

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 894 398**

(51) Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**A61P 9/04** (2006.01)  
**A61P 9/08** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 9/12** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61P 9/14** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012 PCT/US2012/040545**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12167143**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012 E 12792320 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.07.2021 EP 2714735**

---

(54) Título: **Anticuerpos específicos para TGF-β**

(30) Prioridad:

**03.06.2011 US 201161493230 P**

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

**14.02.2022**

(73) Titular/es:

**XOMA TECHNOLOGY LTD. (100.0%)  
2200 Powell Street, Suite 310  
Emeryville, CA 94608, US**

(72) Inventor/es:

**BEDINGER, DANIEL;  
KHAN, SHIREEN, S.;  
MIRZA, AMER;  
NARASIMHA, AJAY, J. y  
TAKEUCHI, TOSHIHIKO**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 894 398 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 específicos para TGF- $\beta$

**5 Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere, en general, a materiales y métodos de anticuerpos específicos para transformar el factor de crecimiento beta (TGF $\beta$ ), que incluyen TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, y dichos materiales para usar en el tratamiento de sujetos que tienen cáncer, una enfermedad, afección o trastorno ocular, fibrosis, incluyendo fibrosis ocular o fibrosis oftálmica, y otras dolencias o trastornos relacionados con la expresión de TGF $\beta$ .

**Antecedentes**

La familia de la proteína beta del factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) consiste en tres isoformas distintas que se encuentran en mamíferos (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3). Las proteínas TGF $\beta$  activan y regulan múltiples respuestas génicas que influencian los estados de enfermedad, incluyendo las dolencias proliferativas celulares, inflamatorias y cardiovasculares. TGF $\beta$  es una citoquina multifuncional denominada originalmente por su capacidad de transformar los fibroblastos normales en células capaces de crecer de forma independiente al anclaje. Las moléculas TGF $\beta$  son producidas principalmente por células hematopoyéticas y células tumorales y pueden regular, es decir, estimular o inhibir, el crecimiento y la diferenciación de células a partir de varios orígenes tisulares normales y neoplásicos (Sporn *et al.*, *Science*, 233: 532 (1986)), y estimular la formación y expansión de diversas células estromales.

Los TGF $\beta$  son conocidos por estar implicados en muchos procesos celulares proliferativos y no proliferativos tales como la proliferación y la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la formación de la matriz extracelular, el desarrollo óseo, la cicatrización de heridas, la hematopoyesis, y las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Véanse, por ejemplo, Pircher *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136: 30-37 (1986); Wakefield *et al.*, *Growth Factors*, 1: 203-218 (1989); Roberts y Sporn, págs. 419-472 en el *Handbook of Experimental Pharmacology* eds M. B. Sporn & A. B. Roberts (Springer, Heidelberg, 1990); Massague *et al.*, *Annual Rev. Cell Biol.*, 6: 597-646 (1990); Singer y Clark, *New Eng. J. Med.*, 341: 738-745 (1999). Además, TGF $\beta$  se usa en el tratamiento y la prevención de enfermedades de la mucosa intestinal (documento WO 2001/24813). TGF $\beta$  es también conocido por tener fuertes efectos inmunosupresores sobre varios tipos de células inmunitarias, incluyendo la inhibición de los linfocitos T citotóxicos (LTC) (Ranges *et al.*, *J. Exp. Med.*, 166: 991, 1987), Espevik *et al.*, *J. Immunol.*, 140: 2312, 1988), linfopoyesis de linfocitos B deprimidos y expresión de la cadena ligera kappa (Lee *et al.*, *J. Exp. Med.*, 166: 1290, 1987), regulación negativa de la hematopoyesis (Sing *et al.*, *Blood*, 72: 1504, 1988), regulación por defecto de la expresión de HLA-DR en células tumorales (Czarniecki *et al.*, *J. Immunol.*, 140: 4217, 1988), e inhibición de la proliferación de linfocitos B activados por antígeno en respuesta al factor de crecimiento de linfocitos B (Petit-Koskas *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 18: 111, 1988). Véase también la Patente de Estados Unidos 7.527.791.

Se han descrito anticuerpos contra TGF $\beta$  en las patentes de Estados Unidos números 7.527.791; 7.927.593; 7.494.651; 7.369.111; 7.151.169; 6.492.497; 6.419.928; 6.090.383; 5.783.185; 5.772.998; 5.571.714; y 7.723.486.

Swati Biswas *et al.*, *Journal Of Clinical Investigation*, Vol. 117, n.º 5, 1 de mayo de 2007, páginas 1305-1313, los documentos US 2006/251658 A1, US 2008/292638 A1, US 2005/276802 A1, Hoefer M *et al.*, *Cancer Immunology And Immunotherapy*, Vol. 41, n.º 5, 1 de enero de 1995, páginas 302-308, Maclellan W R *et al.*, *Annual Review Of Physiology*, Vol. 62, 1 de Enero de 2000, páginas 289-319, divulan cada uno anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  y diversos usos en el tratamiento de enfermedades.

**Sumario de la invención**

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la expresión de TGF $\beta$ . La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. Se proporciona que los anticuerpos descritos en el presente documento puedan tener afinidad diferencial por cualquiera o todas las isoformas TGF $\beta$ . Además, se ha descubierto en el presente documento que los anticuerpos específicos de TGF $\beta$  divulgados modulan de forma inesperada células inmunitarias en tumores (por ejemplo, infiltradas en tumores) y se contemplan para el tratamiento de tumores asociados con la expresión de TGF $\beta$ , así como otras dolencias o trastornos asociados con la expresión de TGF $\beta$ .

La invención proporciona un anticuerpo que se une al factor beta de crecimiento transformante (TGF $\beta$ )1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 19;
- (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 20; y
- (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 21;

(d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 22;

(e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 23; y

5 (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera de inmunoglobulina que se muestra en el SEQ ID NO: 24;

en donde el anticuerpo se une TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 con mayor afinidad que TGF $\beta$ 3 y se une a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 con una Kd de afinidad de  $10^{-9}$  M o menor como se midió mediante resonancia de plasmón superficial o ensayo de exclusión cinética.

10 En algunas realizaciones, se contempla que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 6. En una realización relacionada, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 15 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 6.

En determinadas realizaciones, se han sustituido uno o más aminoácidos marco de la cadena pesada con el(s) correspondiente(s) aminoácido(s) de otra secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano.

20 En una realización, un anticuerpo contemplado en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 8. En una realización relacionada, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura SEQ ID NO: 8. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura SEQ ID NO: 8. En otra realización más, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 8.

30 En algunas realizaciones, un anticuerpo de la divulgación comprende además una región constante de la cadena pesada, en donde la región constante de cadena pesada es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, modificada o sin modificar, un fragmento de las mismas o una combinación de las mismas.

35 En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo en el que uno o más aminoácidos marco de la cadena ligera se han sustituido con el(s) correspondiente(s) aminoácido(s) de otra secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano.

40 En un aspecto, el anticuerpo de la divulgación es XPA.42.089. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.089 en las SEQ ID NOS: 6 y 8, respectivamente.

45 En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende además una región constante de la cadena ligera humana unida a la mencionada región variable de la cadena ligera. En algunas realizaciones, a región constante de la cadena ligera es una región constante de la cadena ligera lambda modificada o sin modificar, una región constante de la cadena ligera kappa, modificada o sin modificar, un fragmento de las mismas o una combinación de las mismas.

50 La divulgación proporciona un anticuerpo específico de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 con una Kd de afinidad de  $10^{-6}$  M o menos. Un anticuerpo dirigido contra TGF $\beta$  descrito en el presente documento puede unirse al menos a una isoforma de TGF $\beta$  con una afinidad de  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o menos, o se une opcionalmente dos isoformas de TGF $\beta$ , o todas de TGF $\beta$ 1, 2, o 3 con una afinidad de  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M, o  $10^{-12}$  M o menos para una o más de las isoformas. Un anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a TGF $\beta$ 1 TGF $\beta$ 2 al menos 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o una afinidad mayor de 100 % (por ejemplo, se une preferentemente a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2) en comparación con la unión a TGF $\beta$ 3. Como alternativa, un anticuerpo descrito en el presente documento, se une a cada una de las isoformas de TGF $\beta$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 con una afinidad de 3 veces, 5 veces o 10 veces. En la invención como se reivindica, el anticuerpo se une a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 con mayor afinidad que TGF $\beta$ 3, como se midió mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de exclusión cinética.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo neutraliza la actividad de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en una mayor extensión que TGF $\beta$ 3. En algunas realizaciones, la neutralización del anticuerpo de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 es al menos de 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más potente que la neutralización de TGF $\beta$ 3. Los ensayos de neutralización ilustrativos contemplados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, un ensayo de liberación de la interleuquina-11 y un ensayo de proliferación de células HT-2. Además, se puede llevar a cabo un ensayo de actividad de TGF $\beta$  para determinar si un anticuerpo divulgado en el presente documento inhibe de forma preferente

una isoforma de TGF $\beta$ , incluyendo un ensayo de fosforilación de pSMAD o un ensayo de unión a rhLAP. En una realización adicional, el anticuerpo tiene una Cl50 inferior (es decir, mejor unión, mayor potencia) para TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en comparación con TGF $\beta$ 3.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera como se ha descrito en el presente documento.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico contemplada en el presente documento unida operativamente a una secuencia de control de la expresión. Se 10 contempla también una célula hospedadora que comprende un vector de expresión o una molécula de ácido nucleico de la divulgación. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde los ácidos nucleicos de la cadena pesada y la cadena ligera se expresan mediante diferentes 15 ácidos nucleicos o en el mismo ácido nucleico.

15 En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método de utilizar la célula hospedadora como se describe en el presente documento para producir un anticuerpo, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora en las condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo. Se proporciona también un anticuerpo producido mediante 20 el método divulgado en el presente documento.

20 La divulgación contempla además una composición farmacéutica estéril que comprende el anticuerpo como se ha divulgado en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo de la invención para usar en un método para tratar una enfermedad, dolencia o trastorno asociado con la expresión de TGF $\beta$  que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica contemplada en el presente documento. En determinadas realizaciones, la enfermedad, dolencia o trastorno se 30 selecciona entre el grupo que consiste en una enfermedad de un cáncer, un ojo (por ejemplo, ocular, óptica, oftálmica u oftalmológica), Afección o trastorno, una enfermedad, dolencia o trastorno asociado con fibrosis, por ejemplo, enfermedades,dolencias o trastornos fibroproliferativos, o enfermedades, dolencias o trastornos que tienen una fibrosis asociada.

35 Las enfermedades, las dolencias o los trastornos fibroproliferativos, o las enfermedades que tienen una fibrosis asociada incluyen aquellas que afectan cualquier órgano o tejido del cuerpo, incluyendo, aunque no de forma limitativa piel, pulmón, riñón, corazón, cerebro y ojo. Las enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos o las enfermedades que tienen una fibrosis asociada incluyen, aunque no de forma limitativa, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis peribronquiolar, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de las vías aéreas pequeñas (por ejemplo, bronquiolitis obstructiva), enfisema, síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), fibrosis pulmonar debida a agentes infecciosos o tóxicos, fibrosis renal, glomerulonefritis de todas las etiología (GN), GN proliferativa mesangial, GN inmunitaria, GN semilunar, glomeruloesclerosis, lesión tubulointersticial, fibrosis renal intersticial, fibrosis renal y todas las causa de fibrosis renal intersticial, fibrosis renal que es el resultado de complicaciones de exposición a fármacos, incluyendo el tratamiento con ciclosporina de receptores de trasplantes, nefropatía asociada al VIH, necropatía del trasplante, enfermedad renal diabética, nefropatía diabética, fibrosis sistémica nefrótigena, diabetes, fibrosis retroperitoneal idiopática, esclerodermia, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas asociadas con una cicatrización excesiva y una esclerosis progresiva, cirrosis hepática debida a todas las etiologías, trastornos del árbol biliar, disfunción hepática atribuible a infecciones, enfermedades fibroquísticas, enfermedades cardiovasculares, cardiopatía congestiva, miocardiopatía dilatada, miocarditis, fibrosis cardíaca con estenosis vascular, fibrosis cardíaca posterior al infarto, postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad venooclusiva, restenosis, restenosis posterior a angioplastia, fallo del injerto arteriovenoso, ateroesclerosis, hipertensión, cardiopatía hipertensiva, hipertrofia cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la aorta, esclerosis sistémica progresiva; polimiositis; lupus eritematoso sistémico; dermatomiositis, fascias, síndrome de Raynaud, artritis reumatoide, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con cirugía ocular, tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina, (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea) fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea, fibrosis asociada con la opacificación de la córnea, fibrosis de la red trabecular, fibrosis asociada con glaucoma, enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular, fibrosis en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo, fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana, fibrosis asociada con degeneración macular relacionada con la edad, cirugía postretiniana y de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética, enfermedad de Peyronie, esclerosis sistémica, lesión posterior de la médula espinal, osteoporosis, enfermedad de Camurati-Engelmann, enfermedad de Crohn, formación de cicatrices, síndrome de Marfan, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, fibrosis debida a incisiones quirúrgicas o trauma

mecánico, fibrosis asociada con cirugía ocular, y cicatriz excesiva o hipertrófica o formación de queoloide en la dermis que se produce durante la cicatrización de la herida resultante de trauma o heridas quirúrgicas.

- 5 Las enfermedades de los ojos ilustrativas (por ejemplo, ocular, óptica, oftálmicas u oftalmológicas), las dolencias o trastornos, incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos fibroproliferativos, fibrosis ocular, fibrosis oftálmicas, disfunción retiniana, fibrosis asociada con disfunción retiniana, degeneración macular húmeda o seca, vitreorretinopatía proliferativa, vitreorretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea), fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En diversas realizaciones, las enfermedades, dolencias, o trastornos fibroproliferativos del ojo se seleccionan entre el grupo que consiste en vitreorretinopatía proliferativa, fibrosis asociada con cirugía ocular, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la lente, fibrosis del estroma de la córnea y cirugía alcalina.
- En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un anticuerpo de la invención para usar en un método para tratar cánceres que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica contemplada en el presente documento. En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma y melanoma.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo o composición aumenta el número de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un tumor. En diversas realizaciones, el anticuerpo o composición aumenta la actividad citolítica de los linfocitos NK. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento aumenta la producción de perforina y granzima por los linfocitos NK. En una realización, el anticuerpo es XPA.42.089.
- En diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento disminuye el número de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhibe la función de los linfocitos T reguladores. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento inhibe la capacidad de los Treg de regular por defecto una respuesta inmunitaria o de migrar a un sitio de una respuesta inmunitaria.
- En diversas realizaciones, el anticuerpo o composición aumenta el número de linfocitos T citotóxicos en un tumor y/o potencia la actividad de los LTC, por ejemplo, refuerza, aumenta o promueve la actividad de los LTC. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento aumenta la producción de perforina y granzima por los LTC y aumenta la actividad citolítica de los LTC. En una realización, el anticuerpo es XPA.42.089.
- En otra realización, el anticuerpo o composición disminuye el número de citoblastos derivados de monocitos en un tumor y/o inhibe la función de los MDSC. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento inhibe la capacidad de los MDSC de suprimir una respuesta inmunitaria, inhibe la actividad inmunosupresora de los MDSC, y/o inhibe la capacidad de los MDSC de promover la expansión y/o la función de los Treg. El anticuerpo puede ser XPA.42.089.

- En diversas realizaciones, el anticuerpo disminuye el número de células dendríticas (CD) en un tumor y/o inhibe la función tolerogénica (por ejemplo, efecto tolerogénico) de las células dendríticas. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento disminuye tolerogénico de las células dendríticas CD8+. En una realización, el anticuerpo es XPA.42.089.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo de la invención para usar en un método para tratar la fibrosis que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica contemplados en el presente documento.
- En diversas realizaciones, el anticuerpo es para la administración con un segundo agente. En una realización, el segundo agente se selecciona entre el grupo que consiste en una proteína que degrada la matriz extracelular, un agente antifibrótico, terapia quirúrgica, quimioterapia, un agente citotóxico o radioterapia. Se divultan ejemplos de agentes secundarios en mayor detalle en la Descripción detallada.
- Se puede administrar terapia periódicamente, por ejemplo, por hora, diariamente, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente o en un intervalo más largo. En tratamientos ilustrativos, el anticuerpo divulgado en el presente documento puede administrarse a una dosis de aproximadamente 1 mg/día, 5 mg/día, 10 mg/día, 20 mg/día, 50 mg/día, 75 mg/día, 100 mg/día, 150 mg/día, 200 mg/día, 250 mg/día, 500 mg/día o 1000 mg/día. Estas concentraciones pueden administrarse como una forma farmacéutica única o como múltiples dosis.
- Se contempla también una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos o composiciones anteriores de la divulgación que se unen a TGF $\beta$ , o usar la misma en la preparación de un medicamento, para el tratamiento de cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento asociados con la expresión de TGF $\beta$ . Jeringuillas, por ejemplo, de un único uso o jeringuillas precargadas, recipientes sellados estériles, por ejemplo, se contemplan también viales, botellas, recipientes y/o kits o envases que comprenden cualquiera de los anteriores anticuerpos o composiciones, opcionalmente con instrucciones de uso adecuadas.
- Se entiende que cada característica o realización, o combinación, descrita en el presente documento es un ejemplo ilustrativo no limitante de cualquiera de los aspectos de la invención y, como tal, se entiende que es combinable con cualquier otra característica o realización, o combinación, descritas en el presente documento. Por ejemplo, cuando se describen características descritas con un lenguaje tal como "una realización", "algunas realizaciones", "determinadas realizaciones", "realizaciones adicionales", "realizaciones específicas ilustrativas" y/u "otra realización", cada uno de estos tipos de realizaciones es un ejemplo no limitante de una característica que se pretende que se combine con cualquier otra característica, o combinación de características, descritas en el presente documento sin tener que relacionar cada posible combinación. Dichas características o combinaciones de características se aplican a cualquiera de los aspectos de la invención. Cuando se divultan ejemplos de valores que se encuentran comprendidos dentro de los intervalos, se contemplan cualesquier de estos ejemplos como posibles criterios de valoración de un intervalo, se contemplan cualquiera y todos los valores numéricos entre dichos criterios de valoración, y cualquiera y todas las combinaciones de criterios de valoración superiores e inferiores.
- Breve descripción de los dibujos**
- La Figura 1 es un gráfico que muestra la competición de la unión de TGF $\beta$ 1 a rhLAP por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .
- La Figura 2 muestra la neutralización de la señalización de pSMAD en células por los anticuerpos contra TGF $\beta$ . (A) TGF $\beta$ 1; (B) TGF $\beta$ 2; (C) TGF $\beta$ 3.
- La Figura 3 es un gráfico que muestra la inhibición de los linfocitos T reguladores (Treg) por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .
- La Figura 4 es un gráfico que muestra la inhibición tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .
- La Figura 5 es un gráfico que muestra la inhibición tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .
- La Figura 6 es un gráfico que muestra la inhibición tumoral en un modelo singénico de ratón por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .
- La Figura 7 es un gráfico que muestra la inhibición tumoral en un modelo singénico de ratón por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .
- La Figura 8 es un gráfico que muestra la inhibición tumoral en un modelo singénico de ratón por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .

