a tratar, y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula fijada al anticuerpo IgG modificado. Una dosis típica de un anticuerpo IgG modificado, por ejemplo, puede ser en el intervalo de 100 µg a 1 gramo para aplicaciones sistémicas, y 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. La dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes. Los tratamientos pueden repetirse diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, mensualmente o a otros intervalos, a criterio del médico. El tratamiento puede ser periódico, y el periodo entre administraciones es aproximadamente dos semanas o más, preferiblemente aproximadamente tres semanas o más, más preferiblemente aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes.

En una realización, pueden ser útiles y seguros en seres humanos niveles de dosis de aproximadamente 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 15 mg o 20 mg de los anticuerpos divulgados por kg de peso corporal del paciente. Por ejemplo, 0,5-5 mg/kg en rata y ratón ha sido una dosis eficaz en un entorno agudo. Por lo tanto, para dosificación a largo plazo, puede administrarse 0,3-10 mg/kg a seres humanos, basándose en una semivida esperada de 21 días. Las dosis pueden ser suficientes para la eficacia, mientras sean suficientemente bajas para facilitar la administración óptima. Por ejemplo, una dosis de menos de 50 mg facilita la administración subcutánea. Puede usarse administración intravenosa como vía de administración para enfermedades graves, donde pueden requerirse dosis altas y los intervalos de dosificación largos. La inyección subcutánea puede aumentar la posible respuesta inmunitaria a un producto. La administración local para enfermedad localizada puede reducir la cantidad de producto administrado y aumentar la concentración en el sitio de acción, lo que puede mejorar la seguridad.

Los anticuerpos IgG modificados pueden administrarse por inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intracavidad (por ejemplo, después de resección tumoral), intralesión, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos IgG modificados también pueden administrarse por inhalación o por vía tópica (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas, sobre la piel), o por vía oral.

Un anticuerpo IgG modificado habitualmente se administrará en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo IgG modificado. Por tanto, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser atóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. Dichos materiales podrían incluir, por ejemplo, todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, glúcidos, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o sustancias auxiliares, tales como agentes emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o eficacia.

La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración. Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio afectado, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que se apirógena y tiene pK, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los expertos en la materia serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer e inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Un anticuerpo IgG modificado puede formularse en formas líquidas, semisólidas o sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración, la aplicación terapéutica, las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la vía de administración. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o una combinación de excipientes, por ejemplo: glúcidos, aminoácidos y tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir una amplia gama de concentraciones y pH de los anticuerpos IgG modificados. Pueden producirse formulaciones sólidas por liofilización, secado por pulverización o secado por tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo.

Las composiciones terapéuticas pueden formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de fármaco elevada. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el anticuerpo IgG modificado en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula de una dispersión, o usando tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

El compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el anticuerpo IgG modificado contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la materia.

Un método de uso de un anticuerpo IgG modificado puede comprender provocar o permitir la unión a TGF β . Dicha unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de un anticuerpo IgG modificado a un paciente, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo, en ELISA, inmunoelctrotransferencia, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad o ensayos celulares, o en métodos terapéuticos basados *ex vivo*, por ejemplo, métodos en que células o líquidos corporales se ponen en contacto *ex vivo* con un anticuerpo IgG modificado y después se administran a un paciente.

Se proporciona un kit que comprende un anticuerpo IgG modificado. El anticuerpo IgG modificado puede marcarse para permitir su reactividad en una muestra a determinar. Pueden emplearse kits en análisis diagnóstico, por ejemplo. Un kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes. Pueden incluirse dentro del kit materiales complementarios para ayudar en o para posibilitar la realización de dicho método.

La reactividad de un anticuerpo IgG modificado en una muestra puede determinarse mediante cualquier medio apropiado, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA). Puede mezclarse antígeno marcado radiactivamente con antígeno sin marcar (la muestra de ensayo) y dejarse unir al anticuerpo IgG modificado. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo unido al anticuerpo IgG modificado. También puede usarse un ensayo de unión competitiva con antígeno no radiactivo, usando un antígeno o un análogo ligado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fosforescente o tinte. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red. Los tintes cromogénicos adecuados incluyen diaminobenzidina.

Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas, tal como microesferas de látex que están coloreadas, son magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológica o químicamente activos que pueden provocar directa o indirectamente señales detectables a observar visualmente, detectar electrónicamente o registrar de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que se desarrollan o cambian los colores o provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de modo que las transiciones electrónicas entre estados de energía provoquen absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas junto con biosensores. Pueden emplearse sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina. Las señales generadas por conjugados de anticuerpo-indicador pueden usarse para obtener datos cuantificables absolutos o relativos de la unión del anticuerpo relevante en las muestras.

También se divulga, pero no forma parte de la presente invención, el uso de un anticuerpo IgG modificado para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición. El anticuerpo IgG modificado puede ligarse a una molécula indicadora, de modo que se produce un cambio físico u óptico en la unión, por ejemplo. La molécula indicadora puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferiblemente medibles. Las moléculas indicadoras pueden ligarse directa o indirectamente, covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace peptídico o no covalentemente. El anticuerpo IgG modificado y un indicador proteínico pueden ligarse mediante un enlace peptídico y expresarse de forma recombinante como una proteína de fusión.

Ejemplos

Ejemplo 1: Anticuerpo IgG4 modificado con aminoácidos adicionales en la región de codo de la cadena ligera

CAT192 es un anticuerpo específico de TGF β 1, pero la mayor parte de su afinidad de unión se perdió cuando se convirtió de un scFv en una IgG4 de longitud completa (figura 1). El subtipo de anticuerpo y los formatos Fc en solitario

no explican este fenómeno, porque el Fab tanto de IgG1 como de IgG4 presentaban afinidad muy baja por TGFβ1. La estrecha unión de scFv a TGFβ1 puede deberse a la alta flexibilidad resultante del conector largo (GGGS)₃ que conecta los dominios Fv de la cadena pesada y ligera. Esta alta flexibilidad puede haberse perdido durante la conversión del scFv en las versiones de Fab o IgG. La baja afinidad de CAT192 se caracterizó mediante una tasa de asociación muy lenta, pero una tasa de disociación también muy lenta. La tasa de asociación y la tasa de disociación lentas sugirieron que la unión entre CAT192 y TGFβ1 puede requerir un posible cambio conformacional que se limitaba por aminoácidos desfavorables en CAT192 (IgG4). Aquí se describen experimentos diseñados para aumentar la flexibilidad/afinidad de las versiones de Fab o IgG del scFv añadiendo aminoácidos adicionales en la región de codón de la cadena ligera, que liga el dominio Fv del anticuerpo al dominio CH1. Más específicamente, se diseñaron mutantes para añadir secuencias de una glicina (G), dos glicinas (GG), dos glicinas y una serina (GGS), tres glicinas y una serina (GGGS), y cuatro glicinas y una serina (GGGGS) en la región de codo de la cadena ligera de tipo silvestre como se muestra a continuación en la tabla 2, con los aminoácidos añadidos subrayados.

Tabla 2: Mutantes de inserción de la región de codo de la cadena ligera de IgG4 modificada

Denominación	Posición	Secuencia de aminoácidos
WT	Región de codo de la cadena ligera	LEIKRTVA (SEQ ID NO: 21)
LC+G	Región de codo de la cadena ligera	LEIK <u>G</u> RTVA (SEQ ID NO: 22)
LC+GG	Región de codo de la cadena ligera	LEIK <u>GG</u> RTVA (SEQ ID NO: 23)
LC+GGS	Región de codo de la cadena ligera	LEIK <u>GGS</u> RTVA (SEQ ID NO: 24)
LC+GGGS	Región de codo de la cadena ligera	LEIK <u>GGGS</u> RTVA (SEQ ID NO: 25)
LC+GGGGS	Región de codo de la cadena ligera	LEIK <u>GGGGS</u> RTVA (SEQ ID NO: 26)
A25S	Fv de la cadena ligera	Ala25→Ser25

El aminoácido n.º 25 de la cadena ligera es una Ala en scFv, pero se cambió a Ser cuando se convertía en IgG4. Por lo tanto, se incluyó un mutante A25S adicional como control para ensayar si cambiar la Ala a Ser afecta a la afinidad del scFv por TGFβ1. El CAT192 de tipo silvestre y las secuencias de ADN y de aminoácidos mutantes se enumeran a continuación.

SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácidos de LC de tipo silvestre de IgG1 CAT192 con la región de codo subrayada:

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQKPGKAPILLIYGTSTL
 QSGVPSRFSGSGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR
TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C

SEQ ID NO: 27: Secuencia codificante de la cadena ligera de CAT192 (IgG1)

atgggctggtcctgcatcatcctgtttctggtggccacagccaccggcgtgcacagcGAGATCGTGCTGACA
 CAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC
 CTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCGGCGACGACCTGGGATGGTATCAGCAGA
 AGCCTGGCAAGGCCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCAGCACACTGCAG
 AGCGGCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACC
 CTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCTG
 CAAGACAGCAACTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGGAAT
 CAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCGCTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGA
 GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAATTCTA
 CCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCG
 GCAACTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC
 TCCCTGTCTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA
 GGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCA
 AGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

CAT192LC+G (LEIKGRTVA)

Directo 5'-ggctggaaatcaagggccgtacggtggccgc-3' (SEQ ID NO: 28)
Complementario 5'-gcggccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID NO: 29)

5 CAT192LC+GG. (LEIKGGRTVA)

Directo 5'-ggctggaaatcaagggccggtacggtggccgc-3' (SEQ ID NO: 30)
Complementario 5'-gcggccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID NO: 31)

CAT192LC+GGS. (LEIKGGSRTVA)

Directo 5'-ggctggaaatcaagggccggtacggtggccgc-3' (SEQ ID NO: 32)
Complementario 5'-gcggccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID NO: 33)

10

CAT192LC+GGGS. (LEIKGGGSRVA)

Directo 5'-ggctggaaatcaagggccggtacggtggccgc-3' (SEQ ID NO: 34)
Complementario 5'-gcggccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID NO: 35)

CAT192LC+GGGGS. (LEIKGGGGSRTVA)

15

Directo 5'-ggctggaaatcaagggccggtacggtggccgc-3' (SEQ ID NO: 36)
Complementario 5'-gcggccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID NO: 37)

Los cinco mutantes de LC CAT192, junto con el mutante A25S y el LC WT se coexpresaron con Fab de HC de CAT192 marcado con His usando el sistema de transfección Expi293F (Life Technologies) en un formato de placa de 24 pocillos (4 × 1 ml). Se recogió el medio acondicionado (CM) 4 días después de la transfección y se usó el instrumento Octet QK384 para calcular el nivel de expresión y la unión a TGFβ1 en un ensayo único. Se usó Fab CAT192-His purificado como curva patrón (diluido 2 veces de 100 a 3,125 µg/ml). El CM de Fab CAT192 se diluyó 1:10 en diluyente y se incluyó CM de Fab GC1008 como control positivo. Se midió la unión de biosensores anti-Fab-CH1 durante 2 min a 1000 rpm y 30 °C de temperatura de placa para la cuantificación y captura. Los sensores entonces se movieron a pocillos que contenían 200 nM de TGFβ1 para la evaluación de la unión.

25

El resultado de unión a TGFβ1 mostró que cada inserción de aminoácido adicional aumentaba la afinidad de unión del Fab CAT192 en comparación con el equivalente WT. La adición de al menos dos glicinas aumentó la afinidad de unión a un nivel comparable al del anticuerpo Fab GC1008. El mutante A25S mostró afinidad de unión débil por TGFβ1, similar a la afinidad del Fab WT y el Fab CAT192 recombinante purificado. Este resultado fue cualitativo porque la cantidad de Fab capturado en los sensores no se normalizó para la concentración o tampón sustraído.

30

Las variantes de Fab de LC de CAT192 entonces se purificaron usando puntas PureSpeed IMAC de Rainin para evaluar de forma precisa la afinidad por TGFβ1 y confirmar la especificidad de isoforma usando resonancia de plasmones superficiales. El medio acondicionado para cada muestra se dividió en cuatro pocillos (~800 µl cada uno) y se añadieron ~200 µl de tampón de equilibrado a cada uno para usar dos puntas de purificación de 1 ml (20 µl de resina) para cada muestra. Se intercambió el tampón de las muestras usando filtros Amicon Ultra en PBS Gibco pH 7,2 después de la etapa de elución para retirar el imidazol. Las concentraciones se midieron por A280 y se cargaron 3,5 µg en un gel de SDS-PAGE con tris-glicina al 4-20 % no reductor y se tiñó con Coomassie para comprobar la pureza. El rendimiento global varió de un 12-42 % del material de partida en CM.