La Figura 9 es un gráfico que muestra la inhibición tumoral en un modelo singénico de ratón por los anticuerpos contra TGF $\beta$ .

5 La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto *in vivo* de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre los linfocitos citolíticos naturales en tumores, en un modelo de tumor singénico de ratón.

10 La Figura 11 es un gráfico que muestra el efecto *in vivo* de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre células supresoras mieloides derivadas de tumores, en un modelo singénico de ratón.

15 La Figura 12 es un gráfico que muestra el efecto *in vivo* de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre células dendríticas en un modelo de tumor singénico de ratón.

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto *in vivo* de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre los linfocitos T reguladores en un modelo de tumor singénico de ratón.

15 La Figura 14 es un gráfico que muestra el efecto *in vivo* de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre los linfocitos T citotóxicos en tumores en un modelo de tumor singénico de ratón.

20 La Figura 15 es un gráfico que muestra el efecto *in vitro* de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre la actividad de los linfocitos citolíticos NK.

25 La Figura 16 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre la proliferación de linfocitos T.

La Figura 17 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre la activación de los LTC evaluados por la expresión de la granzima B (GzmB) (Figura 17A) y la perforina (Figura 17B).

30 La Figura 18 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre los niveles de nitrógeno de urea sérica en sangre (BUN) en los animales tratados con CsA o en los animales del control a los que se administraron anticuerpos contra TGF $\beta$ .

35 La Figura 19 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre la acumulación de la albúmina, que es característica de la disfunción glomerular en el riñón enfermo, en la orina de los animales tratados con CsA o los animales del control a los que se administraron anticuerpos contra TGF $\beta$ .

40 La Figura 20 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre los niveles del colágeno de tipo IV en orina, que reflejan la extensión de la deposición de ECM y la fibrosis en los riñones, en la orina de los animales tratados con CsA o los animales del control a los que se administraron anticuerpos contra TGF $\beta$ .

45 La Figura 21 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre la expresión de los genes implicados en la fibrosis como se evaluó RT-PCR cuantitativa llevada a cabo sobre tejido renal. Se evaluaron los efectos sobre la expresión de TGF- $\beta$ 1 (Figura 21 A) y el colágeno de tipo III (Figura 21B) en animales tratados con CsA o animales del control a los que se administró anticuerpos contra TGF $\beta$ .

La Figura 22 es un gráfico que muestra el efecto de los anticuerpos contra TGF $\beta$  sobre el aumento en pSMAD2 en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) tras la administración de TGF $\beta$ 1.

#### Descripción detallada

50 La presente divulgación proporciona terapéuticas para tratar dolencias o trastornos asociados con la expresión de TGF $\beta$ , por ejemplo, cáncer y fibrosis. La presente divulgación proporciona moléculas o agentes que interactúan con TGF $\beta$  e inhiben uno o más de sus efectos funcionales, tales como por ejemplo, la señalización a través de los ligandos de unión de TGF $\beta$ . Las composiciones divulgadas en el presente documento tienen, de forma ventajosa, la capacidad de modular la actividad inmunitaria de las células en tumores, proporcionando por tanto tratar el cáncer alterando directamente una población de células que afecta directa o indirectamente el crecimiento del tumor. La invención es como se define por las reivindicaciones.

A fin de que la divulgación pueda comprenderse de forma más completa,, se muestran algunas definiciones.

60 Como se usa en el presente documento, "diana" o "antígeno diana" se refiere a cualquiera o todas las moléculas de TGF- $\beta$ , que incluyen TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3.

Como se usa en el presente documento "TGF $\beta$ " se refiere a una cualquiera o más isoformas de TGF $\beta$ , que incluyen TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 o variantes de las mismas. Igualmente, la expresión "receptor de TGF $\beta$ " a menos que se indique otra cosa, se refiere a cualquier receptor que se une al menos a una isoforma de TGF $\beta$

Como se usa en el presente documento, la "actividad biológica deseada" de un anticuerpo dirigido contra diana es la capacidad de unirse a TGF $\beta$  e inhibir uno o más de sus efectos funcionales.

- 5 Como se usa en el presente documento, una "dolencia" o un "trastorno asociado con la expresión diana" es una dolencia o trastorno en el que la actividad diana es perjudicial e incluye enfermedades y otros trastornos en los que se han mostrado que altos niveles de dianas van a ser o son sospechosos de ser tanto responsables de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a empeorar el trastorno, así como enfermedades y otros trastornos en los que altos niveles de la expresión diana se asocian con signos o síntomas clínicos indeseables. Dichos trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, mediante un aumento en los niveles de la diana secretada y/o sobre la superficie celular y/o una señalización aumentada en las células o tejidos de un sujeto que padece el trastorno. Se puede detectar un aumento en los niveles diana, por ejemplo, usando un anticuerpo específico diana como se describe en el presente documento.
- 10 15 Los ejemplos de enfermedades, dolencias o trastornos asociados a la expresión de TGF $\beta$  que se pueden tratar con una sustancia de anticuerpo que se une a TGF $\beta$  (por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación) incluyen cánceres, tales como cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma y melanoma, enfermedades de los ojos (por ejemplo, oculares, ópticas, oftálmicas u oftalmológicas), las dolencias o trastornos, enfermedades, dolencias o trastornos asociados con fibrosis, por ejemplo, enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos, o enfermedades, dolencias o trastornos que tienen una fibrosis asociada.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Las enfermedades, las dolencias o los trastornos fibroproliferativos, o las enfermedades que tienen una fibrosis asociada incluyen aquellas que afectan cualquier órgano o tejido en el cuerpo, incluyendo, aunque no de forma limitativa la piel, pulmón, riñón, corazón, cerebro y ojo. Las enfermedades, dolencias o trastornos fibroproliferativos, o enfermedades que tienen una fibrosis asociada, incluyen aunque no de forma limitativa, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis peribronquiolar, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de las vías aéreas pequeñas (por ejemplo, bronquiolitis obstructiva), enfisema, síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), fibrosis pulmonar debida a agentes infecciosos o tóxicos, fibrosis renal, glomerulonefritis de todas las etiología (GN), por ejemplo, GN proliferativa mesangial, GN inmunitaria y CN semilunar, glomeruloesclerosis, lesión tubulointersticial, fibrosis renal intersticial, fibrosis renal y todas las causa de fibrosis renal intersticial, fibrosis renal que es el resultado de complicaciones de exposición a fármacos, incluyendo el tratamiento con ciclosporina de receptores de trasplantes, por ejemplo, tratamiento con ciclosporina, nefropatía asociada al VIH, necropatía del trasplante, enfermedad renal diabética (por ejemplo, nefropatía diabética), fibrosis sistémica nefrógena, diabetes, fibrosis retroperitoneal idiopática, esclerodermia, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas asociadas con una cicatrización excesiva y una esclerosis progresiva, incluyendo cirrosis hepática debida a todas las etiologías, trastornos del árbol biliar, disfunción hepática atribuible a infecciones, enfermedades fibroquísticas, enfermedades cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca congestiva; miocardiopatía dilatada, miocarditis, fibrosis cardíaca con estenosis vascular (por ejemplo, fibrosis cardíaca posterior a infarto), postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad venooclusiva, restenosis (por ejemplo, restenosis posterior a angioplastia), fallo del injerto arteriovenoso, ateroesclerosis, hipertensión, cardiopatía hipertensiva, hipertrofia cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la aorta, esclerosis sistémica progresiva, polimiositis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, fascias, síndrome de Raynaud, artritis reumatoide, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología o fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea), fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética, enfermedad de Peyronie, esclerosis sistémica, lesión posterior de la médula espinal, osteoporosis, enfermedad de Camurati-Engelmann, enfermedad de Crohn, formación de cicatrices, síndrome de Marfan, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, fibrosis debida a incisiones quirúrgicas o trauma mecánico, fibrosis asociada con cirugía ocular; y cicatriz excesiva o hipertrófica o formación de queloide en la dermis que se produce durante la cicatrización de la herida resultante de trauma o heridas quirúrgicas.
- Ejemplo de enfermedades de los ojos, (por ejemplo, oculares, ópticas, oftálmicas u oftalmológicas), las dolencias o trastornos, incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos fibroproliferativos, fibrosis ocular, fibrosis oftálmicas, disfunción retiniana, fibrosis asociada con disfunción retiniana, degeneración macular húmeda o seca, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como

tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea), fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.

Ejemplos de enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos del ojo, fibrosis ocular, fibrosis ocular o fibrosis oftálmica incluyen, aunque no de forma limitativa, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con disfunción retiniana, fibrosis asociada con degeneración macular húmeda o seca, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, fibrosis asociada con quemadura alcalina, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.

En diversas realizaciones, las enfermedades, dolencias, o trastornos fibroproliferativos del ojo se seleccionan entre el grupo que consiste en vitreoretinopatía proliferativa, fibrosis asociada con cirugía ocular, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la de la lente, fibrosis del estroma de la córnea y cirugía alcalina.

Una "inmunoglobulina" o un "anticuerpo nativo" es una glicoproteína tetramérica. En una inmunoglobulina de origen natural, cada tetrámero se compone de dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción del extremo carboxilo de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). Las cadenas pesadas se clasifican como mu ( $\mu$ ), delta ( $\Delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ), y define el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, generalmente, Fundamental Immunology, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2<sup>a</sup> ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo de modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión.

Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987).

Los dominios variables de la inmunoglobulina presentan la misma estructura general de regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables o CDR. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o Chothia y Lesk, (J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987); Chothia *et al.*, (Nature 342:878-883, 1989).

La región hipervariable de un anticuerpo se refiere a los restos de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende los restos de aminoácidos de una CDR [por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] y/o aquellos restos de un bucle hipervariable (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como

se describe por [Chothia *et al.*, J. Mol.Biol. 196: 901-917 (1987)]. Se han identificado y nombrado las CDR de acuerdo con la numeración de ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003), que describe las localizaciones de las CDR en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada del siguiente modo: CDR1, aproximadamente los restos 27 a 38; CDR2, aproximadamente los restos 56 a 65; y, CDR3, aproximadamente los restos 105 a 116 (línea germinal) o los restos 105 a 117 (reordenados). En una realización, se contempla que las CDR se localicen en aproximadamente los restos 26-31 (L1), 49-51 (L2) y 88-98 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y aproximadamente los restos 26-33 (H1), 50-58 (H2) y 97-111 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo de longitud aproximadamente similar a las divulgadas en el presente documento. Sin embargo, una persona experta en la materia comprende que la localización real de los restos de la CDR puede variar desde los restos proyectados descritos anteriormente cuando se identifica la secuencia del anticuerpo concreto.

Los restos marco o restos FR son aquellos restos de dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable.

"Región variable de la cadena pesada", como se usa en el presente documento se refiere a la región de la molécula de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de dicho dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo. La región variable de la cadena pesada puede contener una, dos o tres CDR de dicha cadena pesada de anticuerpo.

"Región variable de la cadena ligera" como se usa en el presente documento se refiere a la región de una molécula de anticuerpo, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de dicho dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo. La región variable de la cadena ligera puede contener una,La región variable de la cadena pesada puede contener una, dos o tres CDR de dicha cadena ligera del anticuerpo, que puede ser tanto una cadena ligera kappa o lambda dependiendo del anticuerpo.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos tetraméricos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos que se pueden unir a un antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)2, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores siempre que presenten la actividad biológica deseada. Una "inmunoglobulina" o "anticuerpo tetramérico" es una glicoproteína tetramérica que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, comprendiendo cada una, una región variable y una región constante. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de anticuerpos o las porciones de unión a antígeno incluyen, entre otras cosas, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, anticuerpos de dominio (dAb, por sus siglas en inglés), fragmentos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR; por sus siglas en inglés), anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, anticuerpos químéricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpo, anticuerpos lineales; anticuerpo recombinante quelante, un tricuerpo o un bicuerpo, un intracuerpo, un nanocuerpo, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), una proteína de fusión a una inmunoglobulina con un dominio de unión a antígeno, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VH o una variante o derivado del mismo, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir una unión a antígeno específica del polipéptido, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias CDR, siempre que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada.

"Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

"Variante de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia polipeptídica de un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos, en la región variable de los dominios de la región variable del anticuerpo de referencia. Las variantes pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas al anticuerpo sin modificar.

Un "anticuerpo químérico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene una secuencia derivada de dos anticuerpos diferentes (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) que se origina normalmente de especies diferentes. Más normalmente, los anticuerpos químéricos comprenden fragmentos de anticuerpos humanos y de roedores, generalmente, regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables de anticuerpos de ratón.

Un "anticuerpo neutralizante" es una molécula de anticuerpo que es capaz de eliminar o reducir significativamente la función biológica de un antígeno diana al cual se une. Por consiguiente, una anticuerpo "neutralizante" dirigido contra la diana es capaz de eliminar o reducir significativamente una función biológica, tal como una actividad enzimática, la unión a un ligando, o una señalización intracelular.

Un "anticuerpo" aislado es uno que se ha identificado y separado y recuperado de un componente de su entorno

natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En estrategias preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determinó por el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante una SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, una tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que se une "específicamente" es "específico de diana", es "específico de" diana o es "inmunorreactivo" con el antígeno diana se refiere a un anticuerpo o sustancia de anticuerpo que se une al antígeno diana con mayor afinidad que con antígenos similares. En un aspecto de la divulgación, los polipéptidos de unión a la diana, o los fragmentos, variantes, o derivados de los mismos, se unirán con una mayor afinidad a una diana humana en comparación con su afinidad de unión a una diana de otra, es decir, de una especie no humana, pero los polipéptidos de unión que reconocen y unen ortólogos de la diana están comprendidos en el alcance proporcionado.

Por ejemplo, un polipéptido que es un anticuerpo o fragmento del mismo "específico de" su antígeno homólogo indica que las regiones variables de los anticuerpos reconocen y se unen al polipéptido de interés con una preferencia detectable (es decir, capaces de distinguir el polipéptido de interés de otros polipéptidos conocidos de la misma familia, en virtud de diferencias mensurables en la afinidad de unión, a pesar de la posible existencia de una identidad de secuencia, homología, o similitudes localizadas entre los miembros de la familia). Se entenderá que los anticuerpos específicos pueden también interactuar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas ELISA) mediante interacciones con secuencias externas a la región variable de los anticuerpos, y en concreto, en la región constante de la molécula. Los ensayos de cribado para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para usar en los métodos de la presente divulgación son bien conocidos, y se practican de forma rutinaria en la técnica. Para una discusión comprehensiva de dichos ensayos, A efecto de dichos ensayos, véase Harlow *et al.* (Eds), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Se pueden producir anticuerpos para usar en los métodos usando cualquier método conocido en la técnica.

El término "epítopo" se refiere a la porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida y unida por un agente de unión selectivo en una o más de las regiones de unión a antígeno. Los epítopos consisten usualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como, aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos, y tienen características tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítopos como se usan en el presente documento pueden ser contiguos o no contiguos. Además, los epítopos pueden ser miméticos (mimotopos) en que comprenden una estructura tridimensional que es idéntica a la del epítopo usado para generar el anticuerpo, que no comprende además ninguno o solo alguno de los restos de aminoácidos que se encuentran en la diana que se usaron para estimular la respuesta inmunitaria del anticuerpo. Como se usa en el presente documento, un mimotopo no se considera un antígeno diferente del epítopo unido mediante el agente de unión selectiva; el agente de unión selectiva reconoce la misma estructura tridimensional del epítopo y el mimotopo.

El término "derivado", cuando se usa junto con sustancias y polipéptidos del anticuerpo de la presente divulgación se refiere a polipéptidos químicamente modificados por dichas técnicas tales como ubiquinación, conjugación a agentes terapéuticos o diagnósticos, marcado (por ejemplo, con radionucleidos o diversas enzimas), unión polimérica covalente tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no se producen en las proteínas humanas. Los derivados retienen las propiedades de unión de las moléculas sin derivatizar de la divulgación.

"Resto detectable" o un "marcador" se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o medios mecánicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen 32P, 35S, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa comúnmente en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. El resto detectable genera a menudo una señal mensurable, tal como una señal radioactiva, cromogénica, o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de resto detectable unido en una muestra.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para indicar la cantidad de composición específica diana de la divulgación que es eficaz para mejorar o disminuir los síntomas o signos de la enfermedad asociada con la expresión de la proteína diana.

Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento", como se usan con respecto a los métodos en el presente documento se refieren a eliminar, reducir, suprimir o mejorar, ya sea de manera temporal o permanente, bien parcial o completamente, un síntoma clínico, la manifestación o progresión de un evento, enfermedad o dolencia asociada con la expresión de TGFβ. Dicho tratamiento no necesita ser absoluto para ser útil.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo específico de diana, que puede comprender aquellas secuencias, fragmentos, variantes y derivados de las mismas ilustrativos que se muestran en la Tabla 1, incluyendo las formulaciones farmacéuticas un anticuerpo específico de diana enumerado anteriormente, los métodos de preparar las formulaciones farmacéuticas, y los métodos para tratar pacientes con las formulaciones y compuestos farmacéuticos.

- 5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que pueden dividirse además en subclases o isotipos, 10 por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad ADCC. Un anticuerpo divulgado en el presente documento, si comprende un dominio constante, puede ser de cualquiera de estas subclases o isotipos.
- 15 Los anticuerpos de la presente invención presentan afinidad de unión a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 con una Kd de afinidad de  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M, o  $10^{-12}$  M o menos, como se midió usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, el instrumento BIACore 2000, usando los procedimientos generales reseñados por el fabricante) o el ensayo de exclusión cinética. Se pueden analizar los datos de afinidad, por ejemplo, mediante el método de Scatchard *et al.*, (Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660, 1949).
- 20 20 Se puede usar un ensayo de exclusión cinética KinExA para medir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. La tecnología KinExA mide los eventos de unión en la fase de solución, más bien que los eventos de unión entre una fase de solución y una fase sólida. Asimismo, aunque muchos métodos para medir los eventos de unión requieren al menos modificar un reactivo mediante la inmovilización o el marcado, el método KinExA no requiere la modificación de moléculas bajo estudio. Se cree que el método KinExA permite un intervalo más amplio de constantes de unión a medir que otros métodos actualmente disponibles. Está disponible una descripción adicional acerca de los dispositivos KinExA y el funcionamiento para la caracterización de anticuerpos del fabricante (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID) y se puede encontrar en la bibliografía publicada, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.664.114 y Darling *et al.*, "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions." Assay and Drug Development Technologies, 2004, 2:647-657.
- 25 30

#### **Factor $\beta$ de crecimiento transformante**

- 35 TGF $\beta$  es un dímero unido a disulfuro que se sintetiza como una preproteína de aproximadamente 400 aminoácidos (aa) que se escinde antes de la secreción para producir TGF $\beta$  madura. El fragmento de escisión en el extremo N, conocido como el "péptido asociado a latencia" (LAP), puede permanecer unido de forma no covalente al dímero, inactivando por tanto TGF $\beta$ . TGF $\beta$  aislado *in vivo*, se encuentra predominantemente en la forma "latente" inactiva, es decir, asociado con LAP. El complejo TGF $\beta$  latente puede activarse de diversas maneras, por ejemplo, uniéndolo a un receptor de la superficie celular denominado el receptor del factor de crecimiento II similar a manosa-6-fosfato/insulina independiente de cationes. La unión se produce a través de los restos de manosa-6-fosfato unidos a los sitios de glicosilación dentro de LAP. Tras la unión al receptor, TGF $\beta$  se libera en su forma madura. TGF $\beta$  activo maduro, es a continuación libre de unirse a su receptor y ejercer sus funciones biológicas. Se ha cartografiado el dominio de unión a TGF $\beta$  principal en el receptor de TGF $\beta$  de tipo II en una secuencia de 19 aminoácidos (Demetriou *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12755, 1996). Véase también la Patente de Estados Unidos 7.867.496.
- 40 45 En la actualidad, existen cinco isoformas conocidas de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1 a TGF $\beta$ 5; TGF $\beta$ 1-3 son de mamíferos, TGF $\beta$ 4 se encuentra en pollos; y TGF $\beta$ 5 se encuentra en ranas), todas las cuales son homólogas entre sí (identidad del 60-80 %), forman homodímeros de aproximadamente 25 kDa, y actúan tras los receptores TGF $\beta$  comunes (TGF $\beta$ -RI, TGF $\beta$ -RII, TGF $\beta$ -RIIB, y TGF $\beta$ -RIII). Los aspectos estructurales y funcionales de TGF $\beta$ , así como los receptores de TGF $\beta$  son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Cytokine Reference, eds. Oppenheim *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif., 2001). TGF $\beta$  está bien conservado entre especies. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de los TGF $\beta$ 1 maduros de rata y ser humano son casi idénticas. Véase también la patente de Estados Unidos 7.867.496.
- 50 55 TGF $\beta$ 1 juega un importante papel en el proceso de cicatrización de heridas en tejidos biológicos (New Engl. J. Med., Vol. 331, pág. 1286, 1994 y J. Cell. Biol., Vol. 119, pág. 1017, 1992). En el sitio del tejido cicatrizado, se producen reacciones biológicas tales como la infiltración de las células inflamatorias y de las células de fibroblastos, la producción de la matriz extracelular (ECM) y la vascularización y el crecimiento celular para la posterior regeneración del tejido para reparar el tejido lesionado. Véase también la patente de Estados Unidos 7.579.186.
- 60 65 Los ratones deficientes en TGF $\beta$ 2 demuestran defectos de desarrollo significativos, incluyendo en corazón, pulmón, craneofaciales, en miembros, columna vertebral, ojo, oído y defectos urogenitales (Dunker *et al.*, Eur J Biol 267:6982-8, 2001). Los ratones deficientes en TGF $\beta$ 3 demuestran casi un 100 % de letalidad en las 24 horas después del nacimiento. Estos ratones muestran alteraciones del paladar significativas y un desarrollo pulmonar retrasado (Dunker *et al.*, anteriormente). TGF $\beta$ 2 se ha implicado también en el desarrollo del glaucoma (Luthen-Driscoll, Experimental Eye Res 81:1-4, 2005), fibrosis asociada con enfermedad de Crohn (Van Assche *et al.*, Inflamm Bowel Dis. 10:55-60,

2004), en la cicatrización de heridas y la nefropatía diabética (Pohlers *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1792:746-56, 2009)

Se ha observado que muchos tumores humanos (deMartin *et al.*, *EMBO J.*, 6: 3673 (1987), Kuppner *et al.*, *Int. J. Cancer*, 42: 562 (1988)) y muchas líneas de células tumorales (Derynck *et al.*, *Cancer Res.*, 47: 707 (1987), Roberts *et al.*, *Br. J. Cancer*, 57: 594 (1988)) producen TGF $\beta$  y se sugiere un posible mecanismo para aquellos tumores que evaden la supervivencia inmunitaria normal.

La expresión de la isoforma TGF $\beta$  en cáncer es compleja y variable con diferentes combinaciones de isoformas de TGF $\beta$  que tienen diferentes papeles en cánceres concretos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7.927.593. Por ejemplo, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 un papel mayor en el cáncer de ovario y su progresión que en TGF $\beta$ 2; mientras que la expresión de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 es mayor en tumores de condrosarcoma de grado superior que en TGF $\beta$ 3. En cáncer de mama humano, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 se expresan mucho, pareciendo la expresión de TGF $\beta$ 3 estar correlacionada con los pacientes sobrevivientes globales con metástasis nodular y una expresión positiva para TGF $\beta$ 3 que tienen pronosticado malos resultados. Sin embargo, en el cáncer de colon, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 se expresan más que TGF $\beta$ 3 y están presentes en niveles en circulación mayores que en individuos exentos de cáncer. En gliomas, TGF $\beta$ 2 es importante para la migración celular.

Se ha implicado también la expresión de TGF $\beta$  en el inicio de diversas fibrosis tisulares, tales como nefroesclerosis, fibrosis pulmonar y cirrosis; así como en el inicio de diversos estados, tales como hepatitis crónica, artritis reumatoide, restenosis vascular y queloide de la piel. Las fibrosis contempladas, incluyendo las fibrosis asociadas con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, enfermedades o trastornos fibroproliferativos), o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, incluyen, aunque no de forma limitativa, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis peribronquiolar, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de las vías aéreas pequeñas (por ejemplo, bronquiolitis obstructiva), enfisema, síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA); fibrosis pulmonar debida a agentes infecciosos o tóxicos, fibrosis renal, glomerulonefritis de todas las etiología (GN), por ejemplo, GN proliferativa mesangial, GN inmunitaria y CN semilunar, glomeruloesclerosis, lesión tubulointersticial, fibrosis renal intersticial, fibrosis renal y todas las causa de fibrosis renal intersticial, fibrosis renal que es el resultado de complicaciones de exposición a fármacos, incluyendo el tratamiento con ciclosporina de receptores de trasplantes, por ejemplo, tratamiento con ciclosporina, nefropatía asociada al VIH; necropatía del trasplante, enfermedad renal diabética (por ejemplo, nefropatía diabética), fibrosis sistémica nefrógena, diabetes, fibrosis retroperitoneal idiopática, esclerodermia, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas asociadas con una cicatrización excesiva y una esclerosis progresiva, incluyendo cirrosis hepática debida a todas las etiologías, trastornos del árbol biliar, disfunción hepática atribuible a infecciones, enfermedades fibroquísticas, enfermedades cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca congestiva; miocardiopatía dilatada, miocarditis, estenosis vascular, fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis cardíaca posterior a infarto), postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad venooclusiva, restenosis (por ejemplo, restenosis posterior a angioplastia), fallo del injerto arteriovenoso, ateroesclerosis, hipertensión, cardiopatía hipertensiva, hipertrofia cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la aorta, esclerosis sistémica progresiva; polimiositis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, fascias, síndrome de Raynaud, artritis reumatoide, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, fibrosis asociada con disfunción retiniana, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, fibrosis asociada con quemadura alcalina, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), cirugía postretiniana y de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética, enfermedad de Peyronie, esclerosis sistémica, lesión posterior de la médula espinal, osteoporosis, enfermedad de Camurati-Engelmann, enfermedad de Crohn, formación de cicatrices, síndrome de Marfan, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, fibrosis debida a incisiones quirúrgicas o trauma mecánico, fibrosis asociada con cirugía ocular; y cicatriz excesiva o hipertrófica o formación de queloide en la dermis que se produce durante la cicatrización de la herida resultante de trauma o heridas quirúrgicas.

En la fibrosis pulmonar y nefroesclerosis, la concentración de TGF $\beta$  es alta y conduce al progreso de los estados mórbidos, tales como fibrosis (Yamamoto *et al.*, *Kidney Int.* 45:916-27, 1994 y Westergren-Thorsson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:632-7, 1993). Se ha presumido que la persistencia de la lesión tisular transduce continuamente señales para expresar TGF $\beta$ , que suprimen la señal de regulación negativa para la expresión de TGF $\beta$  por ECM o producen ambos eventos sinéricamente en la fibrosis pulmonar y la nefroesclerosis. La supresión de la actividad de TGF $\beta$  y la acumulación de la matriz extracelular en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades fibróticas, usando un inhibidor de TGF $\beta$  se divulga en los documentos WO 1991/04748, WO 1993/10808 y WO 2000/40227. Se han usado anticuerpos dirigidos contra TGF-beta neutralizantes en el tratamiento de la enfermedad renal diabética experimental (Han y Ziyadeh, *Peritoneal dialysis international*, 19 Supl 2: S234-237 (1999)). Véase también la patente de Estados

Unidos 7.527.791 que describe además el uso de inhibidores de TGFβ en diversas indicaciones.

Las enfermedades de los ojos ilustrativas (por ejemplo, oculares, ópticas, oftálmicas u oftalmológicas), las dolencias o trastornos, incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos fibroproliferativos, fibrosis ocular, fibrosis oftálmicas,

- 5 disfunción retiniana, fibrosis asociada con disfunción retiniana, degeneración macular húmeda o seca, vitreorretinopatía proliferativa, vitreorretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea), fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.

20 Ejemplos de enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos del ojo, fibrosis ocular, fibrosis ocular o fibrosis oftálmica incluyen, aunque no de forma limitativa, vitreorretinopatía proliferativa, vitreorretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con disfunción retiniana, fibrosis asociada con degeneración macular húmeda o seca, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el

- 25 endotelio de la córnea, fibrosis asociada con quemadura alcalina, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis

30 epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.

35 En diversas realizaciones, las enfermedades, dolencias, o trastornos fibroproliferativos del ojo se seleccionan entre el grupo que consiste en vitreorretinopatía proliferativa, fibrosis asociada con cirugía ocular, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la lente, fibrosis del estroma de la córnea y cirugía alcalina.

### **Polipéptidos de anticuerpos**

40 La presente divulgación abarca las moléculas de aminoácidos que codifican anticuerpos específicos diana. En realizaciones ilustrativas, un anticuerpo específico diana de la divulgación puede comprender una cadena ligera kappa (κ) humana o una cadena ligera lambda (λ) humana o una secuencia de aminoácidos derivada de las anteriores, o una cadena pesada humana o una secuencia derivada de la anterior, o ambas cadenas pesada y ligera juntas en una única cadena, una forma dimérica, tetramérica u otra forma. En algunas realizaciones, una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina específica diana son diferentes moléculas de aminoácidos. En otras realizaciones, la misma molécula de aminoácidos contiene una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo específico diana.

45 50 La secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano dirigido contra diana comprende las CDR de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera madura (VL)(es decir, falta la secuencia de señalización) del anticuerpo XPA.42.089 que se muestra en el SEQ ID NO:8 o las variantes del mismo, incluyendo la CDR injertada, modificada, humanizada, química, o anticuerpos humanos diseñados mediante ingeniería genética o cualesquier otras variantes descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la VL comprende la secuencia de aminoácidos desde el inicio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de la cadena ligera o uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

55 60 El anticuerpo específico diana humano comprende las CDR de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada madura (VH) (es decir, falta la secuencia de señalización) del anticuerpo XPA.42.089 que se muestra en el SEQ ID NO: 6 o las variantes del mismo. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos desde el inicio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de una cualquiera de la cadena pesada de los anteriores anticuerpos.

65 65 En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la región variable de la cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 6 y/o una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente

un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la región variable de la cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO:8, comprendiendo el anticuerpo todos de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 o LCDR3.

- 5 En una realización relacionada, los restos del marco se alteran. Las regiones marco de la cadena pesada que se pueden alterar se encuentran dentro de las regiones designadas H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4, que rodean los restos CDR de la cadena pesada, y los restos de las regiones marco de la cadena ligera que se pueden alterar se encuentran dentro de las regiones designadas L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4, que rodean los restos CDR de la cadena ligera. Se puede sustituir un aminoácido dentro de la región marco, por ejemplo, con cualquier aminoácido adecuado identificado en un marco humano o un marco de consenso humano.

10 En algunos de los diferentes anticuerpos divulgados en el presente documento, un anticuerpo dirigido contra TGFP descrito en el presente documento se une específicamente a al menos una isoforma de TGF $\beta$  seleccionada entre el grupo que consiste en TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. En otras, el anticuerpo dirigido contra TGFP se une específicamente a: (a) TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 ("anticuerpo reactivo a pan" o "anticuerpo de unión a pan"); (b) TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2; (c) TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3; y (d) TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. En otras, un anticuerpo dirigido contra TGFP descrito en el presente documento se une al menos a una isoforma de TGF $\beta$  con una afinidad de  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M o  $10^{-12}$  M o menos (menor significa mayor afinidad de unión) u, opcionalmente, se une a dos isoformas TGF $\beta$  o todas de TGF $\beta$ 1, 2, o 3 con una afinidad de  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M, o  $10^{-12}$  M o menos para una o más de las isoformas. En otras realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a TGF $\beta$ 1 TGF $\beta$ 2 al menos 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o una afinidad mayor de 100 % (por ejemplo, se une preferentemente a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2) en comparación con la unión a TGF $\beta$ 3. Un anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a cada una de las isoformas de TGF $\beta$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 con una afinidad de 3 veces, 5 veces o 10 veces entre sí.

15 En algunas realizaciones, la neutralización del anticuerpo de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 es al menos de 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más potente que la neutralización de TGF $\beta$ 3.

20 30 Se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.089 en las SEQ ID NOS: 6 y 8, respectivamente. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.068 en las SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente, y se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.681 en las SEQ ID NOS: 10 y 12, respectivamente.

### 35 **Ácidos nucleicos de anticuerpos**

40 La presente divulgación abarca también las moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos específicos diana. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácidos nucleicos codifican una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo específico diana. En otras realizaciones, la misma molécula de aminoácidos codifica regiones variables de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo específico diana. En una realización, el ácido nucleico codifica un anticuerpo específico diana de la presente divulgación, así como cualquiera de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

45 50 En un aspecto, una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos VL del anticuerpo XPA.42.089 que se muestra en el SEQ ID NO: 8 o una porción del mismo. En un aspecto relacionado, la secuencia de aminoácidos VL es una secuencia consenso.

55 60 En una realización, la presente divulgación proporciona compuestos de unión a antígeno, incluyendo fragmentos funcionales, que tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable que se muestra en el SEQ ID NO: 6 y 8. En una realización relacionada, un compuesto de unión a antígeno anteriormente mencionado se selecciona entre el grupo que consiste entre un anticuerpo tetramérico ensamblado completamente, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado; un anticuerpo humano; un anticuerpo químérico; un anticuerpo multiespecífico, un fragmento de anticuerpo, Fab, F(ab')2; Fv; scFv o un fragmento de anticuerpo monocatenario; un diacuerpo; triacuerpo, tetracuerpo, minicuerpo, anticuerpos lineales; anticuerpo recombinante quelante, un tricuerpo o un bicuerpo, un intracuerpo, un nanocuerpo, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), una proteína de fusión a una inmunoglobulina con un dominio de unión, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VH, o una variante o derivado de uno cualquiera de estos anticuerpos, que presenta la actividad biológica deseada, o una mezcla de dos o más anticuerpos.

65 En un aspecto, los anticuerpos de la presente divulgación comprenden una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera como se muestra en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.

66 En otra realización más, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada del SEQ ID NO: 6 y una

región variable de la cadena ligera del SEQ ID NO: 8.

En un aspecto relacionado, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del SEQ ID NO: 8. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 7.

- 5 Las moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación incluyen todas las secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo las secuencias en las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 y las secuencias de ácidos nucleicos comprenden codones degenerados basados en la diversidad del código genético, que codifican una secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo descrito en el presente documento o cualquiera de las HCDR o LCDR descritas en el presente documento, y que se muestran en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13-30, así como los ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de restricción muy altas, tales como las descritas en el presente documento, a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo descrito en el presente documento o cualesquiera HCDR o LCDR descritas en el presente documento y que se muestran en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13-30.

- 10 15 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos VL que es al menos un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 97, 98 o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL que se muestra en el SEQ ID NO: 8. Las moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación incluyen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de restricción muy altas, tales como las descritas en el presente documento, a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del SEQ ID NO: 8, o que tiene una secuencia e ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera del SEQ ID NO: 7.

Se contempla además que la molécula de ácido nucleico de la divulgación comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos VH del anticuerpo XPA.42.089.

- 20 25 En un aspecto relacionado, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de las SEQ ID NOS: 6. En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 5.

- 30 35 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos VH que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH que se muestra en el SEQ ID NO: 6. En un aspecto relacionado, la secuencia de aminoácidos VH es una secuencia consenso. Las moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación incluyen además ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de restricción muy altas, tales como las descritas en el presente documento, a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del SEQ ID NO: 6, o que tiene una secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada del SEQ ID NO: 5.

- 40 Se contempla además que los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar una cadena ligera o una cadena pesada de longitud completa del anticuerpo XPA.42.089 en donde una cadena ligera de longitud completa o una cadena pesada de longitud completa comprende una región constante de la cadena ligera o una región constante de la cadena pesada, respectivamente, las regiones constantes de la cadena ligera incluyen opcionalmente regiones kappa o lambda sin modificar o modificadas y las regiones constantes pesadas incluyen regiones constantes sin modificar o modificadas de cualquiera de las clases, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, o IgE.