40

Se usó el instrumento Biacore T200 para evaluar la afinidad de unión por TGFβ de Fab WT y de LC mutantes de CAT192 purificados. Se inmovilizaron TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 (124, 125 y 112 UR) en un chip CM5 serie S usando química de amina. Se usó un amplio intervalo de concentración para representar los productos de unión de baja y alta afinidad. Los Fab se diluyeron 3 veces de 270 a 0,37 nM en tampón HBS-EP+. Cada muestra se inyectó por duplicado. La K_D se determinó usando el intervalo de concentración típico con 30 nM como concentración máxima. Los resultados de unión de Biacore fueron de acuerdo con los resultados de Octet descritos anteriormente, concretamente, la adición de aminoácidos en la región de codo de LC de CAT192 mejoró la afinidad de unión por TGFβ1. Se demostró una mejora por etapas con la inserción de cada residuo adicional (figura 6). Ninguno de los mutantes de LC de Fab CAT192 se unió a TGFβ2 o TGFβ3 en las mismas condiciones, lo que demuestra que los mutantes conservaban la selectividad de isoforma, mientras se aumentaba significativamente la unión a TGFβ1. Por lo tanto, los mutantes manipulados en el codo eran un conjunto de variantes novedosas con selectividad de isoforma y unión de alta afinidad a TGFβ1.

50

Tabla 3: K_D de Fab modificados

Muestra	K _D (nM)
Fab WT	n/a

Muestra	K _D (nM)
Fab LC+G	n/a
Fab LC+GG	3,32
Fab LC+GGS	3,76
Fab A25S	n/a

Ejemplo 2: Anticuerpo IgG4 modificado con aminoácidos adicionales en la región de codo de la cadena pesada

Como un seguimiento de los mutantes de la cadena ligera en la región de codo que han mostrado alta afinidad y unión selectiva a TGFβ1, también se diseñaron mutantes para aumentar la flexibilidad/afinidad insertando aminoácidos adicionales en la región de codo de la cadena pesada, que ligaban el dominio Fv del anticuerpo con el dominio CH1. Más específicamente, se diseñaron mutantes para añadir secuencias de una glicina (G), dos glicinas (GG) y cuatro glicinas y una serina (GGGGS) en la región de codo de la cadena pesada de tipo silvestre como se muestra a continuación en la tabla 4, con los aminoácidos añadidos subrayados.

Tabla 4: Mutantes de inserción del codo de la cadena pesada de IgG4 modificada

Denominación	Posición	Secuencia de aminoácidos
WT	Región de codo de la cadena pesada	TVTSSAST (SEQ ID NO: 44)
HC+G	Región de codo de la cadena pesada	TVTSSGST (SEQ ID NO: 45)
HC+GG	Región de codo de la cadena pesada	TVTSSGGST (SEQ ID NO: 46)
HC+GG-ST	Región de codo de la cadena pesada	TVTSSGGS (SEQ ID NO: 47)
HC+GGGGS	Región de codo de la cadena pesada	TVTSSGGGGSS (SEQ ID NO: 48)

HC+GG-ST fue un subproducto inesperado del proceso de mutagénesis por PCR, que añadió las dos glicinas en el codo como se diseñó, pero también había eliminado dos aminoácidos en el extremo de la región de codo, como se confirma por la secuenciación de ADN. Este mutante tenía el mismo número de aminoácidos en la región de codo de la cadena pesada, pero diferente composición de aminoácidos en el conector del codo. Se incluyó como control para comparaciones de caracterización y afinidad.

Cebadores de CAT192 HC+G

Directo (SEQ ID NO: 50) 5'-ccaccgtgacagtgtctgacagcccaac-3'

Complementario (SEQ ID NO: 51) 5'-gctggcgcctccagacactgtcacggtgg-3'

Cebadores de CAT192 HC+GG-ST

Directo (SEQ ID NO: 52) 5'-ccaccgtgacagtatctgacggcagcgccacc-3'

Complementario (SEQ ID NO: 53) 5'-actgacgctgctccgccagacactgtcacgtag-3'

Cebadores de CAT192 HC+GGGGS

Directo (SEQ ID NO: 54) 5'-caccaccctgacagtatctgacgacgacgacacacgcccacga-3'

Complementario (SEQ ID NO: 55) 5'-tgctggcgtgctgcccgcgcgcacactgtcacggtggtg-3'

Cebadores de CAT192 HC+GG

Directo (SEQ ID NO: 529) 5'-caccaccgtgacagtgtctgacgacgagccagca-3'

Complementario (60) 5'-tgctggcgctgccgccagacactgtcacggtggtg-3'

Estos mutantes de HC de CAT192 se coexpresaron con Fab de LC de CAT192 usando el sistema de transfección Expi293F (Life Technologies) en un formato de placa de 24 pocillos (4 × 1 ml). Los medios acondicionados se recogieron 4 días después de la transfección y después se purificaron usando puntas PureSpeed IMAC de Rainin para evaluar de forma precisa la afinidad por TGFβ1.

Se usó el instrumento Biacore T200 para evaluar la afinidad de unión por TGF β de Fab mutantes de CAT192 purificados como se describe en el ejemplo 1. Los resultados mostrados en la figura 6 sugirieron que, como los mutantes en la región de codo de la cadena ligera, la adición de aminoácidos en la región de codo de la cadena pesada de CAT192 también mejoraba la afinidad de unión por TGF β 1. Por ejemplo, el mutante CAT192 HC+GGGS mostró unión de afinidad muy alta a TGF β 1.

Ejemplo 3: Mutantes de combinación de la cadena pesada y ligera

Se crearon mutantes de CAT192 de combinación por cotransfección de ADN que portan mutantes en las regiones de codo tanto de la cadena pesada como de la ligera usando el sistema de transfección Expi293F (Life Technologies) en

un formato de placa de 24 pocillos (4 × 1 ml). Las diferentes combinaciones se enumeran en la tabla 5.

Tabla 5: Diversos mutantes de combinación de la cadena pesada y ligera

WT HC WT LC	WT HC LC+G	WT HC LC+GG	WT HC LC+GGS	WT HC LC+GGGS	WT HC LC+GGGGS
HC+G WT LC	HC+G LC+G	HC+G LC+GG	HC+G LC+GGS	HC+G LC+GGGS	HC+G LC+GGGGS
HC+GG WT LC	HC+GG LC+G	HC+GG LC+GG	HC+GG LC+GGS	HC+GG LC+GGGS	HC+GG LC+GGGGS
HC+GG-ST WT LC	HC+GG-ST LC+G	HC+GG-ST LC+GG	HC+GG-ST LC+GGS	HC+GG-ST LC+GGGS	HC+GG-ST LC+GGGGS
HC+GGGGS WT LC	HC+GGGGS LC+G	HC+GGGGS LC+GG	HC+GGGGS LC+GGS	HC+GGGGS LC+GGGS	HC+GGGGS LC+GGGGS

Los medios acondicionados se recogieron 4 días después de la transfección y después se purificaron usando puntas PureSpeed IMAC de Rainin para evaluar de forma precisa la afinidad por TGFβ1.

Se usó el instrumento Biacore T200 para evaluar la afinidad de unión por TGFβ de Fab mutantes de CAT192 purificados como se describe en el ejemplo 1. Los resultados mostrados en la figura 3 sugirieron que los mutantes de combinación restablecían la unión de alta afinidad a TGFβ1 de CAT192. La afinidad de unión (KD) mediante estos Fab mutantes se enumera en la tabla 6.

Tabla 6: Afinidad de unión por TGFβ1 (KD) de los mutantes de combinación de la cadena pesada y ligera determinada por Biacore

Fab	Antígeno	k_a ($\times 10^5/\text{Ms}$)	k_d ($\times 10^{-4}/\text{s}$)	K_D (nM)
WT HC/WT LC	TGFβ1	n/d	n/d	> 100
WT HC/LC+G	TGFβ1	0,16	10,6	66,5
WT HC/LC+GG	TGFβ1	0,70	5,69	8,1
WT HC/LC+GGS	TGFβ1	0,68	5,95	8,8
WT HC/LC+GGGS	TGFβ1	0,89	5,87	6,6
WT HC/LC+GGGGS	TGFβ1	1,18	5,83	5,0
HC+G/WT LC	TGFβ1	n/d	n/d	n/d
HC+G/LC+G	TGFβ1	1,51	6,32	4,2
HC+G/LC+GG	TGFβ1	2,36	6,64	2,8
HC+G/LC+GGS	TGFβ1	2,27	6,96	3,1
HC+G/LC+GGGS	TGFβ1	2,54	6,93	2,7
HC+G/LC+GGGGS	TGFβ1	2,62	6,90	2,6
HC+GG/WT LC	TGFβ1	0,2	5,3	31,7
HC+GG/LC+G	TGFβ1	1,1	4,9	4,4
HC+GG/LC+GG	TGFβ1	2,2	3,8	1,8
HC+GG/LC+GGS	TGFβ1	1,8	4,3	2,3
HC+GG/LC+GGGS	TGFβ1	2,4	3,7	1,5
HC+GG/LC+GGGGS	TGFβ1	2,2	3,9	1,8
HC+GG-ST/WT LC	TGFβ1	0,85	8,11	9,6
HC+GG-ST/LC+G	TGFβ1	1,31	5,87	4,5
HC+GG-ST/LC+GG	TGFβ1	2,04	6,64	3,3
HC+GG-ST/LC+GGS	TGFβ1	2,11	6,67	3,2
HC+GG-ST/LC+GGGS	TGFβ1	1,47	6,31	4,3
HC+GG-ST/LC+GGGGS	TGFβ1	2,50	7,17	2,9
HC+GGGGS/WT LC	TGFβ1	0,68	5,79	8,5
HC+GGGGS/LC+G	TGFβ1	2,21	6,77	3,1
HC+GGGGS/LC+GG	TGFβ1	2,65	7,27	2,7
HC+GGGGS/LC+GGS	TGFβ1	2,63	7,09	2,7
HC+GGGGS/LC+GGGS	TGFβ1	2,78	7,16	2,6
HC+GGGGS/LC+GGGGS	TGFβ1	2,64	7,44	2,8
GC1008 Fab	TGFβ1	7,11	20,80	2,9
n/d = ninguno detectado				

Se requirieron menos inserciones de aminoácidos cuando se manipulaba la región de codo tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Por ejemplo, el mutante de combinación de "HC+G" y "LC+G" mostró unión de afinidad muy alta a TGFβ1.

Ejemplo 4: Caracterización de afinidad y potencia de variantes de IgG4 de longitud completa

Se generaron mutantes en formato de IgG4 para determinar si la afinidad reobtenida por Biacore puede confirmarse en el ensayo de potencia basado en células A549. El Fab de HC de CAT192 se clonó en la cadena principal de IgG4 de cadena pesada S228P para minimizar la formación de semianticuerpos, y entonces se cotransfectaron células Expi293F con IgG4 CAT192 HC S228P y el mutante de inserción de LC.

Se realizó una transfección de 30 ml en la HC de CAT192 de longitud completa y mutantes de inserción de LC para obtener suficiente material para el bioensayo. Se transfectaron células Expi293F con 30 µg de ADN (15 µg de LC + 15 µg de HC). El medio acondicionado se recogió 4 días después de la transfección y se analizó por Octet usando biosensores de proteína A para obtener aproximadamente 200 µg/ml de expresión. El CM entonces se purificó usando columnas Hi-Trap proteína A HP con una bomba peristáltica. El CM se cargó en cada columna a 0,5 ml/min, se lavó con 25 volúmenes de columna (CV) de NaPi 50 mM, NaCl 25 mM pH 7,1 (2 ml/min), se lavó con 25 CV de succinato de sodio 10 mM pH 6,0 (2 ml/min) y se eluyó en 3 fracciones × 2 ml con succinato de sodio 10 mM pH 3,75 a 1 ml/min (marcadas n.º 1, n.º 2, n.º 3). Los eluidos de proteína A se neutralizaron con NaOH 0,2 M, y se añadió NaCl 0,2 M para una concentración final de NaCl 40 mM. Las muestras entonces se concentraron y se intercambió el tampón a NaPi 50 mM, NaCl 25 mM pH 7,1. Estos eluidos de proteína A del mutante de inserción de HC y LC de IgG4 de CAT192 S228P entonces se procesaron en un gel de Tris glicina al 4-20 % (figura 3) y se compararon por Biacore para la unión a TGFβ1/TGFβ2/TGFβ3 (figura 4). Los resultados de Biacore mostraron que los mutantes de IgG4 de CAT192 purificados de hecho volvían a lograr unión a TGFβ1. Ninguno de los mutantes se unió a TGFβ2 o TGFβ3 (figura 4).

Tabla 7 Afinidad de unión por TGFβ1 (KD) de las variantes de IgG4 de longitud completa determinada por Biacore

Muestra	k_a ($\times 10^5/\text{Ms}$)	k_d ($\times 10^{-4}/\text{s}$)	K_D (nM)
CAT192 IgG4 S228P	n/d	n/d	> 100
CAT192 IgG4 S228P LC+G	0,15	5,26	36,1
CAT192 IgG4 S228P LC+GG	1,0	0,2	0,2
CAT192 IgG4 S228P LC+GGS	0,8	2,2	2,7
CAT192 IgG4 S228P LC+GGGS	0,6	0,6	1,0
CAT192 IgG4 S228P LC+GGGGS	0,6	1,5	2,6
CAT192 IgG4 S228P HC+G	0,5	2,1	4,1
CAT192 IgG4 S228P HC+GG	1,0	2,0	2,2
CAT192 IgG4 S228P HC+GGGGS	1,1	1,5	1,3
CAT192 IgG4 S228P HC+GG/ LC+GG	2,4	0,5	0,2
n/d = ninguno detectado			

Los mutantes de inserción de LC de IgG de CAT192 S228P entonces se caracterizaron en un ensayo de potencia celular de A549 (Rapoza *et al.*, 2006, J Immunol Methods, Vol. 316, pág. 18). Los resultados (figura 5) mostraron que los mutantes de inserción de CAT192 neutralizaron la actividad de TGFβ1, como se demuestra por los efectos inhibidores por los mutantes sobre la producción de IL-11 estimulada por TGFβ1. Parecía que dos glicinas añadidas al codo de la cadena ligera eran suficientes para que CAT192 volviera a lograr eficacia, como se observa en el ensayo de unión Biacore.

Ejemplo 5: Estudio de termoestabilidad

Se realizó fluorimetría diferencial de barrido (DSF) en los mutantes de inserción del codo para determinar la manera en que los aminoácidos adicionales en la región de bisagra de la cadena pesada y cadena ligera afectaban a la termoestabilidad de los mutantes de inserción de Fab de CAT192. El principio básico de DSF es que según aumenta la temperatura, un tinte fluorescente se une a las regiones hidrófobas de la proteína según se despliega, proporcionando un aumento en la señal. Este método puede realizarse con muestra limitada y puede usarse para obtener estabilidad relativa de las muestras de un modo de alto rendimiento. Se usó naranja Sypro como tinte fluorescente. Las condiciones usadas fueron 0,1 mg/ml de proteína, una relación de tinte de 1:4000 y un volumen total de 10 µl. Los resultados mostraron que la estabilidad relativa de los mutantes de inserción de Fab de CAT192 disminuía ligeramente con la adición de glicinas en el codo, teniendo los mutantes menos estables la adición más larga (figura 7). Los valores de T_m se resumen en la figura 7. Los valores de T_m de algunos de los mutantes de cadena más larga no se calcularon debido a su patrón de desplegamiento. La ligera disminución también se observó cuando algunos de los mutantes de la cadena ligera se convirtieron de formato Fab en IgG4 (figura 8).

Ejemplo 6: Determinación de la estructura cristalina de variantes de Fab de CAT192

Se resolvieron las estructuras proteínicas de Fab CAT192 WT y 3 variantes para proporcionar la explicación estructural en cuanto a la manera en que se restablecía la alta afinidad con la flexibilidad aumentada de los dominios variables.

Se realizó una transfección de 150 ml en los mutantes de inserción de Fab de HC y LC de CAT192 para obtener

suficiente material para los estudios de estructura. Se transfectaron células Expi293F con 150 µg de ADN (75 µg de LC + 75 µg de HC). El medio acondicionado se recogió 5 días después de la transfección. El CM entonces se purificó usando columnas His-Trap Excel equilibradas con NaPi 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM. La proteína Fab se eluyó con NaPi 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM y se intercambió inmediatamente el tampón a HEPES 20 mM pH 7,0, NaCl 50 mM usando una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300). Los Fab entonces se concentraron hasta 20 mg/ml y se establecieron tamices de matriz dispersa tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Todos los cristales usados para la determinación de la estructura se obtuvieron a 4 °C en una relación 1:1 de proteína a condición de cristalización. La proteína de tipo silvestre y los mutantes de menor afinidad de unión cristalizaron en un grupo espacial P21 en condiciones de PEG similares (WT: 12 % de PEG 8K/0,1 M de cacodilato de sodio pH 6/0,2 M de MgCl₂, CAT192 WT HC/LC+G: 12 % de PEG 20K/0,1 M de MES pH 6,5, CAT192 HC+GGGG/WT LC: 12 % de PEG 20K, 0,1 M de MES pH 5,75). El mutante de alta afinidad de unión (HC+GG/LC+GG) cristalizó en sulfato de amonio 2 M, acetato de sodio 0,1 M pH 4,6 (grupo espacial: C2).

Las variantes de afinidad de unión baja/moderada y las estructuras de Fab de tipo silvestre (HC+WT/LC+G y HC+GGGG/LC+WT) fueron casi idénticas (figura 9, parte A). HC WT/LC+G y HC+GGGG/LC WT se superpusieron con CAT192 WT con un R.M.S.D de 0,516 Å y 0,538 Å respectivamente. En cada una de estas estructuras, la densidad de electrones para la región CDRH3 se perdió para todas las moléculas en la unidad asimétrica. Esto implicaba que esta CDR era muy flexible para los mutantes de afinidad de unión baja/moderada. En contraste, el mutante de alta afinidad de unión (HC+GG/LC+GG) presentó grandes cambios conformacionales en los dominios variables en comparación con las otras estructuras de Fab de CAT192 (figura 9, parte A). Aunque los dominios constantes entre los cuatro Fab se superpusieron bien, los dominios variables en CAT192 HC+GG/LC+GG se desplazaron significativamente en comparación con las otras estructuras (figura 9, parte B). Además, la región CDR3 de HC estaba completamente estructurada en la estructura de alta afinidad de unión y se estabilizaba por interacción con la CDR3 de LC (<3 Å). Estas cuatro estructuras, de acuerdo con los resultados de Biacore, sugirieron que se requería un gran reordenamiento conformacional para restablecer la alta afinidad de unión de CAT192.

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: Dominio VH de IgG1 humana clon SL15 (SQN4 US6492497)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNLSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPQYSWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 2: Dominio VH de IgG1 humana clon JT182 (SQN10 US6492497)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNLSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPASPDWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 3: Dominio Vk de IgG1 humana clon SL15A: (SQN6 US6492497)

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 4: Dominio Vk de IgG1 humana clon SL15S: (SQN8 US6492497)

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 5: Región de bisagra de IgG1 humana PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

SEQ ID NO: 6: Región Fc de IgG1 humana

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 7

SYGMH

SEQ ID NO: 8

VISYDGSIKYYADSVKG

5 SEQ ID NO: 9

TGEYSGYDTSGVEL

SEQ ID NO: 10

10 TGEYSGYDTPQYS

SEQ ID NO: 11

15 TGFYSGYDTPASPD

SEQ ID NO: 12

RASQGIGDDL

20 SEQ ID NO: 13

GTSTLQS

25 SEQ ID NO: 14

LQDSNYPLT

SEQ ID NO: 15

30 TGX₁YSGYDTX₂X₃X₄X₅X₆

SEQ ID NO: 16: Cadena ligera de CAT192 (IgG4)

EWLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTINSIQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR
TVAAPSIVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
35 C

SEQ ID NO: 17: Cadena pesada de CAT192 (IgG4)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPQYSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

40 SEQ ID NO: 18: Cadena pesada de CAT192 (IgG4) S228P

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPQYSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVD
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 19: CAT191 (scFv)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPQYSWGQGTTVTVSSSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGD
RVITICRSSQGIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTINSLPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 20: TGFβ1 humano

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW
SLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM
IVRSCKCS

SEQ ID NO: 21: Región de codo de LC de tipo silvestre de IgG4 CAT192

LEIKRTVA

SEQ ID NO: 22: Región de codo de LC mutante con 1 aminoácido adicional insertado

LEIKGRTVA

SEQ ID NO: 23: Región de codo de LC mutante con 2 aminoácidos adicionales insertados

LEIKGGRTVA

SEQ ID NO: 24: Región de codo de LC mutante con 3 aminoácidos adicionales insertados

LEIKGGGSRTVA

SEQ ID NO: 25: Región de codo de LC mutante con 4 aminoácidos adicionales insertados

LEIKGGGSSRTVA

SEQ ID NO: 26: Región de codo de LC mutante con 5 aminoácidos adicionales insertados

LEIKGGGGSSRTVA

SEQ ID NO: 27: Secuencia codificante de la cadena ligera de CAT192 (IgG1)

atgggctggctcctcatcatcctgtttctgggtggccacagccaccggcgacacagcGAGATCGTGCTGACA
CAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC
CTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCGGCGACGACCTGGGATGGTATCAGCAGA
AGCCTGGCAAGGCCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCAGCACACTGCAG
AGCGGCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACC
CTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCTG
CAAGACAGCAACTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGGAAAT
CAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGA
GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTA
CCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCG
GCAACTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC
TCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA
GGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCA
AGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 28: CAT192LC+G (LEIKGR TVA), directo

5 5'-ggctggaaatcaagggccgtacggtggccgc-3'

SEQ ID NO: 29: CAT192LC+G (LEIKGR TVA), complementario

5'-gcggccaccgtacggcccttgattccagcc-3'

10 SEQ ID NO: 30: CAT192LC+GG (LEIKGG RTVA), directo

5'-ggctggaaatcaagggcgccgtacggtggccgc-3'

15 SEQ ID NO: 31: CAT192LC+GG (LEIKGG RTVA),
complementario 5'-gcggccaccgtacggccgcttgattccagcc-3'

20 SEQ ID NO: 32: CAT192LC+GGG (LEIKGGS RTVA), directo

5'-ggctggaaatcaagggcgccagccgtacggtggccgc-3'

SEQ ID NO: 33: CAT192LC+GGG (LEIKGGS RTVA), complementario

25 5'-gcggccaccgtacggctgccccttgattccagcc-3'

SEQ ID NO: 34: CAT192LC+GGGS (LEIKGGG S RTVA), directo

5'-ggctggaaatcaagggcgccgagccgtacggtggccgc-3'

30 SEQ ID NO: 35: CAT192LC+GGGS (LEIKGGG S RTVA), complementario

5'-gcggccaccgtacggctgcccgccttgattccagcc-3'

35 SEQ ID NO: 36: CAT192LC+GGGGS (LEIKGGGG S RTVA), directo

5'-ggctggaaatcaagggcgccggcagccgtacggtggccgc-3'

40 SEQ ID NO: 37: CAT192LC+GGGGS (LEIKGGGG S RTVA), complementario

5'-gcggccaccgtacggctgcccgcgccccttgattccagcc-3'

SEQ ID NO: 38: LC de tipo silvestre de IgG1 CAT192

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

45 C

SEQ ID NO: 39: Cadena ligera mutante con 1 aminoácido adicional insertado

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

5 SEQ ID NO: 40: Cadena ligera mutante con 2 aminoácidos adicionales insertados

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

SEQ ID NO: 41: Cadena ligera mutante con 3 aminoácidos adicionales insertados

10

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GSRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID NO: 42: Cadena ligera mutante con 4 aminoácidos adicionales insertados

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GGSRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

15

SEQ ID NO: 43: Cadena ligera mutante con 5 aminoácidos adicionales insertados

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GGGSRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

20

SEQ ID NO: 44: Región de codo de HC de tipo silvestre de IgG4 CAT192

TVTVSSAS

25 SEQ ID NO: 45: Región de codo de HC mutante con 1 aminoácido adicional insertado

TVTVSGSAS

SEQ ID NO: 46: Región de codo de HC mutante con 2 aminoácidos adicionales insertados

30

TVTVSGGSAS

SEQ ID NO: 47: Región de codo de HC mutante con 2 aminoácidos adicionales insertados y un aminoácido eliminado

35

TVTVSGGSA

SEQ ID NO: 48: Región de codo de HC mutante con 5 aminoácidos adicionales insertados

TVTVSGGGGSAS

40

SEQ ID NO: 49: Secuencia codificante de HC de tipo silvestre de IgG4 CAT192

ATGGGCTGGTCTGTCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
 CACTCTGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG
 CAGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCT
 ACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAAGAACTGGAATGGGT
 GGCCGTGATCAGCTACGACGGCAGCATCAAGTACTACGCCGACAGCGTGA
 AGGGCCGGTTACCATCTCCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTG
 CAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAG
 AACCGGCGAGTACAGCGGCTACGACACCGACCCTCAGTACTCTTGGGGCC
 AGGGCACCAACCGTGACAGTGTCTAGCGCCAGCACCAAGGGCCCAAGCGTG
 TTCCCTCTGGCCCCCTTGACAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGCCCT
 GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGA
 ACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCAGCCGTGCTGCAG
 AGCAGCGGCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCCAGCAGCTC

 TCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAGAGTGCATCACCACCACCATCAC

5 SEQ ID NO: 50: CAT192HC+G (TVTVSGSSAS), directo

5'-ccaccgtgacagtgtctggcagcgccagc-3'

SEQ ID NO: 51: CAT192HC+G (TVTVSGSSAS), complementario

10

5'-gctggcgctgccagacactgtcacggtgg-3'

SEQ ID NO: 52: CAT192HC+GG-ST (TVTVSGSSA), directo

15 5'-ccaccgtgacagtgtctggcgccagcgccagc-3'