- 45 En un aspecto, el anticuerpo de cadena ligera de longitud completa comprende la secuencia que se muestra en el SEQ ID NO:8. Se contempla además que el nucleótido que codifica la cadena ligera de longitud completa codifique la secuencia SEQ ID NO: 8, y comprenda la secuencia de nucleótidos que se muestra en el SEQ ID NO: 7.

- 50 En un aspecto, el anticuerpo de cadena pesada de longitud completa comprende la secuencia en SEQ ID NO: 6. Se contempla además que el nucleótido que codifica la cadena pesada de longitud completa codifique la cadena pesada del SEQ ID NO: 6 y comprenda la secuencia de nucleótidos que se muestra en el SEQ ID NO: 5.

- 55 En realizaciones ilustrativas, un anticuerpo de la divulgación comprende una cadena ligera kappa (κ) humana o una cadena ligera lambda (λ) humana o una secuencia de aminoácidos derivada de las anteriores, o una cadena pesada humana o una secuencia derivada de la anterior, o ambas cadenas pesada y ligera juntas en una única cadena, una forma dimérica, tetramérica u otra forma.

#### **Anticuerpos monoclonales**

- 60 65 Anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Los anticuerpos monoclonales son generalmente muy específicos, y pueden dirigirse contra un único sitio antigénico, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (políclonales) que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo homogéneo, no contaminado por otras inmunoglobulinas con diferentes especificidades y características.

- Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.* (*Nature*, 256:495-7, 1975) (Harlow & Lane; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59- 103 (Academic Press, 1986) o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson *et al.*, (*Nature* 352: 624-628, 1991) y Marks *et al.*, (*J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991). Los métodos adicionales para obtener anticuerpos monoclonales son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica.
- 5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65
- Los anticuerpos monoclonales, tales como los producidos mediante los métodos anteriores, se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía con hidroxiapatito, electroforesis en gel, diálisis y/o cromatografía de afinidad.
- Se contempla además que los anticuerpos de la presente divulgación puedan usarse como fragmentos de unión a antígeno más pequeños del anticuerpo que son bien conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

#### Fragmentos de anticuerpos

- 20      25      30      35      40      45      50      55      60      65
- Los fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa intacto, preferentemente una región de unión a antígeno o una región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv); fragmentos de anticuerpos multiespecíficos tales como biespecíficos, triespecíficos, etc., anticuerpos (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; compuestos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), proteínas de fusión a inmunoglobulina con un dominio de unión; anticuerpos camelizados; anticuerpos que contienen VHH; y otros polipéptidos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Véase por ejemplo Holliger & Hudson (*Nat. Biotech.* 23:1126-36 (2005)).
- La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro a la región bisagra, que tiene dos fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprende los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al Fv formar la estructura deseada para la unión al antígeno, dando como resultado un anticuerpo monocatenario (scFv), en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes a través de un enlazador sintético que les permite fabricarse como una única cadena proteica (Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988, y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883, 1988). Para una revisión de los scFv véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 1 13, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Un fragmento Fd que consiste en el dominio VH y CH1.
- Los fragmentos de anticuerpos adicionales incluyen un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward, *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989) que consiste en un dominio VH. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero que usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993, y Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespécíficos.
- Anticuerpos de cadena pesada funcionales provistos de cadenas ligeras se producen naturalmente en tiburones nodriza (Greenberg *et al.*, *Nature* 374:168-73, 1995), tiburones wobbegong (Nuttall *et al.*, *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001) y Camelidae (Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-8, 1993; Nguyen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 275: 413, 1998), tales como camellos, dromedarios, alpacas y llamas. El sitio de unión a antígeno se reduce a un dominio único, el dominio VHH, en estos animales. Estos anticuerpos forman regiones de unión a antígenos usando solo la región variable de la cadena pesada, es decir, estos anticuerpos funcionales son homodímeros de cadenas pesadas que tienen solo la estructura H2L2 (denominados como "anticuerpos de cadena pesada" o "HCABs"). VHH de camélidos según se informa, se recombinan con las regiones constantes de IgG2 e IgG3 que contienen la bisagra, los dominios CH2 y CH3, y carece de un dominio CH1 (Hamers-Casterman *et al.*, anteriormente). Por ejemplo, IgG1 de llama es un isótipo de anticuerpo convencional (H2L2) en el que VH se recombinan con una región constante que contiene la bisagra, los dominios CH1, CH2 y CH3, mientras que la IgG2 y la IgG3 de llama son isótipos únicamente de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y que no contienen cadenas ligeras. Se ha encontrado que los dominios VHH de camélidos se unen a un antígeno con alta afinidad (Desmyter *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001) y poseen alta estabilidad en solución (Ewert *et al.*, *Biochemistry* 41:3628-36, 2002). Los fragmentos solo con VH clásicos son

difíciles de producir en forma soluble, pero se pueden obtener mejoras en la solubilidad y la unión específica cuando se alteran los restos marco para ser más similares a VH1. (Véase, por ejemplo, Reichman, *et al.*, J Immunol Methods 1999, 231:25-38.) Se describen métodos para generar anticuerpos que tienen cadenas pesadas de camélidos en, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos números 20050136049 y 20050037421.

5 El dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo es el fragmento de unión a antígeno completamente funcional más pequeños con una masa molecular de solo 15 kDa, esta entidad se denomina nanocuerpo (Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Research 64:2853-57, 2004). Se puede generar una biblioteca de nanocuerpos a partir de un dromedario inmunizado como se describe en Conrath *et al.*, (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001) o usando métodos recombinantes como se describe en Revets *et al*, Expert Opin. Biol. Ther. 5(1):111-24 (2005).

10 15 Se describe la producción de Fab-scFv biespecíficos ("bicuerpos") y Fab-(scFv)(2) triespecíficos ("tricuerpos") en Schoonjans *et al.* (J Immunol. 165:7050-57, 2000) y Willems *et al.* (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). Para los bicuerpos o los tricuerpos, una molécula scFv se fusiona con una de las cadenas VL-CL (L) o VH-CH1 (Fd), por ejemplo, para producir un tricuerpo, se fusionan dos scFv al extremo C de Fab mientras que en un bicuerpo se fusiona un scFv con el extremo C de Fab.

20 25 Se ha descrito un "minicuerpo" que consiste en un scFv fusionado a CH3 mediante un enlazador peptídico (sin bisagras) o mediante una bisagra de IgG en Olafsen, *et al.*, Protein Eng Des Sel. 17(4):315-23, 2004.

30 35 Los intracuerpos son anticuerpos monocatenarios que demuestran una expresión intracelular y pueden manipular la función de la proteína intracelular (Biocca, *et al.*, EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004). Los intracuerpos, que comprenden secuencias de señalización celular que retienen la construcción del anticuerpo en regiones intracelulares, pueden producirse como se describe en Mhashilkar *et al* (EMBO J 14:1542-51,1995) y Wheeler *et al.* (FASEB J. 17:1733-5. 2003). Los transcuerpos son anticuerpos permeables a células en los que un dominio de transducción de proteínas (PTD) se fusiona con anticuerpos de fragmentos variables monocatenarios (scFv) Heng *et al.*, (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005).

40 45 Se contemplan además anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de la inmunoglobulina con un dominio de unión específicas de una proteína diana. Estas construcciones son polipéptidos monocatenarios que comprenden dominios de unión a antígenos fusionados con dominios de la inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras de los anticuerpos. Véase, por ejemplo, documento WO03/041600, publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030133939 y publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030118592.

### 35 **Anticuerpos multiespecíficos**

50 55 En algunas realizaciones, puede ser deseable generar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) dirigidos contra diana que tengan especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes de la misma o diferentes moléculas. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítopos diferentes de la molécula diana. Como alternativa, un brazo del anticuerpo específico de diana puede combinarse con un brazo que se une a la molécula de la superficie celular, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para la IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular a la diana. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan o reconocen la diana. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a diana y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, antiinterferón-60, alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')2).

60 65 De acuerdo con otra estrategia para producir anticuerpos biespecíficos, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros. Véase el documento WO96/27011.

70 75 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divultan en la Pat. de EE.UU. N.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

80 85 90 95 100 Se han descrito también en la bibliografía las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos

de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando la unión química. Brennan *et al.*, (Science 229:81-83, 1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')2. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditióles próximos y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. En otra realización adicional más, Los fragmentos Fab'-SH recuperados directamente de E. coli se pueden acoplar químicamente *in vitro* para formar anticuerpos biespecíficos. (Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))

Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')2 biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de E. coli y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. (Kostelnik *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553, 1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos.

Los fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada (VH) conectada a una región variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (scFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Como alternativa, el anticuerpo biespecífico puede ser un "anticuerpo lineal" producido como se describe en Zapata *et al.* Protein Eng. 8:1057-62 (1995). Los anticuerpos lineales comprenden una pareja de segmentos Fd en tandem (VH -CH1-VH-CH1) que forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespécíficos.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo recombinante quelante (CRAb). Un anticuerpo recombinante quelante reconoce epítopos adyacentes y no solapantes del antígeno diana, y es suficientemente flexible para unirse a ambos epítopos simultáneamente (Neri *et al.*, J Mol Biol. 246:367-73, 1995).

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. (Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60, 1991).

#### 45 Anticuerpos químéricos y humanizados

Debido a que los anticuerpos químéricos o humanizados son menos inmunógenos en seres humanos que los anticuerpos monoclonales de precursores n humanos (por ejemplo, ratón), se pueden usar para el tratamiento de seres humanos con mucho menos riesgo de anafilaxia.

Se pueden generar anticuerpos monoclonales químéricos, en que los dominios de Ig variables de un anticuerpo monoclonal no humano (por ejemplo, de ratón) se fusionan con dominios de Ig constantes humanos, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica (Véase Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855 (1984); y, Boulian et al, Nature 312, 643-646, (1984)).

Se pueden conseguir anticuerpos humanizados mediante varios métodos que incluye, por ejemplo: (1) insertando las regiones determinantes de la complementariedad no humanas (CDR) sobre un marco humano y una región constante (un proceso denominado en la técnica como humanizante a través de un "injerto en la CDR"), (2) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "camuflándolos" con una superficie de tipo humana mediante la sustitución de restos superficiales (un proceso denominado en la técnica como "barnizado"), o, como alternativa, (3) sustituir los aminoácidos humanos en las posiciones determinadas para que sea poco probable que afecte negativamente tanto la unión a antígeno como el plegado de la proteína, pero es probable reducir la inmunogenicidad en un entorno humano (por ejemplo, HUMAN ENGINEERING™). En la presente divulgación, los anticuerpos humanizados incluirán anticuerpos "humanizados", "barnizados" y "HUMAN ENGINEERED™". Estos métodos se divultan en, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522 525 (1986); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.,

81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeffer *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31:169-217 (1994); Studnicka *et al.* patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 5.766.886; Studnicka *et al.*, (*Protein Engineering* 7: 805-814, 1994; Co *et al.*, *J. Immunol.* 152, 2968-2976 (1994); Riechmann, *et al.*, *Nature* 332:323-27 (1988); y Kettleborough *et al.*, *Protein Eng.* 4:773-783 (1991).

5 El injerto de la CDR implica introducir una o más de las seis CDR de los dominios Ig variables de la cadena pesada y ligera de ratón en las cuatro regiones marco adecuadas de los dominios de Ig variables humanos. Esta técnica (Riechmann, *et al.*, *Nature* 332:323-27 (1988)), utiliza las regiones marco conservadas (FR1-FR4) como una estructura para apoyar los bucles de la CDR que son los contactos principales con el antígeno. Una desventaja del injerto de la CDR, sin embargo, es que puede dar como resultado un anticuerpo humanizado que tiene una afinidad de unión sustancialmente más baja que la del anticuerpo de ratón original, debido a que los aminoácidos de las regiones marco pueden contribuir a la unión del antígeno, y debido a que los aminoácidos de los bucles de la CDR pueden influenciar la asociación de los dos dominios de Ig variables. Para mantener la afinidad del anticuerpo monoclonal humanizado, puede mejorarse la técnica de injerto de la CDR seleccionando la regiones marco humanas que se asemejan más estrechamente a las regiones marco del anticuerpo de ratón original, y mediante mutagénesis dirigida a sitio de aminoácidos individuales dentro del marco o las CDR ayudándose mediante una modelización informática del sitio de unión a antígeno (por ejemplo, Co *et al.*, *J. Immunol.* 152, 2968-2976 (1994)).

10

15

#### **Anticuerpos humanos procedentes de animales transgénicos**

20 Se pueden producir también anticuerpos humanos contra una proteína diana usando animales transgénicos que no tienen producción endógena de inmunoglobulina y están diseñados mediante ingeniería genética para contener los loci de la inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el documento WO 98/24893 divulga animales transgénicos que tienen un locus Ig humano en donde los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de los loci endógenos de las cadenas pesada y ligera. El documento WO 91/00906 divulga también hospedadores de mamíferos no primates transgénicos capaces de montar una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, en donde los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primates, y en donde los loci que codifican la inmunoglobulina endógena están sustituidos o inactivados. El documento WO 96/30498 y la patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 6.091.001 divulgan el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de la inmunoglobulina en un mamífero, tal como para sustituir toda o una parte de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. El documento WO 94/02602 divulga hospedadores de mamíferos no humanos que tienen loci de Ig endógenos inactivados y loci de Ig funcionales. La patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 5.939.598 divulga métodos de preparar ratones transgénicos en que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas, y expresan un locus de inmunoglobulina exógeno que comprende una o más regiones constantes xenogénicas. Véanse también, las Patentes de Estados Unidos números 6.114.598, 6.657.103 y 6.833.268.

25

30

35

Usando un animal transgénico descrito anteriormente, se puede producir una respuesta inmunitaria a una molécula antigénica seleccionada, y se pueden eliminar las células productoras de anticuerpos del animal y usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Se conocen en la técnica protocolos de inmunización, adyuvantes y similares, y se usan en la inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico como se describe en el documento WO 96/33735. Esta publicación divulga anticuerpos monoclonales contra varias moléculas antigénicas que incluyen IL-6, IL-8, TNFa, CD4 humano, L selectina, gp39 y toxina del tétanos. Se pueden ensayar anticuerpos monoclonales para determinar la capacidad de inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la proteína correspondiente. El documento WO 96/33735 divulga que los anticuerpos monoclonales contra IL-8, derivados de células inmunitarias de ratones transgénicos inmunizados con IL-8, bloquearon las funciones de los neutrófilos inducidas por IL-8. Se divulgan también anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por el antígeno usados para inmunizar animales transgénicos en el documento WO 96/34096 y la solicitud de patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 20030194404; y la solicitud de patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 20030031667.

40

45

50

55 Los animales transgénicos adicionales útiles para preparar anticuerpos monoclonales incluyen el Medarex HuMAb-MOUSE®, descrito en la patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 5.770.429, y el Fishwild, *et al.* (*Nat. Biotechnol.* 14:845-851 (1996)), que contiene secuencias génicas de genes de anticuerpos humanos no ordenados que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos. La inmunización de un HuMAb-MOUSE® permite la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos de la proteína diana.

60

Además, Ishida *et al.* (*Cloning Stem Cells.* 4:91-102 (2002)) describen el TransChromo Mouse (TCMOUSE™) que comprende segmentos del tamaño de megabases de ADN humano y que incorpora los loci completos de la inmunoglobulina humana (hlg). El TCMOUSE™ tiene un repertorio de hlg completamente diverso, incluyendo todas las subclases de IgG (IgG1-G4). La inmunización de TCMOUSE™ con diversos antígenos humanos produce respuestas de anticuerpos que comprenden anticuerpos humanos.

Véanse también Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Brugermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); y la patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 5.591.669, patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 5.589.369, patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 5.545.807; y la publicación de patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 20020199213. La publicación de patente de Estados Unidos n.<sup>o</sup> 20030092125 describe métodos para sesgar la respuesta inmunitaria de un animal al epítopo deseado. También pueden generarse anticuerpos humanos mediante

65

linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275).

#### **Anticuerpos humanos procedentes de tecnología de expresión**

- 5 El desarrollo de tecnologías para preparar repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes y la expresión de los fragmentos de anticuerpos codificados sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, ha proporcionado un medio para preparar anticuerpos humanos directamente. Los anticuerpos producidos mediante tecnología de fagos se producen como fragmentos de unión a antígeno-usualmente fragmentos Fv o Fab-en bacterias y por tanto, carecen de funciones efectoras. Se pueden introducir funciones efectoras mediante una de dos estrategias: Los fragmentos se 10 pueden diseñar mediante ingeniería genética, por ejemplo, en anticuerpos completos para la expresión en células de mamíferos, o en fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de unión capaz de estimular una función efectora.
- 15 La presente divulgación contempla un método para producir un anticuerpo específico de diana o una porción de unión a antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos sobre fagos, cribando la biblioteca con proteína diana o una porción de la misma, aislando el fago que se une a la diana, y obteniendo el anticuerpo a partir del fago. A modo de ejemplo, un método para preparar la biblioteca de anticuerpos para usar en las técnicas de expresión de fagos comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende los loci de la inmunoglobulina humana con antígeno diana o una porción antigénica del mismo para crear 20 una respuesta inmunitaria, extrayendo células productoras de anticuerpos del animal inmunizado; aislando el ARN de las células extraídas, transcribiendo de forma inversa en ARN para producir ADNc, amplificando el ADNc usando un cebador, e insertando el ADNc en un vector de expresión de fagos de tal manera que se expresen los anticuerpos en el fago. Se pueden obtener anticuerpos recombinantes específicos de diana de la divulgación de esta manera.
- 25 En otro ejemplo, se pueden extraer células productoras de anticuerpos de animales no inmunizados, aislar el ARN de las células extraídas y transcribirse de manera inversa para producir ADNc, que se amplifica usando un cebador, y se inserta en un vector de expresión de fagos de tal manera que los anticuerpos se expresan sobre el fago. Los procesos de expresión en fagos imitan la selección inmunitaria mediante la expresión de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de un bacteriófago filamento, y la posterior selección del fago por su unión a un antígeno de elección. Uno de dichas técnicas se describe en el documento WO 99/10494, que describe el aislamiento de 30 anticuerpos de alta afinidad y anticuerpos agonísticos funcionales de los receptores MPL y msk usando dicha estrategia. Se pueden aislar anticuerpos de la divulgación cribando una biblioteca recombinante de anticuerpos combinatorios, preferentemente, una biblioteca de expresión de fagos scFv, preparada usando ADNc de VL y VH humanas preparadas a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Se conocen en la técnica las metodología para preparar y cribar dichas bibliotecas. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.969.108. Existen kits 35 comercialmente disponibles para generar bibliotecas de expresión en fagos (por ejemplo, el Sistema de anticuerpos recombinantes en fagos de Pharmacia, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos Stratagene SurfZAP.TM. n.º de catálogo 240612). Existen también otros métodos y reactivos que se pueden usar para generar y cribar bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Ladner *et al.* patente de Estados Unidos n.º 5.223.409;
- 40 Kang *et al.* Publicación PCT n.º WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación PCT n.º WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación PCT n.º WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación PCT n.º WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación PCT n.º WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación PCT n.º WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación PCT n.º WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse *et al.* (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, Nature (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) EMBO J 12:725-734; 45 Hawkins *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) Nature 352:624-628; Gram *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.
- 50 En una realización, para aislar anticuerpos humanos específicos del antígeno diana con las características deseadas, se criban unas bibliotecas de VH y VL humanas para seleccionar fragmentos de anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferentemente bibliotecas de scFv preparadas y cribadas como se describe en el presente documento y en la técnica (McCafferty *et al.*, Publicación PCT n.º WO 92/01047, McCafferty *et al.*, (Nature 348:552-554 (1990)); y Griffiths *et al.*, (EMBO J 12:725-734 (1993)). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se criban preferentemente usando una proteína diana como antígeno.
- 55 Como alternativa, el fragmento Fd (VH-CH1) y la cadena ligera (VL-CL) de anticuerpos se clonian por separado mediante la PCR y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas combinatorias de expresión en fagos, que se pueden seleccionar a continuación para la unión a un antígeno concreto. Los fragmentos Fab se expresan sobre la superficie del fago, es decir, unidos físicamente a los genes que los codifican. Por consiguiente, la selección del Fab por la unión 60 al antígeno selecciona simultáneamente las secuencias que codifican Fab, que se pueden amplificar posteriormente. Mediante varios ciclos de unión a antígenos y reamplificación, un procedimiento denominado selección por adsorción, Los Fab específicos del antígeno se enriquecen y finalmente se aislan.
- 65 En 1994, se describió una estrategia para la humanización de anticuerpos, denominada "selección guiada". La selección guiada utiliza la potencia de la técnica de expresión en fagos para la humanización de anticuerpos monoclonales de ratón (Véase Jespers, L. S., *et al.*, Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). Para esto, el fragmento Fd

del anticuerpo monoclonal de ratón se puede expresar en combinación con una biblioteca de cadenas ligeras humanas, y la biblioteca Fab híbrida resultante puede seleccionarse a continuación con el antígeno. El fragmento Fd de ratón proporciona un molde para guiar la selección. Posteriormente, las cadenas ligeras humanas seleccionadas se combinan con una biblioteca de fragmentos Fd humana. La selección de la biblioteca resultante da como resultado 5 Fab completamente humanos.

Se han descrito varios procedimientos para derivar anticuerpos humanos de bibliotecas de expresión en fagos (Véanse, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991); Patentes de Estados Unidos números 5.565.332 y 5.573.905; Clackson, T., y Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 10 (1994)). En particular, la selección y evolución *in vitro* de anticuerpos derivados de bibliotecas de expresión en fagos ha llegado a ser una herramienta poderosa (Véanse Burton, D. R., y Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20020004215 y el documento WO 92/01047; la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030190317; y las 15 patentes de los Estados Unidos números 6.054.287 y 5.877.293).

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193 (2002), y publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030044772, publicado el 6 de marzo de 2003, describe métodos para cribar bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos u otras moléculas de unión mediante captura en elevación, un método que implica la 20 inmovilización de las moléculas de unión candidatas sobre un soporte sólido.

Los fragmentos Fv se expresan sobre la superficie del fago, mediante la asociación de una cadena expresada como una proteína de fusión del fago (por ejemplo, con el gen M13 III) expresándose la cadena complementaria como un fragmento soluble. Se contempla que el fago pueda ser un fago filamentoso tal como uno de los fagos de clase I: fd, 25 M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff y uno de los fagos Xf de la clase II, Pf1 y Pf3. El fago puede ser M13, o fd o un derivado del mismo.

Una vez que se seleccionan los segmentos VL y VH iniciales humanos, se llevan a cabo los experimentos de "mezclar 30 y combinar", en los cuales, diferentes parejas de segmentos VL y VH inicialmente seleccionados se criban para la unión a diana, para seleccionar las combinaciones de parejas de VL/VH preferidas. Además, para mejorar adicionalmente la calidad del anticuerpo, los segmentos VL y VH de la(s) pareja(s) preferida se pueden mutar aleatoriamente, preferentemente dentro de cualquiera de las regiones CDR1, CDR2 o CDR3 de VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración por afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración por afinidad *in vitro* se puede llevar a cabo amplificando 35 las regiones VL y VH usando los cebadores de la PCR complementarios a las CDR1, CDR2 y CDR3 de VH, o a las CDR1, CDR2, y CDR3 de VL, respectivamente, con cebadores que se han "enriquecido" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en determinadas posiciones de tal manera que los productos de la PCR resultantes codifiquen los segmentos VL y VH en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de VH y/o VL. Estos segmentos VL y VH mutados aleatoriamente se pueden volver a cribar para la unión a un antígeno diana.

40 Tras el cribado y el aislamiento de un anticuerpo específico de diana a partir de una biblioteca recombinante de expresión en inmunoglobulinas, se puede recuperar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado a partir del paquete de expresión (por ejemplo, a partir del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas convencionales de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpos de la divulgación, como se describe a continuación. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula hospedadora de mamífero, como se describe en el presente documento.

45 Se contempla que el método de expresión en fagos pueda llevarse a cabo en una cepa mutadora de bacterias o célula hospedadora. Una cepa mutadora es una célula hospedadora que tiene un defecto genético que hace que el ADN replicado dentro de esta mute con respecto a su ADN precursor. Son ejemplos de células mutadoras NR9046mutD5 y NR9046 mut T1.

50 Se contempla también que se pueda llevar a cabo el método de expresión en fagos usando un fago auxiliar. Este es un fago que se usa para infectar células que contienen un genoma de fago defectivo y que funciona complementando el defecto. El genoma del fago defectivo puede ser un fagémido o un fago con secuencias génicas que codifican alguna función eliminadas. Son ejemplos de fagos auxiliares M13K07, M13K07 gen III n.º 3; y que expresan fagos o que codifican una molécula de unión fusionada a una proteína de la cápsida.

55 Se generan también anticuerpos mediante métodos de cribado de expresión en fagos usando una estrategia combinatoria doblemente jerárquica como se divulga en el documento WO 92/01047 en que una colonia individual que contiene tanto un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específica de cadena doble resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de expresión en fagos tales como las descritas en el anterior. Esta técnica se divulga también en Marks *et al.*, (Bio/Technology, 10:779-783 (1992)).

Se han usado también métodos para la expresión de péptidos sobre la superficie de levaduras, microbios y células de mamíferos para identificar anticuerpos específicos de antígenos. Véanse, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 5.348.867; 5.723.287; 6.699.658; Wittrup, Curr Op. Biotech. 12:395-99 (2001); Lee et al, Trends in Biotech. 21(1)

5 45-52 (2003); Surgeeva et al, Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 1622-54 (2006). Las bibliotecas de anticuerpos pueden estar unidas a proteínas de levaduras, tales como aglutinina, imitando eficazmente la expresión de la superficie celular de los anticuerpo por linfocitos B en el sistema inmunitario.

10 Además de los métodos de expresión en fagos, se pueden aislar anticuerpos usando métodos de expresión *in vitro* y la expresión de células microbianas, incluyendo la expresión en ribosomas y la expresión en ARNm (Amstutz et al, Curr. Op. Biotech. 12: 400-05 (2001)). Se describe la selección del polipéptido usando la expresión en ribosomas en Hanes et al., (Proc. Natl Acad Sci USA, 94:4937-4942 (1997)) y patentes de Estados Unidos números 5.643.768 y 5.658.754 otorgadas a Kawasaki. Es también útil la expresión en ribosomas para un análisis mutacional rápido a gran escala de los anticuerpos. La estrategia de la mutagénesis selectiva proporciona también un método para producir 15 anticuerpos con actividades mejoradas que se pueden seleccionar usando técnicas de expresión en ribosomas.

#### **Variantes de la secuencia de aminoácidos**

20 Se contempla que se generen composiciones polipeptídicas modificadas que comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis CDR de un anticuerpo, en donde una CDR se altera para proporcionar especificidad o afinidad aumentadas por la molécula diana. Los sitios con CDR de anticuerpos están normalmente modificados en serie, por ejemplo, sustituyendo en primer lugar con elecciones conservativas (por ejemplo, los aminoácidos hidrófobos sustituidos por un aminoácido hidrófobo no idéntico) y a continuación con más elecciones diferentes (por ejemplo, un aminoácido hidrófobo sustituido por un aminoácido cargado), y a continuación se pueden realizar delecciones o inserciones en el 25 sitio diana. Por ejemplo, usando las secuencias marco conservadas que rodean las CDR, los cebadores de la PCR complementarios a estas secuencias consenso se generan para amplificar la secuencia de la CDR específica de antígeno localizadas entre las regiones de los cebadores. Están bien establecidas en la materia las técnicas para clonar y expresar secuencias de nucleótidos y polipéptidos [véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> edición, Cold Spring Harbor, New York (1989)]. Las secuencias de la CDR amplificadas están 30 ligadas en un plásmido adecuado. El plásmido que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis CDR clonadas contiene opcionalmente regiones que codifican polipéptidos adicionales unidas a la CDR.

35 Las sustancias de anticuerpos que comprenden las CDR modificadas se criban para la afinidad de unión por el antígeno original. Además, el anticuerpo o polipéptido se ensaya adicionalmente para su capacidad de neutralizar la actividad de los antígenos diana. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden analizarse como se muestra en los Ejemplos para determinar su capacidad de interferir con la actividad biológica del antígeno diana.

40 Se pueden hacer modificaciones mediante sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas descritas con mayor detalle a continuación. Las "inserciones" o las "delecciones" están preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 10 aminoácidos. Se puede introducir la variación sistemáticamente haciendo sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica de un anticuerpo usando técnicas de ADN recombinante y evaluando las variantes recombinantes resultantes para la actividad. Se pueden 45 hacer alteraciones de ácidos nucleicos en los sitios que difieren en los ácidos nucleicos de diferentes especies (posiciones variables) o en regiones muy conservadas (regiones constantes). Se describen con mayor detalle a continuación los método para alterar secuencias de anticuerpos y expresar composiciones polipeptídicas de anticuerpos útiles en la divulgación.

50 Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo con un intervalo de longitudes de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N o el anticuerpo (que incluye un fragmento de anticuerpo) fusionado a una etiqueta de epítopo o un epítopo de un receptor de rescate. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo, por ejemplo en el extremo N o extremo C.

55 La expresión "epítopo etiquetado" se refiere a un anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítopo. El polipéptido de la etiqueta de epítopo tiene suficientes restos para proporcionar un epítopo contra el cual se puede producir un anticuerpo, que incluso es suficientemente corto de modo que no interfiere con la actividad del anticuerpo. La etiqueta del epítopo es de forma preferente suficientemente única con el fin de que el anticuerpo no reaccione sustancialmente en cruzado con otros epítopos. Los polipéptidos con etiquetas adecuados en general tienen al menos 6 restos de aminoácidos y generalmente entre aproximadamente 8-50 restos de aminoácidos (preferentemente entre 60 aproximadamente 9-30 restos). Los ejemplos incluyen el polipéptido con la etiqueta de la hemaglutinina de la gripe (HA) y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la anterior (Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5:3610-16 (1985)); y la etiqueta de la glicoproteína D del virus del Herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering 3:547-53 (1990)). Otras etiquetas ilustrativas son una secuencia de polihistidina, generalmente alrededor de seis restos de histidina, que permite el aislamiento de un compuesto marcado de esta manera usando la quelación con níquel. Otros marcadores

y etiquetas, tales como la etiqueta FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), bien conocidos y usados rutinariamente en la técnica, están abarcados por la divulgación.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "epítopo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

10 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Se contempla la mutagénesis de sustitución dentro de cualquiera de las regiones hipervariables o de las CDR o las regiones marco. Las sustituciones conservativas implican sustituir un aminoácido con otro miembro de su clase. Las sustituciones no conservativas implican sustituir un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

15 15 Las sustituciones de aminoácidos conservativas se realizan sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o en la naturaleza antípatica de los restos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina (Ala, A), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), prolina (Pro, P), fenilalanina (Phe, F), triptofano (Trp, W) y metionina (Met, M); los aminoácidos neutros polares incluyen glicina (Gly, G), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), cisteína (Cys, C), tirosina (Tyr, Y), asparagina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q); los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina(Arg, R), lisina (Lys, K) e histidina (His, H); y 20 los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E).

25 Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

### **Maduración por afinidad**

30 La maduración por afinidad implica generalmente preparar y cribar variantes de anticuerpos que tienen sustituciones dentro de las CDR de un anticuerpo precursor y seleccionar variantes que tienen una o más propiedades biológicas mejoradas tales como la afinidad de unión con respecto al anticuerpo precursor. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando una biblioteca de expresión en fagos. En resumen, diversos sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) pueden estar mutados para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del paquete M13 en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión). Véase, por ejemplo, documento WO 92/01047, documento WO 93/112366, documentos WO 95/15388 y WO 93/19172.

40 40 Los métodos actuales de maduración por afinidad del anticuerpo pertenecen a dos categorías de mutagénesis: estocástica y no estocástica. PCR propensa a errores, cepas bacterianas mutadoras (Low *et al.*, J. Mol. Biol. 260, 359-68 (1996) Irving *et al.*, Immunotechnology 2, 127-143 (1996)) y mutagénesis de saturación (Nishimiya *et al.*, J. Biol. Chem. 275:12813-20 (2000); Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85 (2002)) son ejemplos típicos de métodos de mutagénesis estocásticos (Rajpal *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71 (2005)). Las técnicas no estocásticas utilizan a menudo el barrido de alanina o la mutagénesis dirigida a sitio para generar colecciones limitadas de variantes específicas. A continuación, se describen algunos métodos en detalle.

50 50 *Selección mediante maduración por afinidad* Los métodos de maduración por afinidad de anticuerpos recombinantes se llevan a cabo comúnmente a través de varios ciclos de selección por adsorción de anticuerpos candidatos en presencia de cantidades decrecientes de antígenos. Disminuir la cantidad de antígeno por ciclo selecciona los anticuerpos con la mayor afinidad por el antígeno dando como resultado por tanto anticuerpos de alta afinidad de una combinación grande de material de partida. La maduración por afinidad mediante selección por adsorción es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Huls *et al.* (Cancer Immunol Immunother. 50:163-71 (2001)). Se describen métodos de maduración por afinidad usando tecnologías de expresión en fagos en otras partes en el presente documento y se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Daugherty *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2029-34 (2000)).

60 60 *Mutagénesis de búsqueda-La mutagénesis de búsqueda (LTM)* (Rajpal *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71 (2005)) proporciona un método para cartografiar rápidamente el sitio de unión al anticuerpo. Para la LTM, se seleccionan nueve aminoácidos, representativos de las químicas de cadenas principales laterales proporcionados por los 20 aminoácidos naturales, para diseccionar las contribuciones de las cadenas laterales funcionales para la unión en cada posición en las seis CDR de un anticuerpo. La LTM genera una serie posicional de mutaciones individuales dentro de una CDR donde cada resto natural es sistemáticamente sustituido por uno de nueve aminoácidos seleccionados. Las CDR mutadas se combinan para generar bibliotecas combinatorias de fragmentos individuales de cadena variable (scFv) de complejidad y tamaño crecientes sin llegar a ser prohibitivas para la expresión cuantitativa de todas las variantes. Tras una selección positiva, se secuenciaron clones con una unión mejorada, y se

cartografiaron mutaciones beneficiosas.

**PCR propensa a errores** -La PCR propensa a errores implica la aleatorización de ácidos nucleicos entre diferentes ciclos de selección. La aleatorización se produce a velocidad baja, mediante la tasa de error intrínseco de la polimerasa usada, pero puede potenciarse mediante la PCR propensa a error (Zaccolo *et al.*, J. Mol. Biol. 285:775-783 (1999)) usando una polimerasa que tiene una tasa de error intrínseco durante la transcripción (Hawkins *et al.*, J Mol Biol. 226:889-96 (1992)). Tras los ciclos de mutación, los clones con afinidad mejorada por el antígeno se seleccionan usando métodos rutinarios en la técnica.

10 **Intercambio de cadenas de ADN**-El intercambio de cadenas de ácido nucleico es un método para la recombinación homóloga *in vitro* o *in vivo* de combinaciones de polinucleótidos más cortos o más pequeños para producir variantes de polinucleótidos. El intercambio de cadenas de ADN se ha descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.605.449, Patente de Estados Unidos 6.489.145, documento WO 02/092780 y Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-51 (1994). En general, El intercambio de cadenas de ADN está comprendido por 3 etapas: la fragmentación de los genes que van a intercambiar las cadenas con la ADNasa I, la hibridación aleatoria de fragmentos y el reensamblado o relleno del gen fragmentado por la PCR en presencia de la ADN polimerasa (PCR sexual), y la amplificación del producto reensamblado mediante la PCR convencional.

15 El intercambio de cadenas del ADN difiere de la PCR propensa a errores en que es una reacción en cadena inversa. 20 En la PCR propensa a errores, el número de sitios de inicio de la polimerasa y el número de moléculas crece exponencialmente. Por el contrario, en el reensamblaje del ácido nucleico o en el intercambio de cadenas de polinucleótidos aleatorio, el número de sitios de unión y el número (pero no el tamaño) de los polinucleótidos aleatorios disminuye en el tiempo.

25 En el caso de un anticuerpo, El intercambio de cadenas de ADN permite la asociación combinatoria libre de todas las CDRI con todas las CDR2 con todas las CDR3, por ejemplo. Se contempla que múltiples familias de secuencias pueden intercambiar cadenas en la misma reacción. Además, el intercambio de cadenas conserva generalmente el orden relativo, de manera que, por ejemplo, CDR1 no se encontrará en la posición de CDR2. Los intercambios de cadenas raros contendrán un gran número de las mejores CDR (por ejemplo, las de mayor afinidad) y se pueden 30 seleccionar estos intercambios de cadenas poco frecuentes basándose en su afinidad superior.

35 El molde de polinucleótido que se puede usar en el intercambio de cadenas de ADN puede ser ADN o ARN. Puede ser de diversas longitudes dependiendo del tamaño del gen o del polinucleótido más corto o más pequeño que se va a recombinar o reensamblar. Preferentemente, el molde del polinucleótido es de 50 pb a 50 kb. El molde del polinucleótido debe ser a menudo bicatenario.