SEQ ID NO: 53: CAT192HC+GG-ST (TVTVSGSSA), complementario

5'-gctggcgctgccgcccagacactgtcacggtgg-3'

20

SEQ ID NO: 54: CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSSAS), directo

5'-caccaccgtgacagtgtctggcgccgcccagcagcgccagca-3'

25 SEQ ID NO: 55: CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSSAS), complementario

5'-tgctggcgctgctgccgcccagacactgtcacggtggtg-3'

SEQ ID NO: 56: Cadena pesada mutante con 1 aminoácido adicional insertado

30

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
 SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
 GYDTPQYSWGQGT TVTVSGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 57: Cadena pesada mutante con 2 aminoácidos adicionales insertados y 2 aminoácidos eliminados

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
 SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
 GYDTPQYSWGQGT TVTVSGSAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP

35

EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 58: Cadena pesada mutante con 5 aminoácidos adicionales insertados

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPQYSWGQGTTVTVSGGGSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 59: CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS), directo

5'-caccaccgtgacagtgtctggcgccagccagca-3'

SEQ ID NO: 60: CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS), complementario

5'-tgctggcgctgccgcccagacactgtcacggtggtg-3'

SEQ ID NO: 61: Cadena pesada mutante con 2 aminoácidos adicionales insertados

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTPQYSWGQGTTVTVSGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a TGFβ1 aislada para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica seleccionada de glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis, en la que la proteína de unión aislada es una IgG, que comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica, una tercera cadena polipeptídica y una cuarta cadena polipeptídica, caracterizado por que
- (a) se añade un conector a dicha primera y segunda cadena polipeptídica, teniendo cada una de ellas la fórmula de, del extremo N al extremo C: (dominio VL)-(conector1)-(dominio CL), o
- (b) se añade un conector a dicha tercera y cuarta cadena polipeptídicas, teniendo cada una de ellas la fórmula de, del extremo N al extremo C: (dominio VH)-(conector2)-(dominio CH1)-(bisagra)-(región Fc), o
- (c) tanto (a) como (b);
- en la que:
- (i) el dominio VL de cada una de la primera y segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y
- (ii) el dominio VH de cada una de la tercera y cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y
- en la que el conector1, cuando está presente, y el conector2, cuando está presente, comprenden el residuo aminoácido o secuencia de aminoácidos seleccionada de la lista que consiste en G, GG, GGS, GGGS y GGGGS.
2. La proteína de unión a TGFβ1 aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que la IgG es de un isotipo de IgG4 humana.
3. La proteína de unión a TGFβ1 aislada para el uso de la reivindicación 2, en la que la IgG4 comprende una mutación S228P (numeración EU).
4. La proteína de unión a TGFβ1 aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que la IgG es de un isotipo de IgG1 humana.
5. La proteína de unión a TGFβ1 aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que cada una de la primera y segunda cadena polipeptídica independientemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 38, 39, 40, 41, 42 o 43.
6. La proteína de unión a TGFβ1 aislada para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5, en la que cada una de la tercera y cuarta cadena polipeptídica independientemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, 18, 56, 57, 58 o 61.
7. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a TGFβ1 aislada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica seleccionada de glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis.

Comparación de la afinidad por TGFβ1 entre scFv (CAT191) e IgG4 (CAT192)

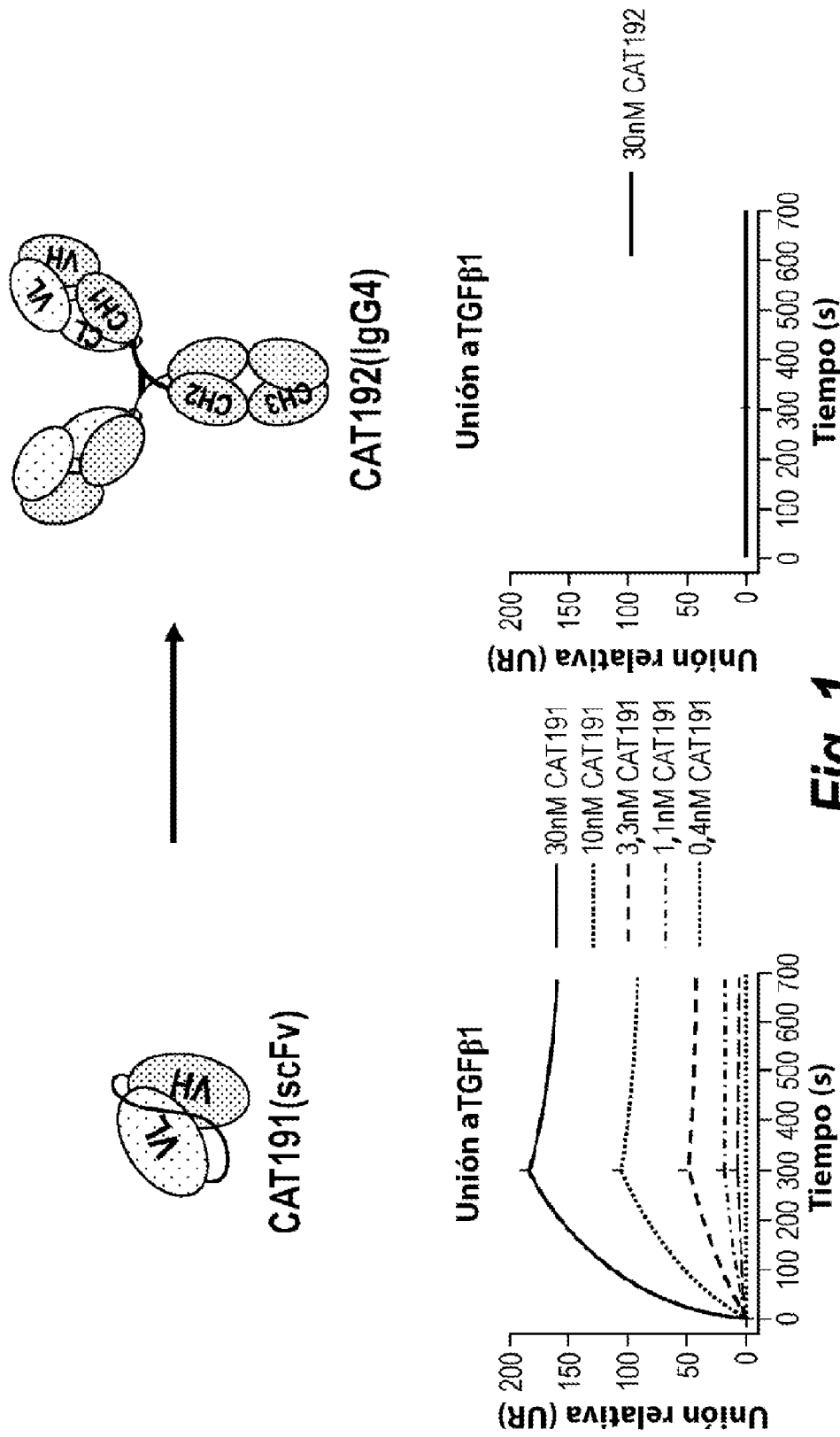


Fig. 1

Comparaciones de elementos estructurales de scFv, Fab e IgG

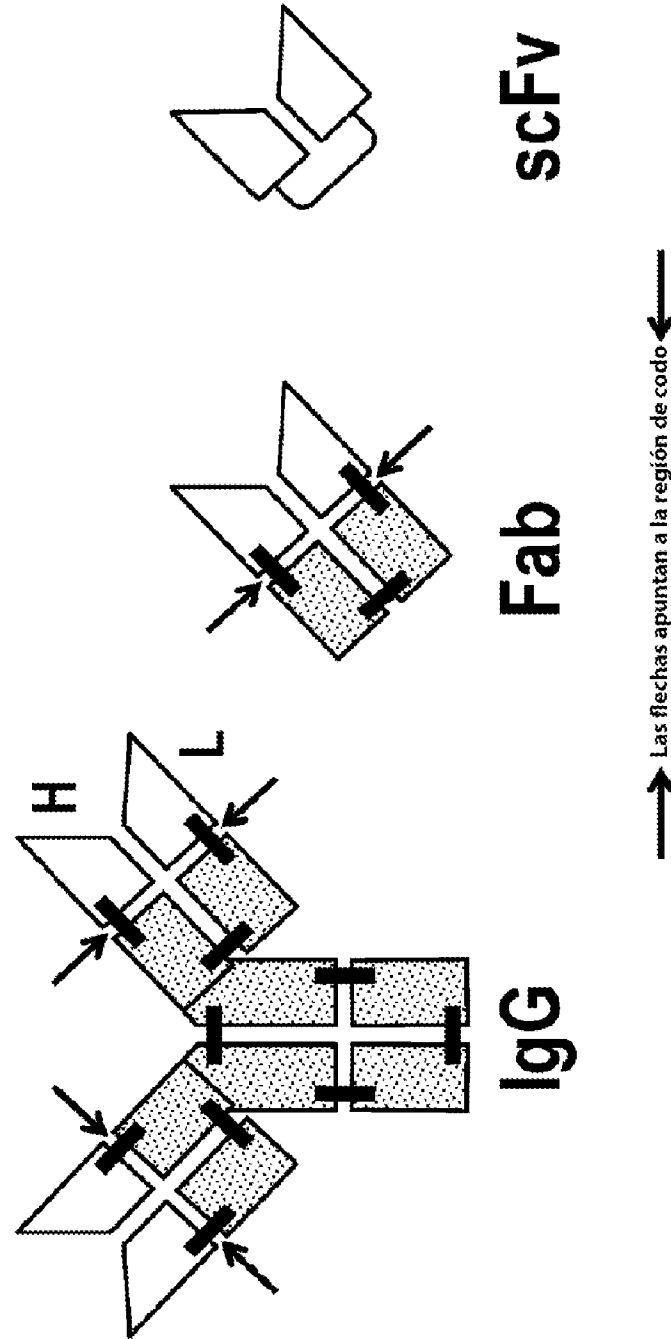


Fig. 2

Electroforesis en gel de SDS-PAGE de mutantes de IgG purificados

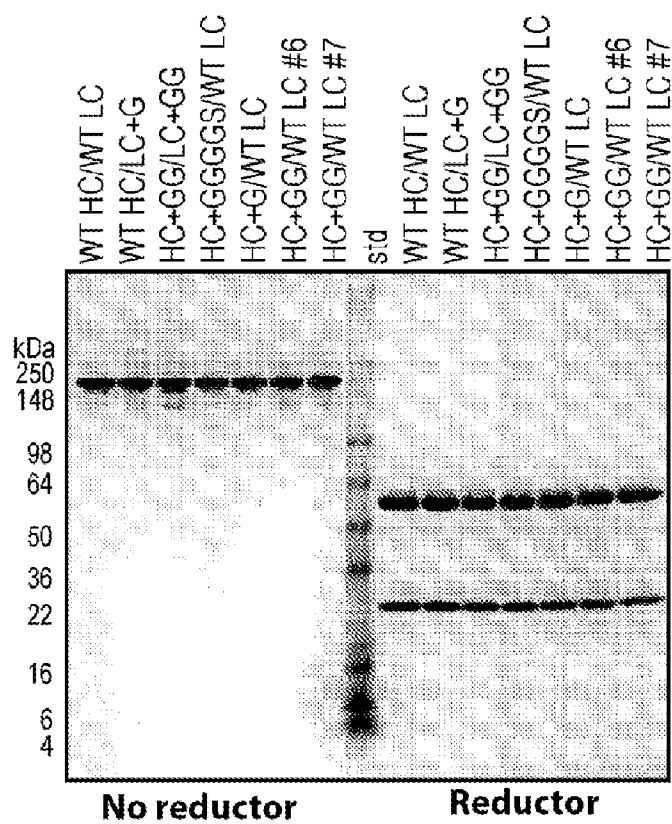
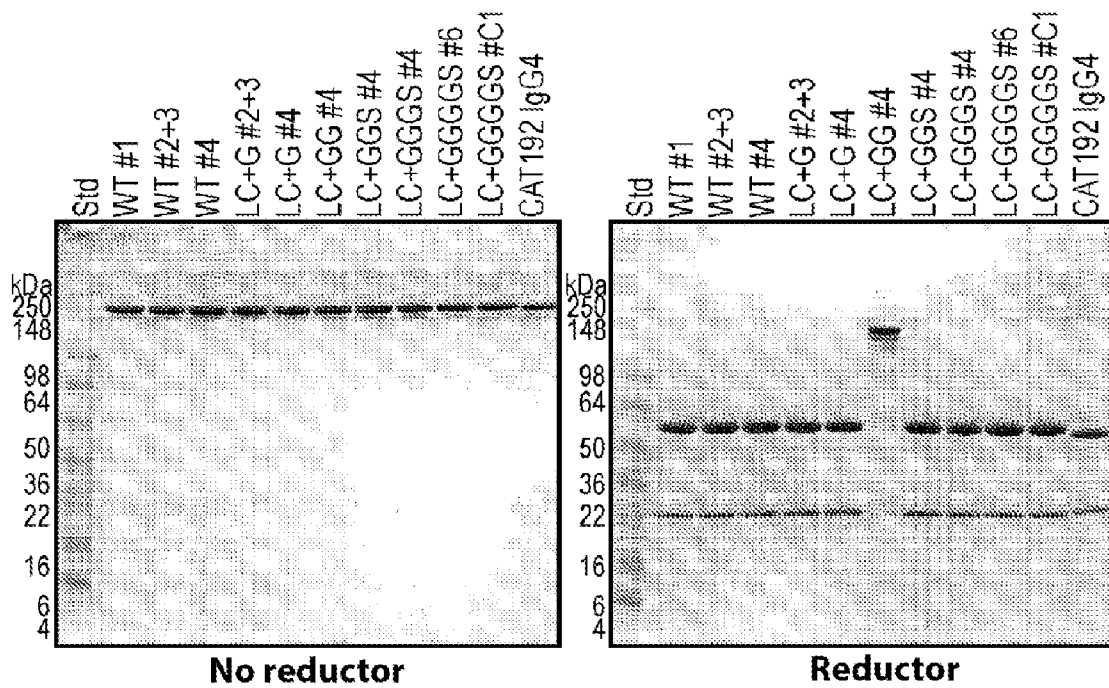