40 Se contempla que los polinucleótidos de ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios que tienen regiones de identidad con el molde del polinucleótido y regiones de heterología con el molde del polinucleótido puedan añadirse al molde del polinucleótido, durante la etapa inicial de la selección génica. Se contempla que dos moldes de polinucleótidos diferentes pero relacionados puedan mezclarse durante la etapa inicial.

45 **Barrido de alanina** - Se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Cunningham y Wells, (Science 244:1081-1085 (1989)). Se identifican un resto o grupo de restos diana (p. ej., restos cargados tales como Arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferente alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución.

50 **Diseño asistido por ordenador** - Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno, o para usar software informático para modelar dichos puntos de contacto. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y 55 se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

60 Como alternativa, o además, se pueden usar otras varias técnicas de maduración conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, las técnicas descritas en las aplicaciones de patente publicadas WO2009/088933; WO2009/088928; WO2009/088924; así como en Clackson *et al.*, Nature 352:624-628, 1991; Marks *et al.*, Biotechnology 10:779-783, 1992; Virnekas *et al.*, Nucleic Acids Res. 22:5600-5607, 1994; Glaser *et al.*, J. Immunol. 149:3903-3913, 1992; Jackson *et al.*, J. Immunol. 154:3310-3319, 1995; Schier *et al.*, J. Mol. Biol. 255:28-43, 1996; y Yang *et al.*, J. Mol. Biol. 254:392-403, 1995.

## 65 **Glicosilación alterada**

También se pueden producir variantes de anticuerpo que tengan un patrón de glicosilación alterado con respecto al anticuerpo precursor, por ejemplo, eliminación de uno o más restos de carbohidrato del anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

- 5 La glicosilación de anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. Por 10 consiguiente, Los sitios de glicosilación ligados a N se pueden añadir a un anticuerpo alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de estas secuencias de tripéptido. La glicosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más frecuentemente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Los sitios de 15 glicosilación ligados a O se pueden añadir a un anticuerpo insertando o sustituyendo uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original.

Los glicanos Fc alteran la unión de la IgG a los receptores Fc y a C1q y, por tanto, son importantes para las funciones efectoras de IgG. Se pueden producir variantes de anticuerpos con glicanos Fc modificados y funciones efectoras alteradas. Por ejemplo, los anticuerpos con azúcares modificados en sus extremos, como ácidos siálicos, fucosa 20 nuclear, N-acetilglucosamina bisectante y restos de manosa pueden alterar la unión al receptor FcγRIIIa y alterar la actividad ADCC. En un ejemplo adicional, los anticuerpos con restos de galactosa modificados en sus extremos pueden alterar la unión a C1q y alterar la actividad CDC (Raju, Curr. Opin. Immunol. 20: 471-78 (2008)).

- 25 También se contemplan moléculas de anticuerpos con fucosilación ausente o reducida que presentan una actividad ADCC mejorada. Se conocen en la materia distintas formas de realizar esto. Por ejemplo, la actividad ADCC efectora está mediada por la unión de la molécula de anticuerpo al receptor FcγRIII, que se ha comprobado que es dependiente de la estructura del carbohidrato de la glicosilación vinculada a N en el Asn-297 del dominio CH2. Los anticuerpos no fucosilados se unen a este receptor con mayor afinidad y activan las funciones efectoras mediadas por FcγRIII- de forma más eficaz que los anticuerpos naturales fucosilados. Por ejemplo, la producción recombinante de anticuerpos 30 no fucosilados en células CHO, en las que la enzima alfa-1,6-fucosil transferasa se ha desactivado genéticamente, da como resultado un anticuerpo con actividad ADCC 100 veces mayor (Yamane-Ohnuki *et al.*, Biotechnol Bioeng. 87:614-22 (2004)). Se pueden conseguir efectos similares mediante la disminución en la actividad de estas u otras enzimas en la ruta de fucosilación, por ejemplo, a través de un tratamiento con ARNip o tratamiento con ARN de sentido contrario, líneas celulares genomanipuladas para desactivar genéticamente enzima(s), o por cultivo con 35 inhibidores selectivos de la glicosilación (Rothman *et al.*, Mol Immunol. 26:1113-23 (1989)). Algunas cepas de células hospedadoras, por ejemplo Lec13 o la línea de células YB2/0 de hibridoma de rata producen anticuerpos de forma natural con niveles de fucosilación más bajos. (Shields *et al.*, J Biol Chem. 277:26733-40 (2002); Shinkawa *et al.*, J Biol Chem. 278:3466-73 (2003)). Un aumento en el nivel de carbohidrato bisectriz, por ejemplo mediante la producción recombinante de anticuerpos en células que expresan un exceso de enzima GnTIII, también se ha determinado que 40 aumenta la actividad ADCC (Umana *et al.*, Nat Biotechnol. 17:176-80 (1999)). Se ha previsto que la ausencia de solo uno de los dos restos de fucosa puede ser suficiente para aumentar la actividad ADCC (Ferrara *et al.*, Biotechnol Bioeng. 93:851-61 (2006)).

#### **Variantes con función efectora alterada**

- 45 Se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. En un aspecto, puede ser deseable modificar el anticuerpo de la divulgación con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Un método para modificar la función efectora enseña que se pueden introducir uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, (J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)) and Shope, B. (J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, (Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)). Como alternativa, 50 puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al.*, (Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)). Asimismo, se ha comprobado que las secuencias internas de la CDR pueden hacer que un anticuerpo se una a MHC de Clase II y disparar una respuesta de linfocitos T auxiliares no deseada. Una sustitución conservativa puede permitir que el anticuerpo retenga su actividad de unión pero pierda su capacidad para disparar 55 una respuesta de linfocitos T auxiliares no deseada. Véase también Steplewski *et al.*, (Proc Natl Acad Sci U S A. 85:4852-56 (1998)), que describieron anticuerpos químéricos en donde una región variable de murino se unía con las regiones constantes gamma 1, gamma 2, gamma 3 y gamma 4 humanas.

- 60 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración en el tumor, por ejemplo. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semivida en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas

tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacáridos, a los fragmentos de anticuerpo para aumentar la semivida. Esto también puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, mediante la mutación de la región adecuada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítopo en una etiqueta peptídica que posteriormente se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquiera de los extremos o en medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica) (Véase, por ejemplo, documento WO96/32478).

El epítopo de unión del receptor de rescate constituye, preferentemente, una región en donde uno cualquiera o más restos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio de Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferentemente, se transfieren tres o más restos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferentemente, el epítopo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3, o VH, o más de una de dichas regiones, del anticuerpo. Como alternativa, el epítopo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o a la región VL o a ambas, del fragmento de anticuerpo. Véanse también las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478 que describen las variantes de Fc y su interacción con el receptor de rescate.

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una porción Fc humana, una porción Fc humana de consenso, o una variante de la misma que retenga su capacidad de interactuar con el receptor de rescate Fc, incluidas variantes en las que se han modificado o eliminado las cisteínas involucradas en la unión por puente disulfuro, y/o en las que se añade una metilamina al extremo N y se eliminan uno o más de los 20 aminoácidos del extremo N y/o regiones que interactúan con el complemento, tales como el sitio de unión a C1q, se eliminan y/o el sitio ADCC se elimina [véase, por ejemplo, Sarmay *et al.*, Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)].

Los estudios previos cartografiaron el sitio de unión en la IgG humana y de murino para FcR principalmente en la región bisagra inferior compuesta por los restos de IgG 233-239. Otros estudios propusieron segmentos amplios adicionales, por ejemplo, Gly316-Lys338 para el receptor I de FC humano, Lys274-Arg301 y Tyr407-Arg416 para el receptor III de Fc humano Fc, o encontraron unos pocos restos específicos fuera de la región bisagra, por ejemplo, Asn297 y Glu318 de IgG2b de murino interactuando con el receptor II de Fc de murino. El informe de la estructura cristalina de 3,2-Å del fragmento Fc de la IgG1 humana con el receptor IIIA de FC humano delineó los restos Leu234-Ser239, de la IgG1, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 y Ala327-Ile332 como implicados en la unión al receptor IIIA de Fc. Se ha sugerido basándose en la estructura cristalina que la adición a los restos de la bisagra inferior (Leu234-Gly237), en los bucles FG del dominio CH2 de la IgG (restos 326-330) y BC (restos 265-271) puede jugar un papel en la unión al receptor IIA de Fc. Véase Shields *et al.*, (J. Biol. Chem., 276:6591-604 (2001)). La mutación de los restos dentro de los sitios de unión al receptor Fc puede dar como resultado la alteración de la función efectora, tal como una alteración de la actividad ADCC o CDC, o una alteración de la semivida. Como se ha descrito anteriormente, las mutaciones potenciales incluyen la inserción, delección o sustitución de uno o más restos, incluyendo la sustitución con alanina, una sustitución conservativa, una sustitución no conservativa, o la sustitución con un resto de aminoácido correspondiente en la misma posición de una subclase de IgG diferente (sustituyendo, por ejemplo, un resto de IgG1 con un resto de IgG2 correspondiente en esta posición).

Shields *et al.* notificaron que los restos de IgG1 involucrados en la unión a todos los receptores de Fc humanos están situados en el dominio CH2 cercano a la bisagra y se clasifican en dos categorías, de la siguiente forma: 1) las posiciones que pueden interactuar directamente con todos los FcR incluyen Leu234-Pro238, Ala327 y Pro329 (y posiblemente Asp265); 2) las posiciones que alteran la naturaleza o la posición del carbohidrato incluyen Asp265 y Asn297. Los restos de IgG1 adicionales que alteran la unión al receptor Fc II son los siguientes: (efecto más grande) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298 y (menos efecto) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 y Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A y D270A reducen la unión. Además de los restos anteriormente identificados para todos los FcR, los restos de IgG1 adicionales que reducen la unión al receptor Fc IIIA en un 40 % o más son los siguientes: Ser239, Ser267 (solo Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 y Asp376. Las variantes que mejoran la unión al FcRIIIA incluyen T256A, K290A, S298A, E333A, K334A y A339T. Lys414 mostró una reducción del 40 % en la unión a FcRIIA y FcRIIB, Arg416, una reducción del 30 % en la unión a FcRIIA y FcRIIIA, Gln419, una reducción del 30 % a FcRIIA y una reducción del 40 % a FcRIIB, y Lys360, una mejora del 23 % a FcRIIIA. Véase también Presta *et al.*, (Biochem. Soc. Trans. 30:487-490, 2001), que describe varias posiciones en la región Fc de IgG1 para las que se ha descubierto una unión mejorada solamente a receptores (R) Fc gamma específicos o mejoraron simultáneamente la unión a un tipo de R de Fc gamma y una unión reducida a otro tipo. Las variantes de IgG1 seleccionadas con unión mejorada a RIIIa de Fc gamma se analizaron a continuación en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) *in vitro* y mostraron una mejora en la ADCC cuando se usaron tanto células mononucleares de sangre periférica como linfocitos citolíticos naturales.

Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 describe variantes con función efectora alterada que contienen mutaciones en la región Fc de la IgG humana, en la posición de aminoácido 329, 331 o 322 (usando la numeración de Kabat), algunas de las cuales presentan una unión a C1q de expresión reducida o actividad CDC. Como otro ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.737.056, describe variantes con función efectora alterada o mutaciones que contienen la unión al receptor Fc-gamma en la región Fc de la IgG humana, en la posición de los aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286,

289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 (usando la numeración de Kabat), algunas de las cuales presentan perfiles de unión al receptor con una reducción en la actividad ADCC o CDC. De estas, se ha indicado que una mutación en la posición de los aminoácidos 238, 265, 269,

5 270, 327 o 329 reduce la unión a FcRI, se ha indicado que una mutación en la posición de los aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 reduce la unión a FcRII, y se ha indicado que una mutación en la posición de los aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 reduce la unión a FcRIII.

10 La patente de Estados Unidos n.º 5.624.821 notifica que la actividad de unión a Clq de un anticuerpo de murino se puede alterar por mutación del resto de aminoácido 318, 320 o 322 de la cadena pesada y que la sustitución del resto 297 (Asn) da como resultado la eliminación de la actividad lítica.

15 La publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040132101 describe variantes con mutaciones en las posiciones de los aminoácidos 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 o 332 (usando la numeración de Kabat) o en las posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 o 332 (usando la numeración de Kabat), o que dichas mutaciones en las posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 o 332 pueden reducir la actividad ADCC o reducir la unión a un receptor Fc gamma.

20 Chappel *et al.* (Proc Natl Acad Sci U S A. 88:9036-40 (1991)) informan que la actividad citofílica de IgG1 es una propiedad intrínseca de su dominio CH2 de cadena pesada. Las mutaciones puntuales en cualquiera de los restos de aminoácidos 234-237 de IgG1 disminuyeron significativamente o detuvieron su actividad. Se requirió la sustitución de todos los restos 234-237 (LLGG) de IgG1 en IgG2 e IgG4 para restaurar completamente la actividad de unión. Se observó que un anticuerpo contra IgG2 que contenía la secuencia ELLGGP completa (restos 233-238) era más activo que la IgG1 natural.

25 Isaacs *et al.* (J Immunol. 161:3862-9 (1998)) notifican que las mutaciones dentro de un motivo crítico para la unión a de Fc gammaR (glutamato 233 a prolina, leucina/fenilalanina 234 a valina y leucina 235 a alanina) evitaron completamente el agotamiento de las células diana. La mutación del glutamato 318 a alanina eliminó la función efectora de la IgG2b de ratón y redujo también la potencia de la IgG4 humana.

30 Armour *et al.* (Mol Immunol. 40:585-93 (2003)) identificaron variantes de IgG1 que reaccionan con el receptor activante,, FcgammaRIIa, al menos 10 veces menos eficazmente que la IgG1 natural pero cuya unión al receptor inhibidor, FcgammaRIIb, está solo reducida cuatro veces. Se realizaron mutaciones en la región de los aminoácidos 233-236 y/o en las posiciones de los aminoácidos 327, 330 y 331. Véase también el documento WO 99/58.572.

35 Xu *et al.* (J Biol Chem. 269:3469-74 (1994)) notifican que mutando en la IgG1 Pro331 a Ser, disminuyó marcadamente la unión a C1q y se eliminó virtualmente la actividad lítica. Por el contrario, la sustitución de Pro por Ser331 en IgG4 mejoró la actividad lítica parcial (40 %) de la variante Pro331 de la IgG4.

40 Schuurman *et al.* (Mol Immunol. 38:1-8 (2001)) notifican que mutando una de las cisteínas bisagra implicadas en la formación del enlace intercadena pesada, Cys226, la serina dio como resultado un enlace intercadena pesada más estable. Mutando la secuencia bisagra de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys a la secuencia bisagra de IgG1, Cys-Pro-Pro-Cys estabiliza también marcadamente la interacción covalente entre las cadenas pesadas.

45 Angal *et al.* (Mol Immunol. 30:105-8 (1993)) notifican que mutar la serina en la posición del aminoácido 241 en la IgG4 a prolina (que se encuentra en esta posición en IgG 1 e IgG2) conduce a la producción de un anticuerpo homogéneo, así como a una extensión de la semivida en suero y a una mejora en la distribución tisular en comparación con la IgG4 químérica original.

### Modificaciones covalentes

50 55 Las modificaciones covalentes del anticuerpo están también incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Se pueden realizar mediante síntesis química o mediante escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos de los extremos N o C.

60 65 Los restos de cisteinilo se hacen reaccionar muy frecuentemente con α-haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α-bromo-β-(5-imidozoil)propionílico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los restos de histidilo se derivatizan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil el bromuro de parabromofenacilo; la reacción se lleva a cabo preferentemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

5 Los restos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pantanodiona, y una reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.

10 10 Los restos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de los restos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Adicionalmente, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo épsilon-amino de la arginina.

15 15 Se puede realizar la modificación específica de restos de tirosilo, con particular interés en la introducción de marcadores espectrales en restos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetyl tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo se yodian usando  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para usar 20 en radioinmunoensayo.

25 25 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ( $\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}''$ ), en que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los restos de aspartilo y glutamilo se convierten en restos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones de amonio.

30 30 Los restos glutaminilo y asparaginilo están frecuentemente desamidados a los restos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos restos se desamidan en condiciones neutras o en condiciones básicas. La forma desamidada de estos restos se encuentra dentro del alcance de esta divulgación.

35 35 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos serilo o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina del extremo N y la amidación de los grupos carboxilo del extremo C.

40 40 Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, los azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 y en Aplin y Wriston, (CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981)).

45 45 La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo se puede realizar química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto del ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando a la vez el anticuerpo intacto. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin, et al., (Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)) y por Edge et al., (Anal. Biochem. 118: 131 (1981)). Se puede conseguir la escisión enzimática de 50 restos de carbohidratos en anticuerpos mediante el uso de varias endoglicoxidasas y exoglicosidasas como se describe por Thotakura et al., (Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)).

55 55 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de varios polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado, polioxialquilenos, o polímeros de polisacáridos tales como dextrano. Se conocen dichos métodos en la técnica, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192, 4.179.337, 4.766.106, 4.179.337, 4.495.285, 4.609.546 o EP 315 456.

## Derivados

60 60 Tal como se ha indicado anteriormente, derivado se refiere a polipéptidos químicamente modificados mediante técnicas tales como la ubiquitinación, marcado (por ejemplo, con radionucleidos o diversas enzimas), unión covalente del polímero tal como PEGilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina. Los derivados de la sustancia de anticuerpo de la invención, tales como un anticuerpo biespecífico, son también útiles como agentes terapéuticos y se pueden producir mediante los métodos del presente documento.

Se pueden incorporar restos conjugados o unirse a una sustancia de anticuerpo tanto de forma covalente, como mediante enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals o enlaces de hidrógeno, por ejemplo, incorporación de nucleótidos radioactivos, o nucleótidos biotinilados que son reconocidos mediante estreptavidina.

- 5 Se puede unir polietilenglicol (PEG) a las sustancias de anticuerpos para proporcionar una semividia más larga *in vivo*. El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio del PEG variará preferentemente entre aproximadamente 2 kiloDalton ("kD") y aproximadamente 100 kDa, más preferentemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, lo más preferente entre 10 aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG se unirán generalmente a las sustancias de anticuerpos de la divulgación mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo natural o diseñado mediante ingeniería molecular en el resto PEG (por ejemplo, un aldehído, amino, tiol, o grupo éster) a un 15 grupo reactivo en la sustancia de anticuerpo (por ejemplo, un aldehído, amino, o un grupo éster). Se puede llevar a cabo la adición de restos PEG a las sustancias de anticuerpos usando técnicas bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Publicación Internacional n.º WO 96/11953 y la patente de Estados Unidos n.º 4.179.337.