Fig. 3

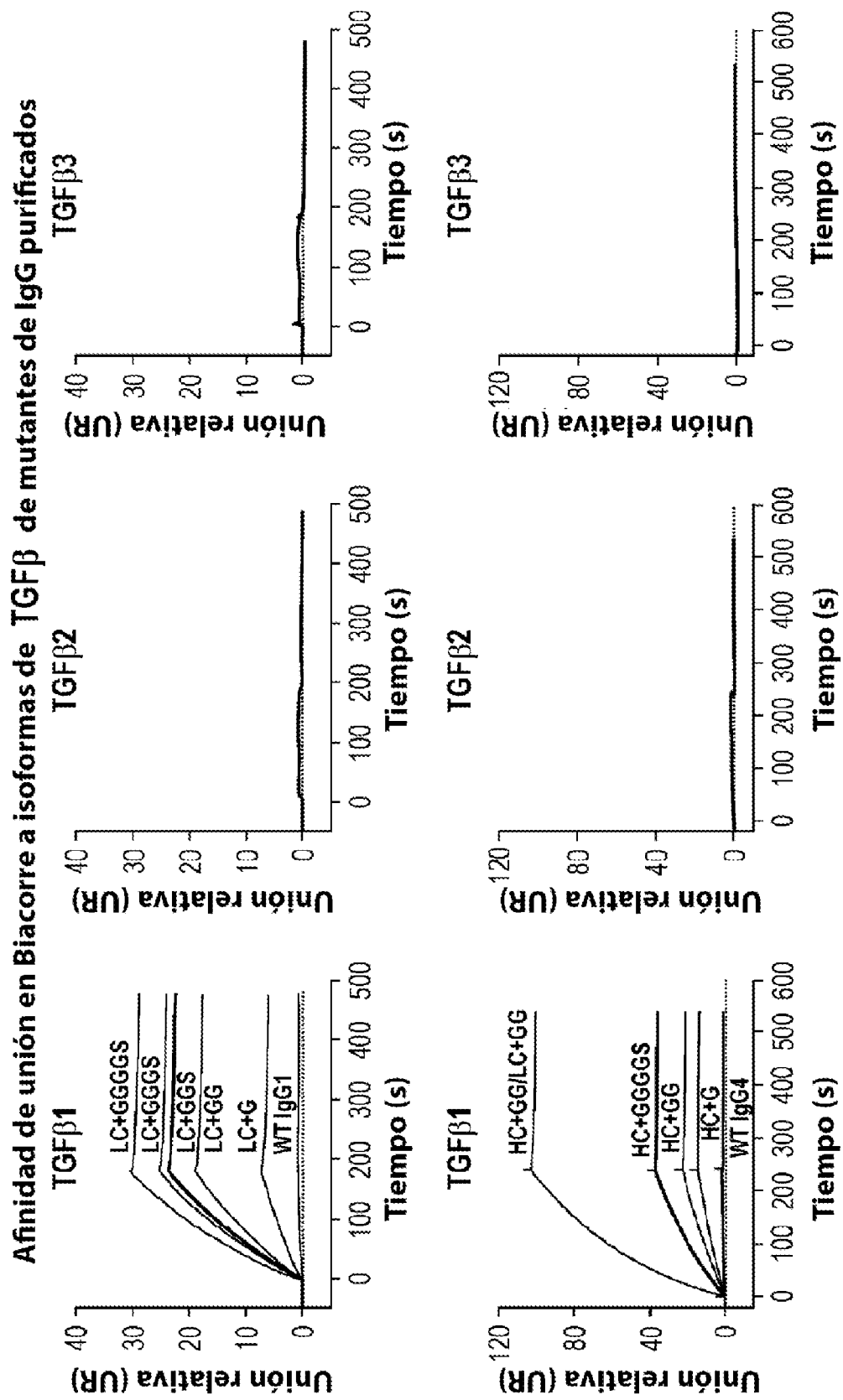


Fig. 4

Ensayo de potencia celular de A549 de mutantes de IgG purificados

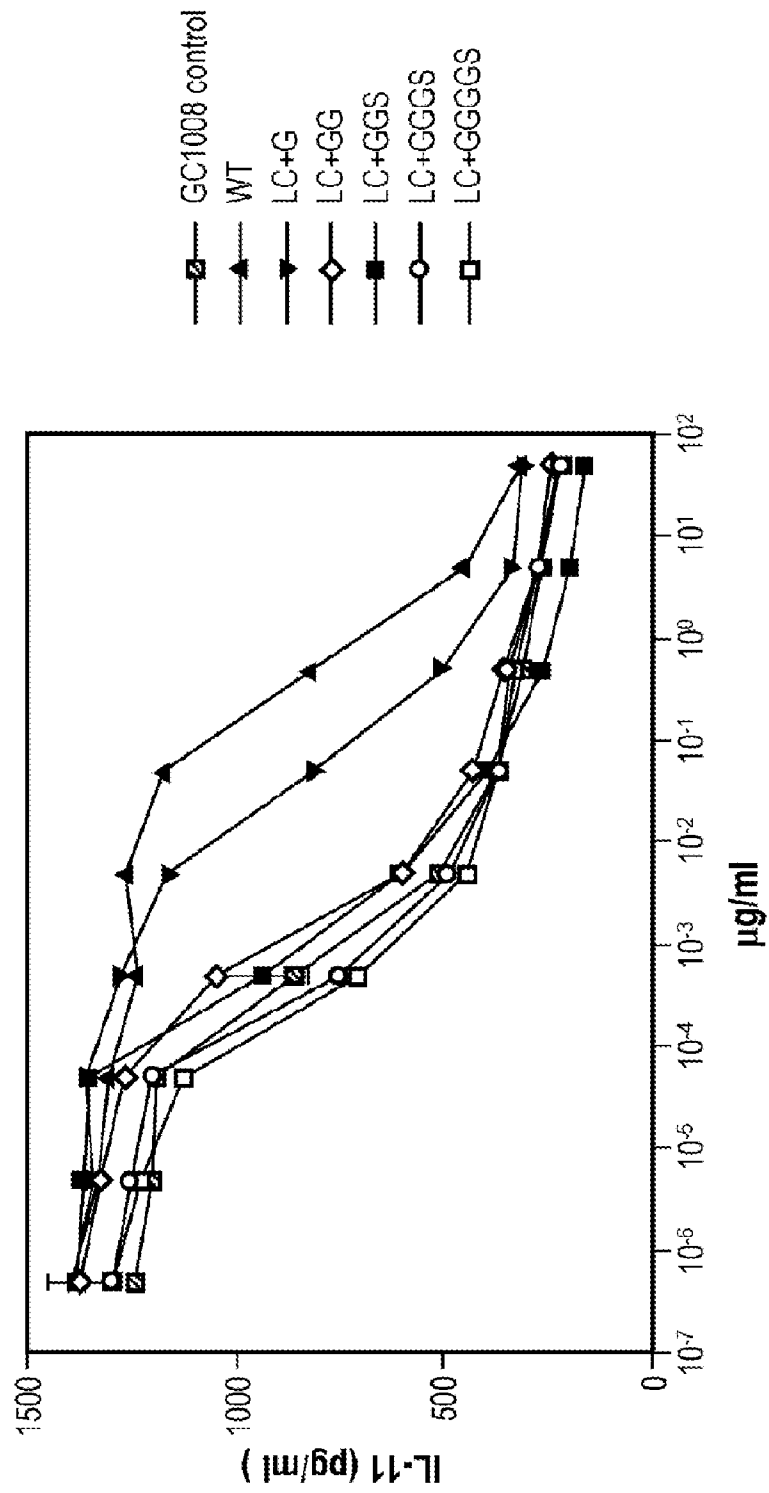
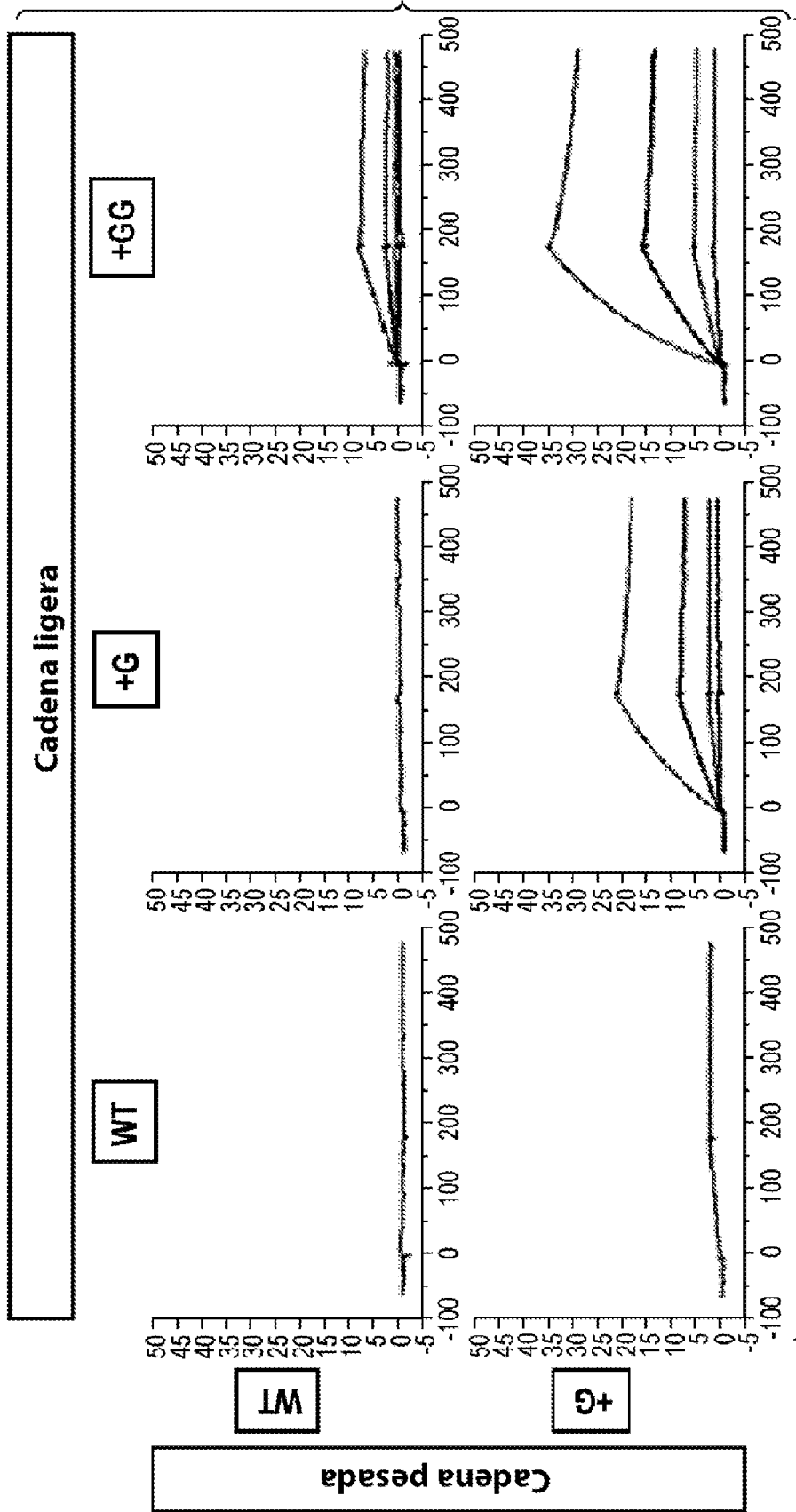