La ligadura de la sustancia de anticuerpo con PEG tiene lugar usualmente en fase acuosa y puede controlarse fácilmente mediante HPLC analítica en fase inversa. Las sustancias PEGiladas se purifican mediante HPLC preparativa y se caracterizan mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masa con 20 desorción por láser.

### **Conjugados de anticuerpos**

25 Se puede administrar un anticuerpo en su forma "pura" o sin conjugar, o puede conjugarse directamente a otros agentes terapéuticos o diagnósticos, o puede conjugarse indirectamente a polímeros vehículos que comprenden dichos otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En algunas realizaciones el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjungado). Entre los agentes quimioterapéuticos adecuados se incluyen: daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) anteriormente citado). Las 30 toxinas adecuadas incluyen: las toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria; toxinas vegetales tales como ricina; toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al.* J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-81 (2000); Mandler *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler *et al.*, Bioconjugate Chem. 13,786-91 (2002)), maitansinoides (Documento EP 1391213; Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-23 (1996)); 35 auristatinas (Doronina *et al.*, Nat. Biotech. 21: 778-84 (2003) y caliqueamicina (Lode *et al.*, Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman *et al.*, Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)).

40 Los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable mediante el uso de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) marcadores o luminiscentes o bioluminiscentes (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, y similares. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para llevar a cabo dicho marcado; por ejemplo, véase (Sternberger, L.A. *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. *et al.*, Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. *et al.*, Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

45 La conjugación de restos de anticuerpos se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.306.393. Las técnicas generales se describen también en Shih *et al.*, Int. J. Cancer 41, 832-839 (1988); Shih *et al.*, Int. J. Cancer 46, 1101-1106 (1990); y Shih *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.057.313. Este método general implica hacer reaccionar un 50 componente de anticuerpo que tiene una porción de carbohidrato oxidada con un polímero vehículo que tenga al menos una función amina libre y que este cargado con una pluralidad de fármaco, toxina, quelante, sumandos de boro, u otros agentes terapéuticos. Esta reacción da como resultado un enlace con una base de Schiff inicial (imina), que puede estabilizarse por reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

55 El polímero vehículo puede ser, por ejemplo, un aminodextrano o polipéptido de al menos 50 restos de aminoácidos. Se conocen en la materia diversas técnicas para conjugar un fármaco u otro agente al polímero vehículo. Se puede usar un polipéptido vehículo en vez de aminodextrano, pero el polipéptido vehículo debe tener al menos 50 restos de aminoácidos en la cadena, preferentemente en 100-5000 restos de aminoácidos. Al menos algunos de los aminoácidos deben ser restos de lisina o restos de glutamato o aspartato. Las aminas colgantes de restos de lisina y los carboxilatos colgantes de glutamina y aspartato son convenientes para unirse a un fármaco, toxina, inmunomodulador, quelante, sumandos de boro u otro agente terapéutico. Los ejemplos de vehículos polipéptídicos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, copolímeros de los mismos, y los polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, que confieren propiedades de solubilidad deseables sobre el vehículo y conjugado cargados resultantes. Los ejemplos de agentes a los cuales el anticuerpo puede conjugarse incluyen cualquiera de los agentes citotóxicos o quimioterapéuticos descritos en el presente documento.

65 Como alternativa, se pueden preparar anticuerpos conjugados conjugando directamente un componente de anticuerpo con un agente terapéutico. En procedimiento general es análogo al método indirecto de conjugación excepto que un

agente terapéutico se une directamente a un componente de anticuerpo oxidado. Por ejemplo, un resto carbohidrato de un anticuerpo puede unirse al polietilenglicol para extender la semivida.

Como alternativa, un agente terapéutico puede unirse a la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante la formación de un enlace disulfuro, o usando un reticulante heterobifuncional, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP). Yu *et al.*, Int. J. Cancer 56:244 (1994). Son bien conocidas en la materia las técnicas generales de dicha conjugación. Véase, por ejemplo, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslasis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods", en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch *et al.* (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter *et al.* (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). Se conocen en la técnica varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como Propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como Clorhidrato de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoibenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

### Proteínas de fusión de anticuerpos

Son bien conocidos en la técnica los métodos para preparar proteínas de fusión de anticuerpos. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.306.393. Las proteínas de fusión de anticuerpos que comprenden un resto de interleuquina-2 se describen por Boleti *et al.*, Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet *et al.*, Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank *et al.*, Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), y Hu *et al.*, Cancer Res. 56:4998 (1996). Asimismo, Yang *et al.*, (Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995)), describen una proteína de fusión que incluye un fragmento F(ab')2 y un resto alfa del factor de necrosis tumoral. Se describen ejemplos adicionales de proteínas de fusión de anticuerpos en Pastan *et al.*, Nat. Reviews Cancer 6: 559-65 (2006).

Los métodos de preparar proteínas de fusión de toxinas de anticuerpos en los que una molécula recombinante comprende uno o más componentes de anticuerpos y los expertos en la técnica también conocen una toxina o agente quimioterapéutico. Por ejemplo, Chaudhary *et al.* han descrito también proteínas de fusión de la exotoxina A de Pseudomonas con anticuerpo, Nature 339:394 (1989), Brinkmann *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman *et al.*, J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels *et al.*, Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya *et al.*, J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan *et al.*, Biochemistry 35:2872 (1996), y Schmidt *et al.*, Int. J. Can. 65:538 (1996). Kreitman *et al.* han descrito proteínas de fusión de toxina con anticuerpo que contienen un resto de toxina de la difteria, Leukemia 7:553 (1993), Nicholls *et al.*, J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson *et al.*, J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), y Vallera *et al.*, Blood 88:2342 (1996). Deonarain *et al.*, Tumor Targeting 1:177 (1995), han descrito una proteína de fusión de toxina con anticuerpo que tiene un resto de ARNasa, mientras que Linardou *et al.*, Cell Biophys. 24-25:243 (1994), produjeron una proteína de fusión de toxina con anticuerpo que comprendía un componente de la ADNasa I. Se usó gelonina como el resto de toxina en la proteína de fusión de toxina con anticuerpo de Wang *et al.*, Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., 2-6 de abril, 1995, Parte 1, BIOT005. Como un ejemplo adicional, Dohlsten *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994), notificó una proteína de fusión de toxina con anticuerpo que comprendía la enterotoxina-A estafilocócica.

De forma ilustrativa, las toxinas que se emplean de manera adecuada en la preparación de dichas proteínas de fusión son ricina, abrina, ribonucleasa, ADNasa I, Enterotoxina-A estafilocócica, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina de la difteria, Exotoxina de Pseudomonas, y endotoxina de Pseudomonas. Véase, por ejemplo, Pastan *et al.*, Cell 47:641 (1986), y Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Los expertos en la materia conocen otras toxinas adecuadas.

Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden usar en ADEPT conjugando el anticuerpo a una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, Véase el documento WO81/01145) para un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO88/07378 y la patente de Estados Unidos n.º 4.975.278.

El componente enzimático del inmuconojugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en la presente divulgación incluyen, aunque no de forma limitativa, la fosfatasa alcalina, útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; la arilsulfatasa, útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; la citosina desaminasa, útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles para convertir los profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir los profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden los carbohidratos tales como α-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir los profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa, útil para convertir

fármacos derivatizados con  $\beta$ -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidadas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, anticuerpos con actividad enzimática, conocidos también en la técnica como abzimas, se pueden usar para convertir los profármacos de la

5 divulgación en fármacos activos libres (Véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987). Se pueden preparar conjugados de abzima con anticuerpos como se describe en el presente documento para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

10 Las enzimas anteriores pueden unirse covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas bien conocidas en la materia tales como el uso de los reactivos de reticulación descritos anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprendan al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención, unidas a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención, usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia (Véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312:604-608 (1984))

## 15 Producción de anticuerpos recombinantes

Se puede aislar el ADN que codifica un anticuerpo de la presente divulgación y secuenciarse usando procedimientos convencionales (usando, por ejemplo, sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos). Usualmente, esto requiere la clonación del ADN o, preferentemente, el ARNm (es decir, ADNc) que codifica los anticuerpos. La clonación y la secuenciación se llevan a cabo usando técnicas convencionales, tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press; Ausubel, *et al.* (Eds.), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994))).

25 Las reacciones con sondas de nucleótidos y otras reacciones de hibridación de nucleótidos se llevan a cabo en condiciones que permiten la identificación de polinucleótidos que se hibridan entre sí en condiciones especificadas. Un conjunto de condiciones ilustrativo es el siguiente: hibridación restrictiva a 42 °C en formamida al 50 %, 5X SSC, 20 mM Na•PO<sub>4</sub>, pH 6,8; y lavado en 1X SSC a 55 °C durante 30 minutos. Son bien conocidas las fórmulas para calcular las condiciones de hibridación equivalentes y/o seleccionar otras condiciones para conseguir un nivel deseado 30 de restricción. Se entiende en la técnica que se pueden conseguir condiciones de restricción equivalentes mediante la variación de la temperatura y el tampón, o la concentración salina, como se describe en Ausubel, *et al.* (Eds.), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994), págs. 6.0.3 a 6.4.10. Se pueden determinar empíricamente modificaciones en las condiciones de hibridación o calcularse con precisión basándose en la longitud y el porcentaje 35 de emparejamiento de bases de guanosina/citosina (GC) de la sonda. Se pueden calcular las condiciones de hibridación como se describe en Sambrook, *et al.*, (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York (1989), págs. 9.47 a 9.51

Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "aislada" o una secuencia de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que tanto (1) se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia de forma ordinaria en la fuente natural del ácido nucleico o (2) se clona, 40 amplifica, etiqueta, o se distingue de otra forma de los ácidos nucleicos del fondo de tal manera que la secuencia del ácido nucleico de interés que se puede determinar, se considera aislada. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o configuración distinta de en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, 45 una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan normalmente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

50 Una fuente de ARN usada para la clonación y la secuenciación es un hibridoma producido obteniendo un linfocito B a partir del ratón transgénico y fusionando el linfocito B con una célula inmortal. Una ventaja de usar hibridomas es que se pueden cribar fácilmente, y un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano de interés seleccionado. Como alternativa, se puede aislar el ARN de linfocitos B (o de bazo completo) del animal inmunizado. Cuando se usan fuentes diferentes de hibridomas, puede ser deseable cribar las inmunoglobulinas o los péptidos de inmunoglobulinas que codifican secuencias con características de unión específicas. Un método para dicho cribado es el uso de 55 tecnología de expresión en fagos. La expresión en fagos se describe además en el presente documento y es también bien conocida en la materia. Véase, por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO 91/17271, McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047, y Caton y Koprowski, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-54 (1990)). En una realización que utiliza tecnología de expresión en fagos, se aísla el ADNc de un ratón transgénico inmunizado (por ejemplo, el ADN total de bazo), se usa la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar unas secuencias de ADNc que codifican una porción de un polipéptido de la inmunoglobulina, por ejemplo, regiones de la CDR, y las secuencias amplificadas se insertan en un vector de fago. Los ADNc que codifican los péptidos de interés, por ejemplo, los péptidos de la región variable con características de unión deseadas, se identifican mediante técnicas convencionales tales como selección por adsorción.

65 Normalmente, se determina la secuencia que codifica una región variable completa del polipéptido de la inmunoglobulina, sin embargo, este será adecuado algunas veces para secuenciar solo una porción de la región

variable, por ejemplo, la porción que codifica la CDR. Normalmente, la porción secuenciada tendrá al menos 30 bases de longitud, más a menudo, se secuenciará basándose en la codificación de al menos aproximadamente un tercio o al menos aproximadamente la mitad de la longitud de la región variable.

5 La secuenciación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. *et al.* (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467). Comparando la secuencia del ácido nucleico clonado con las secuencias publicadas de genes de la inmunoglobulina humana y los ADNc, un experto será capaz de determinar fácilmente, dependiendo de la región secuenciada, (i) la utilización del segmento de la línea germinal del polipéptido de la inmunoglobulina (incluyendo el isotipo de la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, incluyendo las secuencias resultantes de la adición de la región N y el proceso de mutación somática. Una fuente de información de la secuencia génica de la inmunoglobulina es el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

10 15 Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfecan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células 293 de riñón embrionario humano (p. ej., células 293E), células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que no producen de otra manera la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en la técnica.

20 25 30 La expresión secuencias de control se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente a un organismo hospedador concreto. Las secuencias de control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

35 El ácido nucleico está unido operativamente cuando se coloca en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se coloca de manera que facilite la traducción. En general, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante conexión en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

40 45 Células, línea de células y cultivo celular, se usan a menudo de manera indistinta y todas estas denominaciones en el presente documento incluyen la descendencia. Las células transformantes y células transformadas incluyen la célula objeto primaria y cultivos procedentes de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende también que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la explorada en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenda hacer denominaciones distintas, estas quedarán claras a partir del contexto.

50 55 60 65 70 En una realización alternativa, la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina de interés puede determinarse mediante secuenciación directa de la proteína. Se pueden diseñar secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas de acuerdo con una tabla codones universal.

Se pueden preparar variantes de secuencias de aminoácidos introduciendo cambio de nucleótidos adecuados en el ADN codificante, o mediante síntesis peptídica. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Puede efectuarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción de la molécula, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis mediante la PCR, y mutagénesis mediante casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

La presente divulgación proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos de la divulgación, unido operativamente de forma opcional para controlar secuencias reconocidas por una célula hospedadora, vectores y células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos, y técnicas recombinantes para la producción de anticuerpos, que pueden comprender cultivar la célula hospedadora con el fin de que se exprese el ácido nucleico y,

opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo o medio de cultivo de la célula hospedadora. Diversos sistemas y métodos para la producción de anticuerpo fueron revisados por Birch y Racher (Adv. Drug Deliv. Rev. 671:685 (2006)).

5 Para la producción recombinante de los anticuerpos, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para una clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, aunque no de forma limitativa, uno o más de los siguientes: una secuencia de señalización, un origen de replicación, uno o más 10 genes marcadores selectivos, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(1) *Componente de la secuencia de señalización*

15 Los anticuerpos de la presentar divulgación pueden producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señalización u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia de señalización es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señalización) por la célula hospedadora. Si las células hospedadoras procariotas no reconocen 20 y procesan la secuencia de señalización del anticuerpo nativo, la secuencia de señalización puede sustituirse por una secuencia de señalización seleccionada, por ejemplo, procedente del grupo de la pectato liasa (por ejemplo, pelB) fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp, o líderes de la enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, la secuencia de señalización nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, un líder del factor α (incluyendo los líderes del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el 25 líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señalización descrita en el documento WO90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias de señalización de mamíferos así como los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señalización gD del herpes simple.

30 El ADN para dicha región precursora se liga en un marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(2) *Origen del componente de la replicación*

35 Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes víricos son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el componente del origen de la replicación no 40 es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano).

(3) *Componente del marcador selectivo*

45 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen selectivo, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección normales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, tetraciclina, G418, geneticina, histidinol, o ácido micofenólico (b) deficiencias auxotróficas del complemento, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponible del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de bacilos.

50 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicho uso de selección dominante utilizan los fármacos metotrexato, neomicina, histidinol, puromicina, ácido micofenólico e higromicina.

55 Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de la metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

60 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mix), un antagonista competitivo de DHFR. Se emplea una célula hospedadora adecuada cuando el DHFR natural está en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

65 Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente los hospedadores naturales que contienen DHFR

endógeno) transformado o transformado simultáneamente con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de la divulgación, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglicosido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para usar en levadura es el gen trpl presente en el plásmido YRp7 de levadura (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282: 39 (1979)). El gen trpl proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano o, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, (*Genetics* 85:12 (1977)). La presencia de la lesión de trpl en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona a continuación un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, Las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas por plásmidos conocidos que soportan el gen Leu2. Las cepas de levadura deficientes en Ura3 son complementadas por plásmidos que soportan el gen ura3.

Asimismo, se pueden usar vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 µm para la transformación de las levaduras de Kluyveromyces. Como alternativa, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante fue notificado para K. lactis Van den Berg, (*Bio/Technology*, 8:135 (1990)). Se han divulgado también vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de Kluyveromyces (Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)).

*(4) Componente del promotor*

Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los promotores adecuados para usar con hospedadores procariotas incluyen el promotor phoA de la arabinosa (por ejemplo, araB), los sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp), y promotores híbridos tales como el promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo de la divulgación.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en la dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAT, en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar con hospedadores de levadura incluyen los promotores de la 3-fosglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para usar en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus de leucemia de Abelson, virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, más preferentemente citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, Virus 40 de simios (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de la inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que contiene también el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos que usan el virus del papiloma bovino como un vector se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297: 598-601 (1982), que describe la expresión de ADNc de β-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, se puede utilizar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous usada como

promotor.

*(5) Componente del elemento potenciador*

- 5 La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente divulgación por eucariotas superiores a menudo se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucarióticas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el 10 potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' desde el promotor.

15 *(6) Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en las células hospedadoras eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente 20 disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el anterior. Otro terminador de la transcripción de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón.

25 *(7) Selección y transformación de células hospedadoras*

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores del presente documento son las células de procariotas, levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados 30 para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como Escherichia, por ejemplo, *E. coli*, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgada en el documento DD 266.710, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador 35 de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de 40 clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería común, es el más utilizado habitualmente entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilicola* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomicetos* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

50 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles varias cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori* y dichos virus pueden utilizarse de acuerdo con la presente divulgación, especialmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

55 Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, tabaco, lenteja de agua y otras células vegetales también pueden usarse como hospedadores.

60 Los ejemplos de líneas celulares de mamífero hospedadoras útiles son células de ovario de hámster chino, incluidas las células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 y células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaubet *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, (Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, (Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1, ATCC

CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humanas (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

5 Las células hospedadoras se transforman o transfecitan con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutriente convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Asimismo, los vectores novedosos y las líneas celulares transfecitadas con múltiples copias de unidades de transcripción separadas por un marcador de selección son especialmente útiles y preferidos para la expresión de anticuerpos que se unen a dianas.

10 (8) *Cultivo de las células hospedadoras*

15 Las células hospedadoras utilizadas para producir el anticuerpo de la presente divulgación se pueden cultivar en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles tales como de Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Asimismo, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, (Meth. Enz. 58: 44, 20 1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO90103430; WO 87/00195; o patente de EE.UU. n.º 30.985 se puede usar como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones adecuadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tal como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes 25 para el experto en la materia.