Fig. 5

Resultados de ensayo de unión a TGFβ1 de Biacore de variantes de Fab purificadas



Continuación a lámina 7 de 17

Fig. 6

Continuación a lámina 8 de 17

Resultados de ensayo de unión a TGFβ1 de Biacore de variantes de Fab purificadas

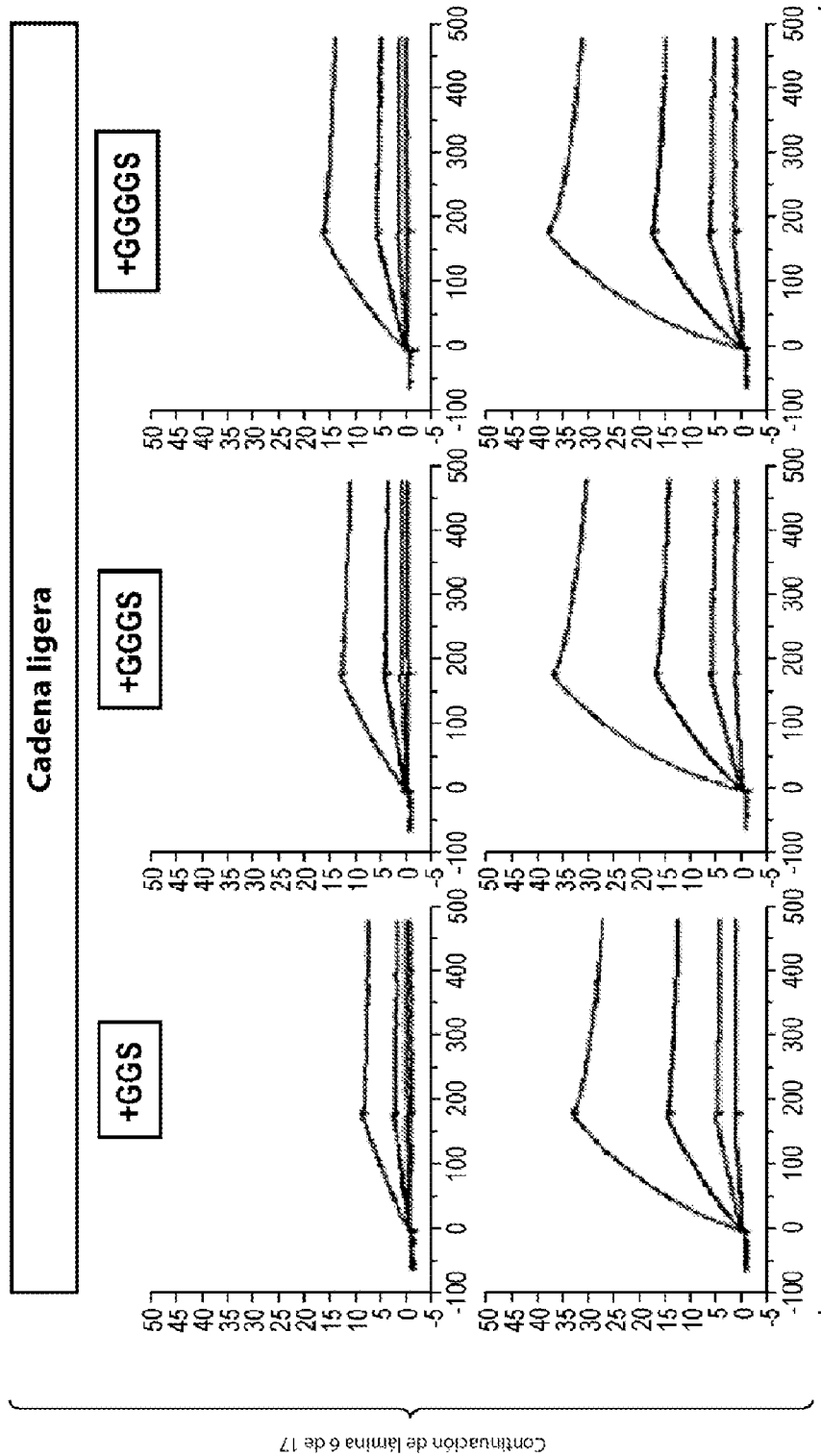
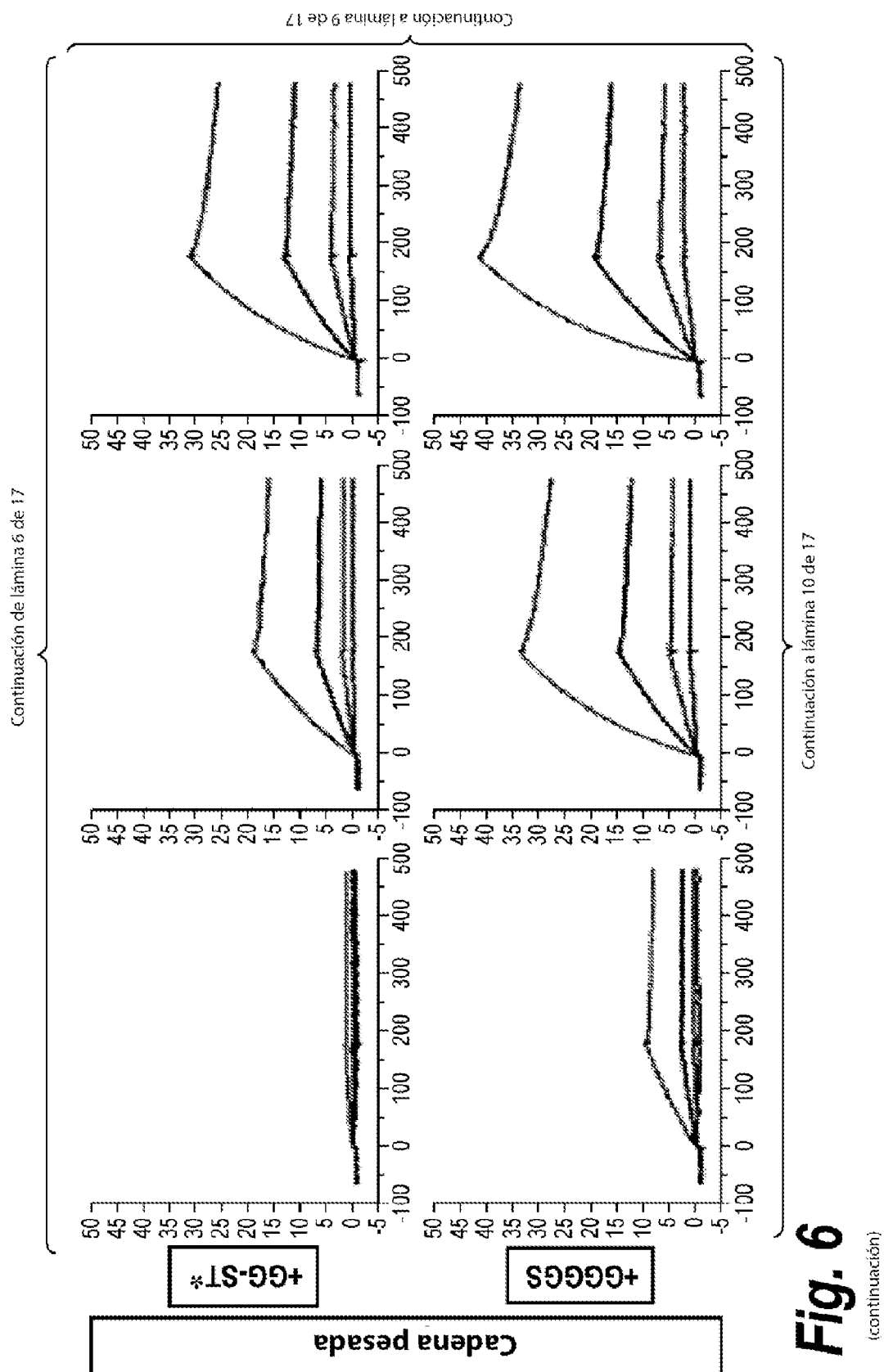


Fig. 6
(continuación)



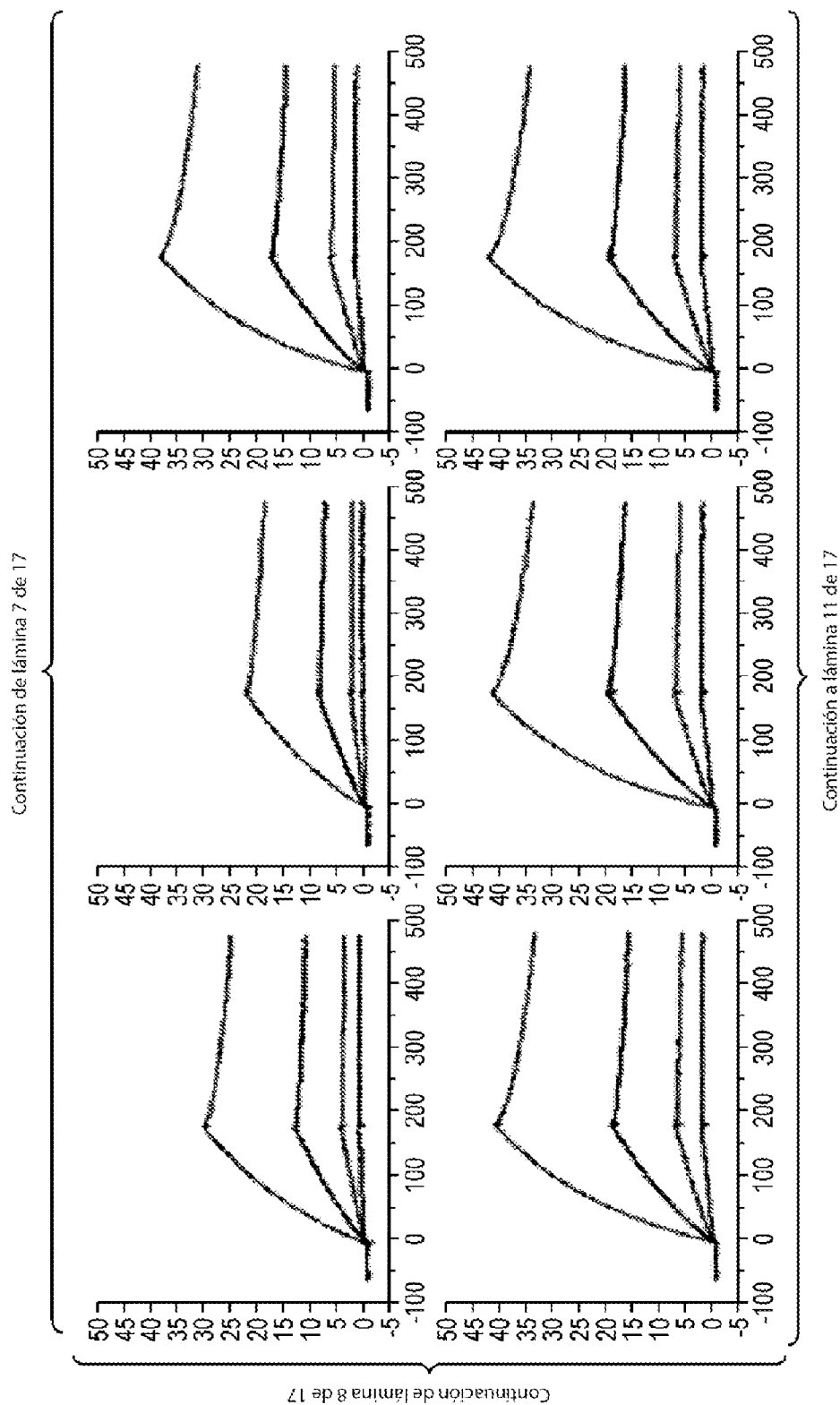
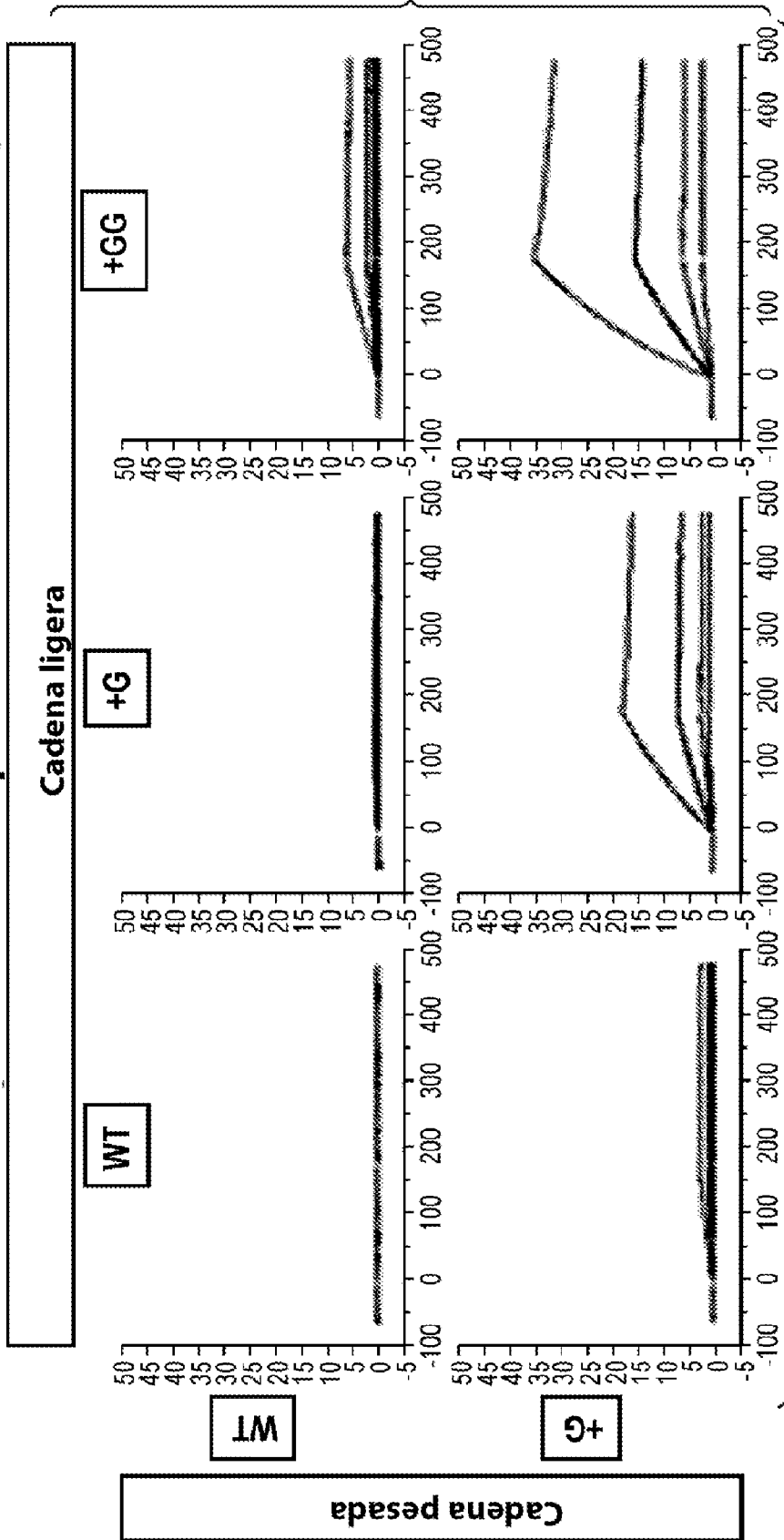


Fig. 6
(continuación)

Continuación de lámina 8 de 17

Resultados de ensayo de unión a TGFβ1 de Biacore de variantes de Fab purificadas



Continuación a lámina 11 de 17

Fig. 6

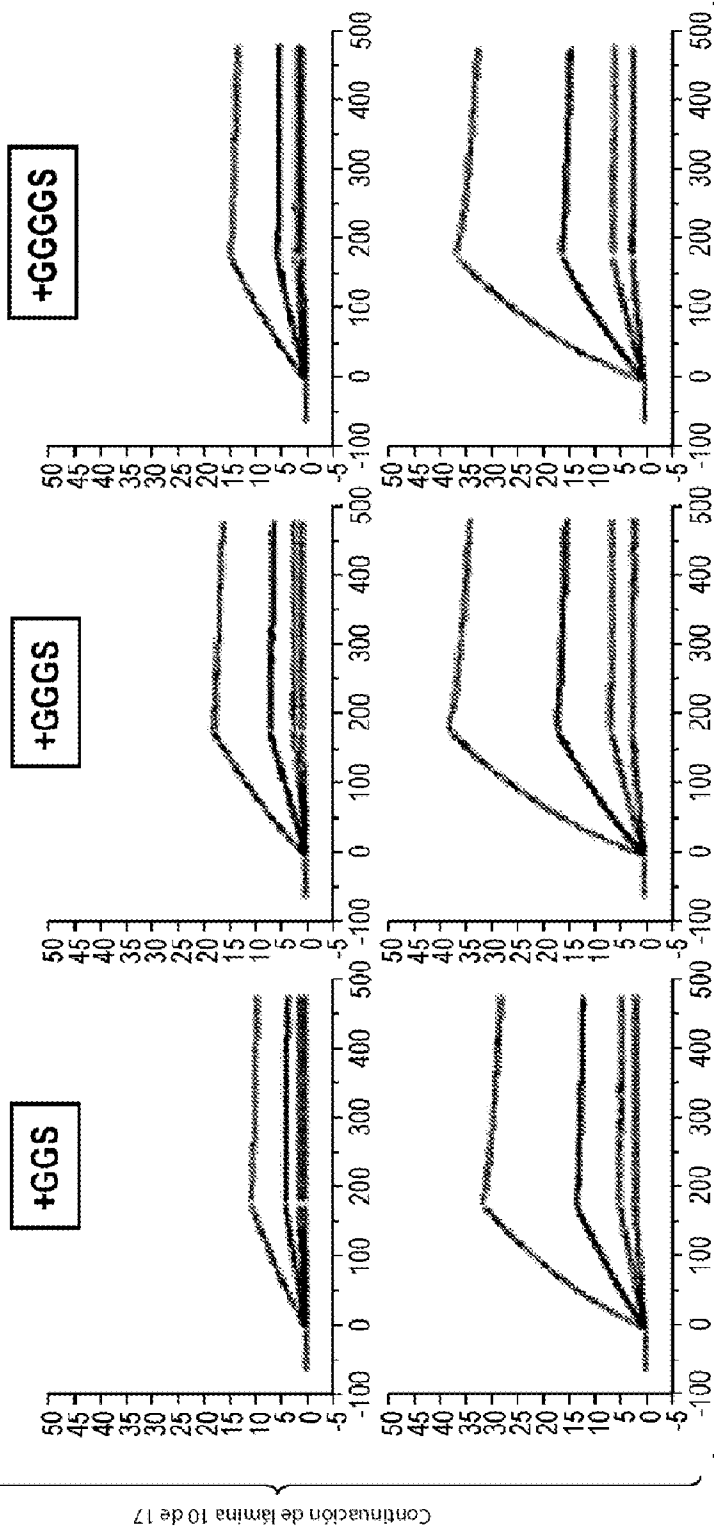
(continuación)

Continuación a lámina 12 de 17

Continuación de lámina 9 de 17

Resultados de ensayo de unión a TGFβ1 de Biacore de variantes de Fab purificadas

Cadena ligera



Continuación de lámina 10 de 17

Continuación a lámina 13 de 17

Fig. 6
(continuación)

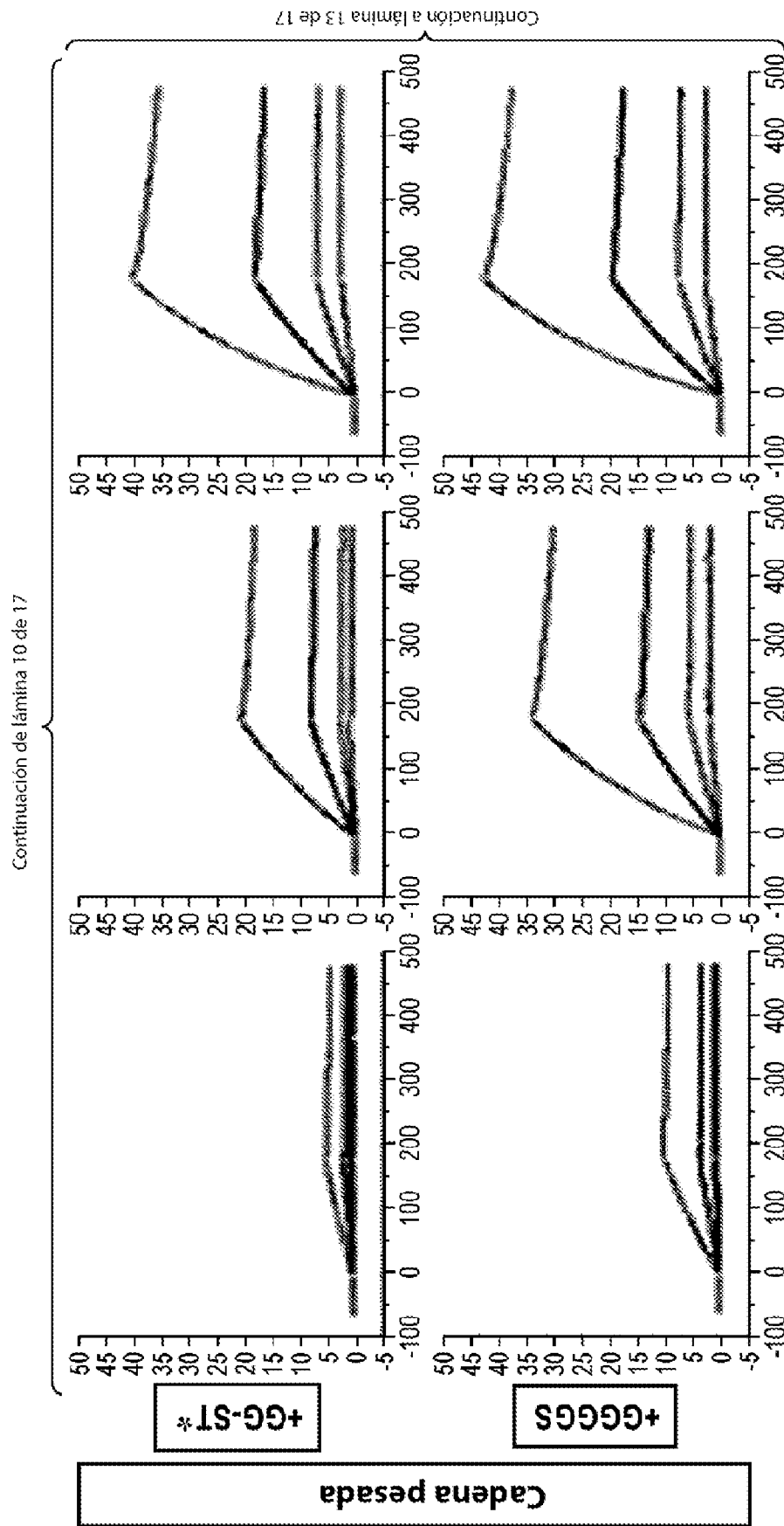


Fig. 6

(continuación)

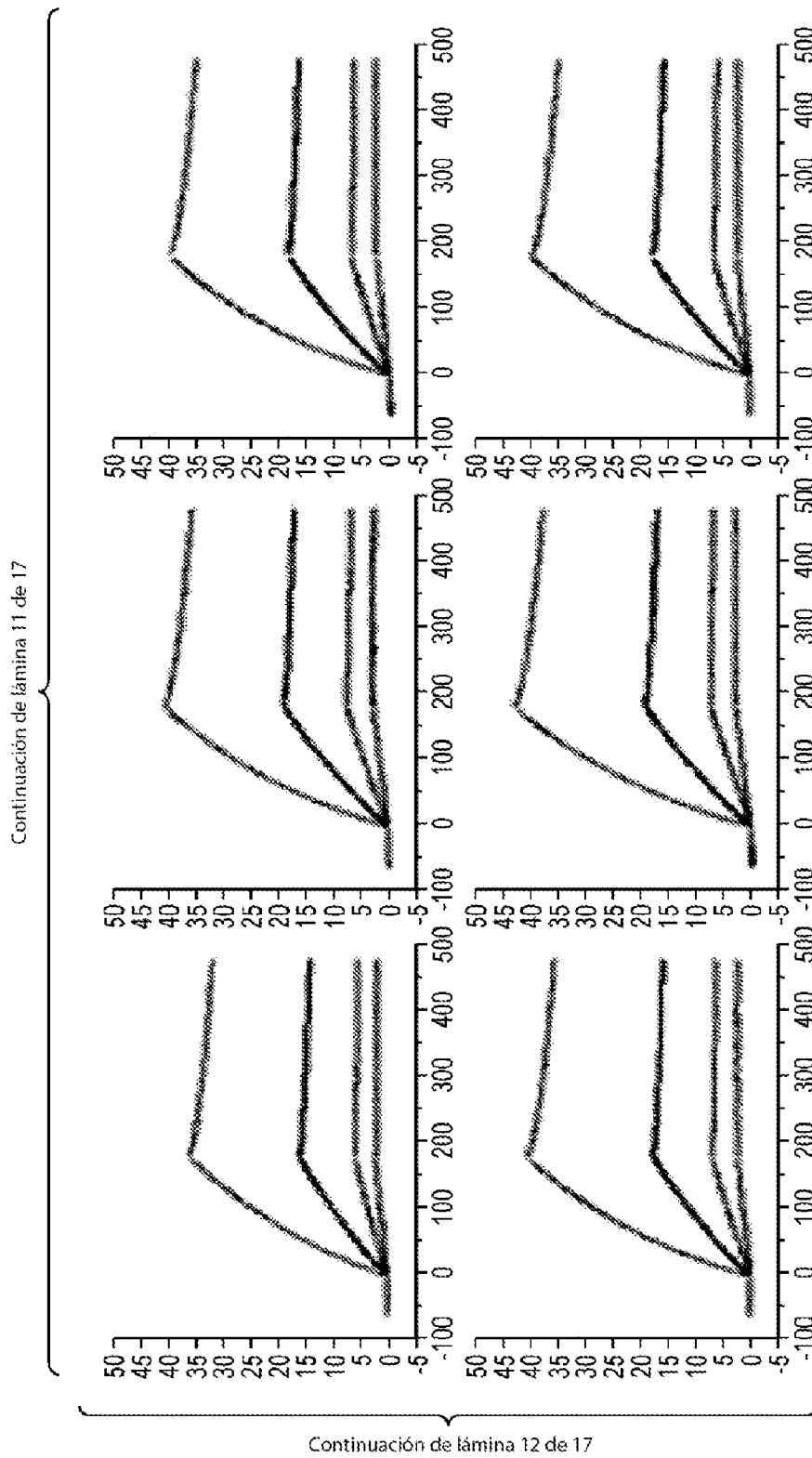


Fig. 6
(continuación)

Resumen de resultados de ensayo de DSF para mutantes de Fab de CAT192

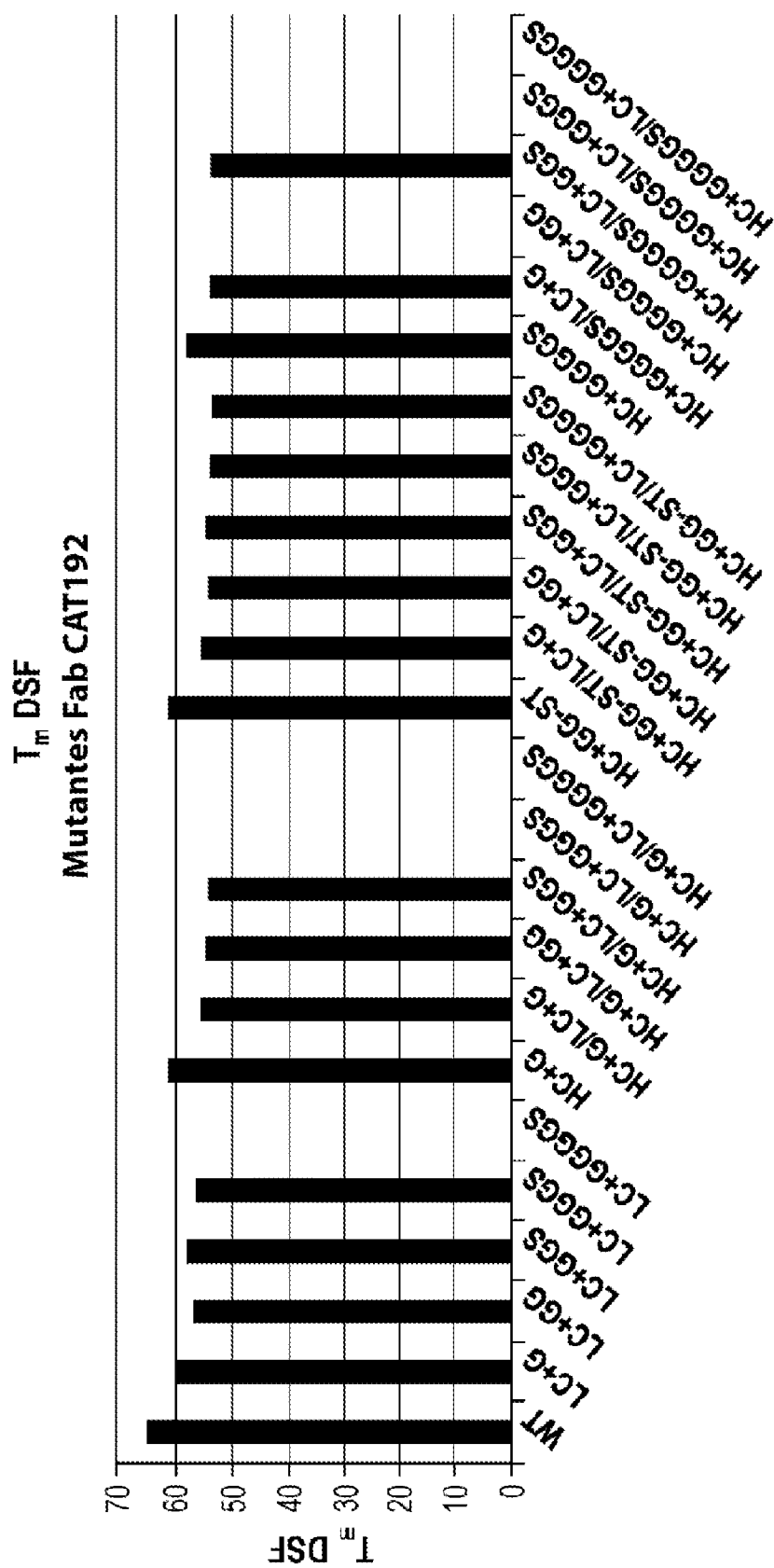
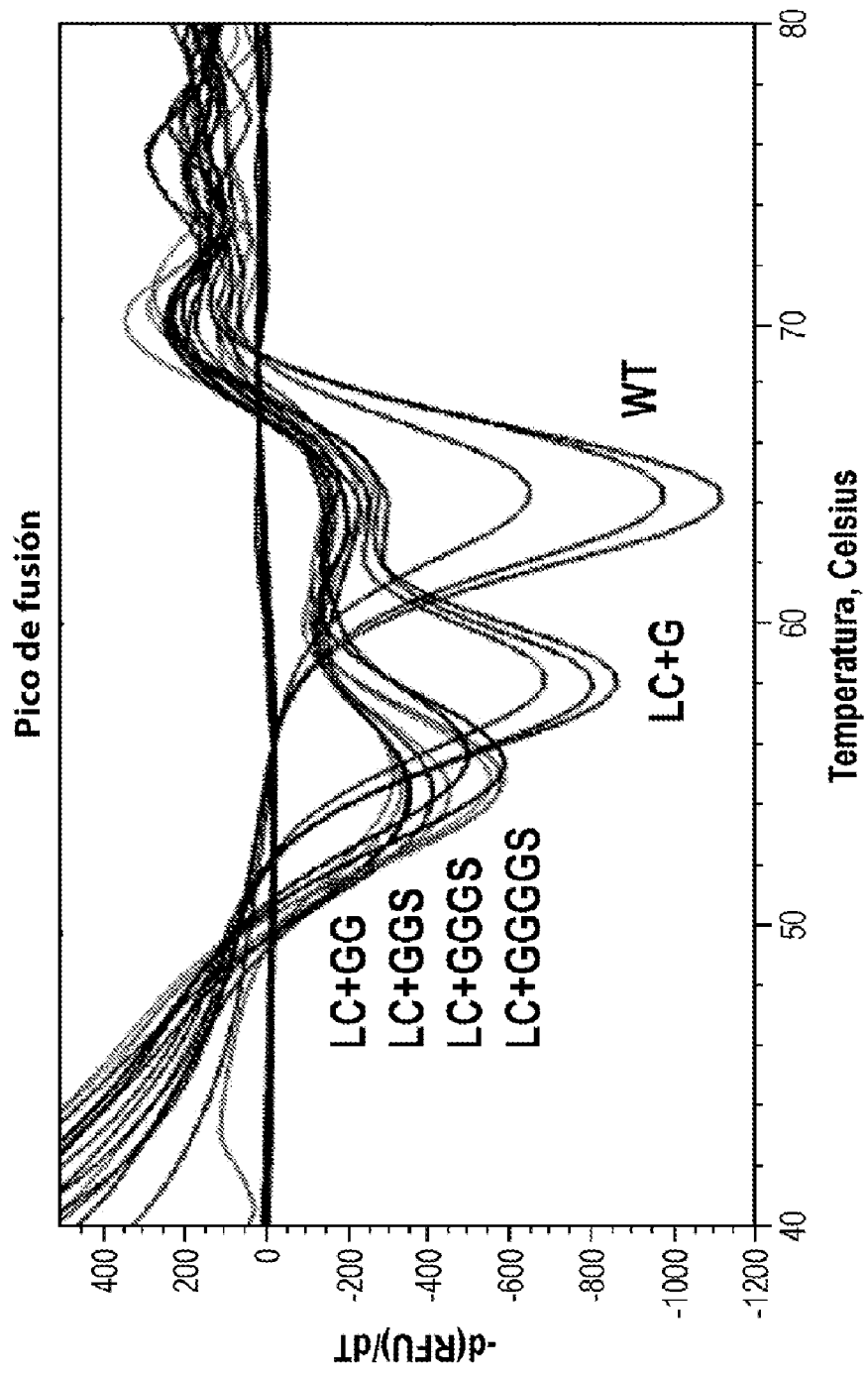


Fig. 7

Resultados de ensayo de DSF para mutantes de IgG4 de CAT192**Fig. 8**

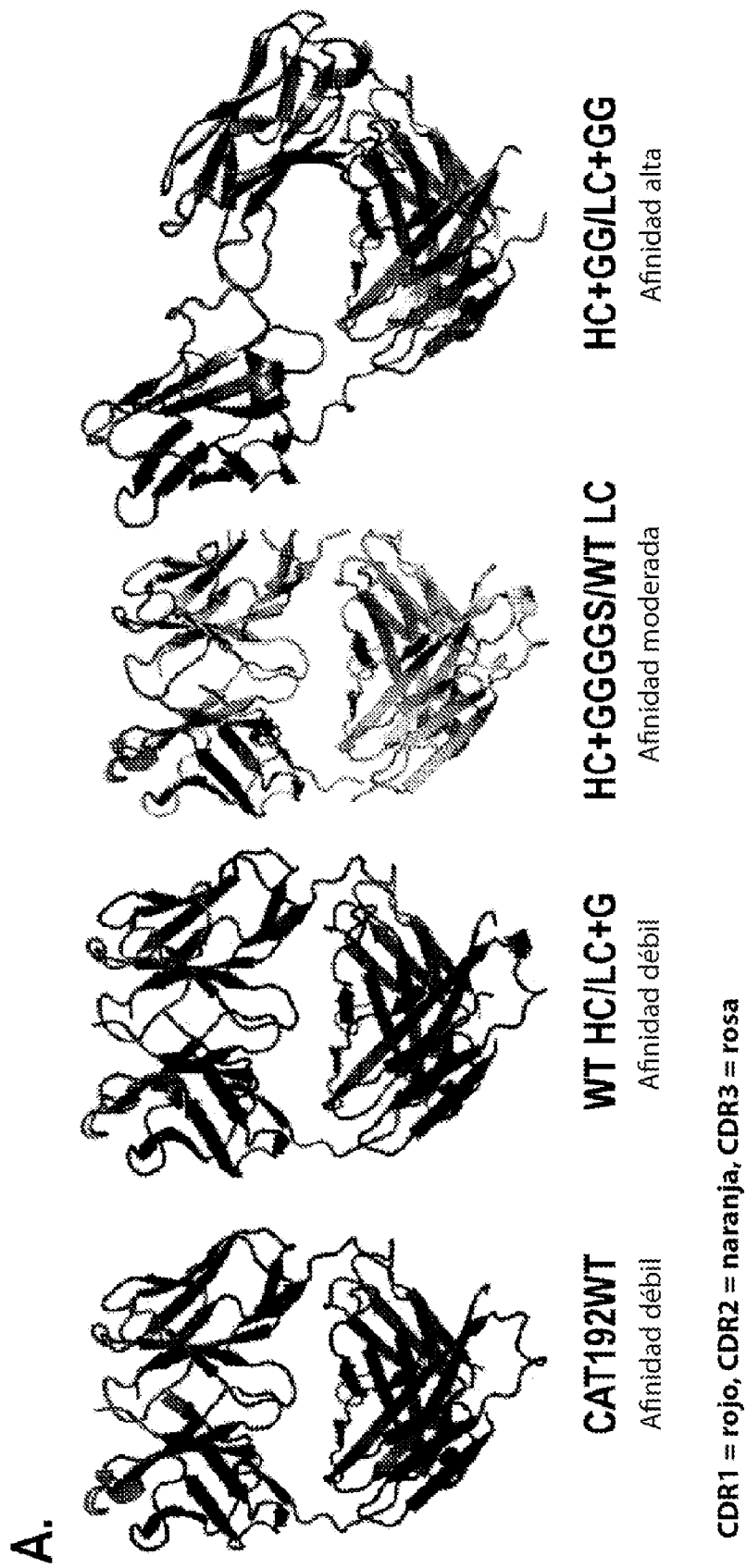


Fig. 9



Fig. 9
(continuación)