30 (9) *Purificación de anticuerpos*

35 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio, incluido a partir de cultivos microbianos. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Better *et al.* (Science 240:1041-43, 1988; ICSU Short Reports 10:105 (1990); y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:457-461 (1993) describen un procedimiento para aislar 40 anticuerpos que se secretan hacia el espacio periplásmico de E. coli. [Véanse también, (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)].]

45 La composición de anticuerpo preparada a partir de células microbianas o de mamífero puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita catiónica o cromatografía de intercambio aviar, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas γ1, γ2 o γ4 (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para γ3 humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH 3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE® en una resina de intercambio 55 aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

**Método de cribado**

60 Una terapia eficaz depende de identificar agentes efectivos desprovistos de toxicidad significativa. Los anticuerpos se pueden cribar según su afinidad de unión por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ensayos de desplazamiento en gel, transferencias Western, ensayo de competición radiomarcado, fraccionamiento simultáneo mediante cromatografía, coprecipitación, reticulación, ELISA y similares, son de utilidad, que se describen en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY.

65 Los métodos de cribado de anticuerpos que modulan la actividad de un antígeno diana pueden comprender poner en

contacto los anticuerpos de ensayo con un polipéptido diana y analizar la presencia de un complejo entre el anticuerpo y el ligando diana. En tales ensayos, el ligando normalmente está marcado. Después de una incubación adecuada, el ligando libre se separa del que está presente en forma unida, y la cantidad de marcador libre o no complejado es una medida de la capacidad del anticuerpo en particular para unirse a dicho ligando diana.

- 5 Se puede emplear cribado de alto rendimiento para fragmentos de anticuerpo o CDR que tengan afinidad de unión suficiente por un polipéptido diana. En resumen, grandes cantidades de compuestos peptídicos experimentales pequeños y diferentes se pueden sintetizar sobre un sustrato sólido. Los anticuerpos peptídicos experimentales se ponen en contacto con polipéptido diana y se lavan. A continuación, los polipéptidos unidos se pueden detectar por 10 métodos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos purificados de la divulgación también se pueden revestir directamente sobre placas para usar en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente mencionadas. Asimismo, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar la diana e inmovilizarla sobre el soporte sólido.

- 15 Los métodos para evaluar la actividad biológica neutralizante de TGF $\beta$  y de los anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7,867,496. Los ejemplos de bioensayos *in vitro* incluyen: (1) inducción de la formación de colonias de células NRK en agar blando en presencia de EGF (Roberts *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5339-5343); (2) inducción de la diferenciación de células mesenquimales primitivas para expresar un fenotipo cartilaginoso (Seyedin *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2267-2271); (3) inhibición de crecimiento de células epiteliales de pulmón Mv1Lu (Danielpour *et al.* (1989) J. Cell. Physiol., 138:79-86) y células de riñón de mono BBC-1 (Holley *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5989-5992); (4) 20 inhibición de la mitogénesis de timocitos de ratón C3H/HeJ (Wrann *et al.* (1987) EMBO J., 6:1633-1636); (5) inhibición de diferenciación de células de mioblasto de rata L6 (Danielpour *et al.* (1986) J. Cell. Chem., 261:16509-16513); (6) medición de la producción de fibronectina (Wrana *et al.* (1992) Cell, 71:1003-1014); (7) inducción del promotor del inhibidor activador del plasminógeno I (PAI-1) fusionado a un gen indicador de la luciferasa (Abe *et al.* (1994) Anal. Biochem., 216:276-284); (8) enzimoinmunoanálisis de adsorción en sándwich (Danielpour *et al.* (1989) Growth Factors, 2:61-71); y (9) ensayos celulares descritos en Singh *et al.* (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett., 13(24):4355-4359.

- 30 En algunas realizaciones, la neutralización del anticuerpo de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 es al menos de 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más potente que la neutralización de TGF $\beta$ 3.

- Métodos adicionales para evaluar la actividad biológica y la neutralización de TGF $\beta$  (por ejemplo, con anticuerpos de TGF $\beta$ ) se proporcionan en los Ejemplos. Por ejemplo, la neutralización se puede medir con ensayos de neutralización y expresarse como un valor de CI50. El valor de CI50 se puede calcular para una molécula dada determinando la 35 concentración de molécula necesaria para activar la semiinhibición de la respuesta biológica máxima de una segunda molécula o actividad celular. Cuanto menor sea la CI50, mayor será la potencia de la molécula para inhibir la actividad de la proteína deseada. Los ensayos de neutralización ilustrativos contemplados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, un ensayo de liberación de interleucina-11 y un ensayo de proliferación de células HT-2/IL-4. Además, se puede llevar a cabo un ensayo de actividad de TGF $\beta$  para determinar si el anticuerpo inhibe 40 preferentemente una isoforma de TGF $\beta$ , incluyendo un ensayo de fosforilación de pSMAD o un ensayo de unión a rhLAP. En una realización adicional, el anticuerpo tiene una CI50 inferior (es decir, mejor unión, mayor potencia) para TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en comparación con TGF $\beta$ 3.

### Terapia de combinación

- 45 Un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar con un segundo agente útil para tratar una enfermedad o trastorno como se describe en el presente documento. Si se identifica más de un anticuerpo eficaz para unirse al antígeno diana, se contempla que dos o más anticuerpos contra diferentes epítopos del antígeno diana y/o que se unen preferentemente a diferentes isoformas de TGF $\beta$  se puedan mezclar de manera que la combinación de 50 anticuerpos entre sí proporciona una eficacia aún mayor contra una dolencia o trastorno asociado con el polipéptido diana. Las composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención se pueden administrar a personas o mamíferos que padecen, o tienen predisposición a padecer, una dolencia o trastorno que se va a tratar asociado con el polipéptido diana.
- 55 La administración simultánea de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, siempre que exista una superposición en el período de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, al igual que la administración en diferentes días o semanas.
- 60 Un segundo agentes terapéuticos puede ser otros agentes terapéuticos, tales como citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos dirigidos a otros抗ígenos diana, agentes antiinflamatorios, agentes anticoagulantes, agentes que inhibe la producción de matriz extracelular, agentes que disminuirán o reducirán la presión sanguínea, agentes que reducirán el colesterol, triglicéridos, LBD, VLDL o lipoproteína(a) o aumentar HDL, agentes que aumentarán o reducirán los niveles de proteínas reguladoras del colesterol, fármacos o moléculas antineoplásicos. Para pacientes con un trastorno hiperproliferativo, tal como un cáncer o un tumor, la combinación con modalidades de la segunda terapia tales como 65 radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica o cirugía también se consideran.

Se considera que el anticuerpo de la presente divulgación y el segundo agente se puedan administrar simultáneamente, en la misma formulación. Se contempla además que los agentes se administren en una formulación independiente y se administren concurrentemente, donde concurrentemente se refiere a agentes administrados con una diferencia de menos de 30 minutos entre sí.

5 En otro aspecto, el segundo agente se administra antes de la administración de la composición de anticuerpo. Antes de la administración se refiere a la administración del segundo agente en un plazo de una semana antes del tratamiento con el anticuerpo, un máximo de 30 minutos antes de la administración del anticuerpo. Se contempla además que el 10 segundo agente se administre después de la administración de la composición de anticuerpo. Se entiende que después de la administración describe la administración desde 30 minutos después del tratamiento con el anticuerpo hasta una semana después de la administración del anticuerpo.

15 Se contempla además que se puedan administrar otras terapias coadyuvantes, cuando sea apropiado. Por ejemplo, el paciente también puede recibir una proteína que degrade la matriz extracelular, terapia quirúrgica, quimioterapia, un agente citotóxico o radioterapia donde sea adecuado.

20 Se contemplan además que cuando el anticuerpo se administra junto con un segundo agente, tal como por ejemplo, en donde el segundo agente es una citocina o un factor de crecimiento o un agente quimioterapéutico, la administración también incluye el uso de un agente radioterapéutico o radioterapia. La radioterapia administrada junto con una 25 composición de anticuerpo se administra según determine el médico a cargo del tratamiento, y en las dosis generalmente administradas a los pacientes que se están tratando por cáncer.

30 Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, I131, I125, Y90 y Re186), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o toxinas sintéticas, o fragmentos de las mismas. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe ni previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Un agente citotóxico puede incluir un agente que se puede activar para que sea citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir una perla, liposoma, matriz o partícula (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. 2003/0028071 y 2003/0032995). Dichos agentes se pueden conjugar, acopiar, enlazar o asociar con un anticuerpo de acuerdo con la divulgación.

35 Los agentes quimioterapéuticos considerados para usar con los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, aunque no de forma limitativa, los relacionados en la Tabla I:

Tabla I

<b>Agentes alquilantes</b>	<b>Productos naturales</b>
<u>Mostazas de nitrógeno</u>	<u>Fármacos antimitóticos</u>
mecloretamida	<u>Taxanos</u>
ciclofosfamida	paclitaxel
ifosfamida	alcaloides de vinca
melfalán	vinblastina (VBL)
clorambucilo	vincristina
nitrosoureas	vinorelbina
carmustina (BCNU)	Taxotere® (docetaxel)
lomustina (CCNU)	estramustina
semustina (metil-CCNU)	fosfato de estramustina
<u>Etilenimina/Metil-melamina</u>	<u>Epipodofilotoxinas</u>
trietilmelamina (TEM)	etopósido
trietileno tiofosforamida (tiotepa)	tenipósido
hexametilmelamina (HMM, altretamina)	<u>Antibióticos</u>
alquilsulfonatos	actimomicina D
busulfán	daunomicina (rubidomicina)
<u>Triazinas</u>	doxorubicina (adriamicina)
dacarbazina (DTIC)	mitoxantrone/Idarrubicina bleomicina
<u>Antimetabolitos</u>	esplicamicina (mitramicina)
<u>Análogos de ácido fólico</u>	mitomicina C
metotrexato	dactinomicina
Trimetrexato	afidicolina
Pemetrexed (antifolato multidiana)	<u>Enzimas</u>
	L-asparaginasa
	L-arginasa
	<b>Radiosensibilizadores</b>

<u>Análogos de pirimidina</u> 5-fluorouracilo fluorodesoxiuridina gemcitabina citosina arabinósido (AraC, citarabina) 5-azacitidina 2,2'-difluorodesoxicitidina	metronidazol misonidazol desmetilmisonidazol pimonidazol etanidazol nimorazol RSU 1069 EO9 RB 6145 SR4233 nicotinamida 5-bromodesoxiuridina 5-yododesoxiuridina bromodesoxicitidina <b>Agentes diversos</b>
<u>Análogos de purina</u> 6-mercaptopurina 6-tioguanina azatioprina 2'-desoxicofomicina (pentostatina) eritrohidroxinonil-adenina (EHNA) fosfato de fludarabina 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)	Complejos de coordinación de platino cisplatino Carboplatino oxaliplatin Antracenodiona mitoxantrona  urea sustituida hidroxiurea
<b>Inhibidores de la topoisomerasa de tipo I</b> camptotecina topotecán irinotecán	
<b>Modificadores de la respuesta biológica</b> G-CSF GM-CSF	<u>Derivados de la metilhidrazina</u> N-metilhidrazina (MIH) procarbazina
<b>Agentes de diferenciación</b> derivados del ácido retinoico	supresor adrenocortical mitotano (o,p'-DDD) ainoglutetimida
<b>Hormonas y antagonistas</b>	

(continuación)

<b>Agentes alquilantes</b> Adrenocorticoesteroides/antagonistas prednisona y equivalentes dexametasona ainoglutetimida	<b>Productos naturales</b> <b>Citocinas</b> interferón ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) interleucina 2
<b>Progestinas</b> caproato de hidroxiprogesterona acetato de medroxiprogesterona acetato de megestrol	<b>Fotosensibilizadores</b> derivados de hematoporfirina Photofrin® derivados de benzoporfirinas Npe6 etioporfirina de estaño (SnET2) feoborida-a bacterioclorofila-a naftalociianinas ftalociianinas ftalociianinas de cinc
<b>Estrógenos</b> diétilestilbestrol etinil estradiol/equivalentes	<b>Radiación</b> Rayos X luz ultravioleta radiación gamma luz visible radiación infrarroja radiación con microondas
<b>Antiestrógenos</b> tamoxifeno	
<b>Andrógenos</b> propionato de testosterona fluoximesterona/equivalentes	
antiandrógenos flutamida análogos de la hormona liberadora de gonadotropina leuprolida	
<b>Antiandrógenos no esteroideos</b> flutamida	

También se contempla que el segundo agente sea un agente antifibrótico. Los ejemplos de agentes antifibróticos incluyen, aunque no de forma limitativa, otros agentes que reducen la actividad del factor beta de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) (incluido, aunque no de forma limitativa, GC-1008 (Genzyme/MedImmune); lerdelimumab (CAT-152; Trabio, Cambridge Antibody); metelimumab (CAT-192, Cambridge Antibody); LY-2157299 (Eli Lilly); ACU-

HTR-028 (Opko Health)) que incluyen anticuerpos que se dirigen a una o más isoformas de TGF- $\beta$ , inhibidores de las cinasas del receptor de TGF- $\beta$  TGFB1 (ALK5) y TGFB2, y moduladores de la rutas de señalización posterior al receptor; señalización del receptor de quimiocinas; antagonistas del receptor de endotelina incluidos los inhibidores que se dirigen a ambos receptores A y B de la endotelina, y aquellos que se dirigen selectivamente al receptor A de endotelina (que incluyen, aunque no de forma limitativa, ambrisentan; avosentan; bosentán; clazosentán; darusentán; BQ-153; FR-139317, L-744453; macitentán; PD-145065; PD-156252; PD163610; PS-433540; S-0139; sitaxentán sódico; TBC-3711; zibotentán); agentes que reducen la actividad del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (que incluye, aunque no de forma limitativa, FG-3019, FibroGen), y que también incluyen otros anticuerpos neutralizantes de CTGF; inhibidores de la metaloproteinasas de la matriz (MMP) (que incluye, aunque no de forma limitativa, MMPI-12, PUP-1 y triflutato de tigapotida); agentes que reducen la actividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que incluyen, aunque no de forma limitativa, erlotinib, gefitinib, BMS-690514, cetuximab, anticuerpos dirigidos al receptor de EGF, inhibidores de la cinasa del receptor del EGF y moduladores de las rutas de señalización posteriores al receptor; agentes que reducen la actividad del factor de crecimiento de derivado de plaquetas (CTGF) (que incluye, aunque no de forma limitativa, mesilato de imatinib (Novartis)) y que también incluyen anticuerpos neutralizantes de PDGF, anticuerpos dirigidos al receptor de PDGF (PDGFR), inhibidores de la actividad cinasa del receptor del PDGFR y las rutas de señalización posteriores al receptor; agentes que reducen la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (que incluyen, aunque no de forma limitativa, axitinib, bevacizumab, BIBF-1120, CDP-791, CT-322, IMC-18F1, PTC-299 y ramucirumab) y que también incluyen anticuerpos neutralizantes de VEGF, anticuerpos dirigidos al receptor 1 del VEGF (VEGFR1, Flt-1) y al receptor 2 del VEGF (VEGFR2, KDR), la forma soluble de VEGFR1 (sFlt) y derivados de los mismos que neutralizan VEGF, e inhibidores de la actividad cinasa del receptor del VEGF; inhibidores de cinasas de múltiples receptores tales como BIBF-1120 que inhibe las cinasas del factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento derivado de plaquetas; agentes que interfieren con la función de integrina (que incluyen, aunque no de forma limitativa, STX-100 e IMGN-388) y que también incluyen anticuerpos dirigidos a integrina; agentes que interfieren con las actividades profibróticas de la IL-4 (que incluyen, aunque no de forma limitativa, AER-001, AMG-317, APG-201 y si L-4Ra) y la IL-13 (que incluyen, aunque no de forma limitativa, AER-001, AMG-317, anrukizumab, CAT-354, besudotox de cintredequina, MK-6105, QAX-576, SB-313, SL-102 y TNX-650) y que también incluyen anticuerpos neutralizantes a cualesquera citocinas, anticuerpos que se dirigen al receptor de IL-4 o al receptor de IL-13, la forma soluble del receptor de IL-4 o derivados de los mismos para los que se ha informado que se unen y neutralizan tanto IL-4 como IL-13, proteínas químéricas que incluyen todo o parte de la IL-13 y una toxina especialmente endotoxina de pseudomonas, señalización mediante la ruta de la cinasa JAK- STAT; agentes que interfieren con la transición epitelial-mesenquimal incluidos los inhibidores de mTOR (que incluyen, aunque no de forma limitativa, AP-23573); agentes que reducen los niveles de cobre tales como tetratiomolibdato; agentes que reducen el estrés oxidativo incluidos N-acetil-cisteína y tetratiomolibdato; e interferón gamma. También se contemplan agentes que son inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) (que incluyen, aunque no de forma limitativa, Roflumilast); inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) (que incluyen, aunque no de forma limitativa, mirodenafilo, PF-4480682, citrato de sildenafilo, SLx-2101, tadalafilo, udenafilo, UK-369003, vardenafilo y zaprinast); o modificadores de las rutas metabólicas del ácido araquidónico incluyendo inhibidores de la ciclooxygenasa y de la 5-lipoxigenasa (que incluyen, aunque no de forma limitativa, Zileuton). También se contemplan compuestos que reducen la remodelación tisular o la fibrosis entre los que se incluyen inhibidores de la hirolasa (que incluyen, aunque no de forma limitativa, 1016548, CG-0089, FG-2216, FG-4497, FG-5615, FG-6513, fibrostatina A (Takeda), lufironil, P-1894B y safironil) y agonistas del receptor activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR)-gamma (que incluyen, aunque no de forma limitativa, pioglitazona y rosiglitazona).

Otros agentes antifibróticos considerados incluyen relaxina, pirfenidona, ufironilo, surifonilo, CAT-192, CAT-158; ambresentán, telina; FG-3019, un anticuerpo de CTGF; anticuerpo dirigido contra EGFR; un inhibidor de la cinasa del EGFR; tarceva; gefitinib; anticuerpo contra PDGF, inhibidor de la cinasa del PDGFR; gleevec; BIBF-1120, VEGF, FGF e inhibidor del receptor de PDGF; anticuerpo dirigido contra integrinas; anticuerpo de IL-4; tetratiomolibdato, un agente quelante del cobre; interferón-gamma; NAC, un profármaco de cisteína; factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); KGF; bloqueantes del receptor de angiotensina, inhibidores de ACE, inhibidores de renina; inhibidores de COX y LO; zileutón; monteleukast; avastina; estatinas; inhibidores de PDE5, tales como sildenafilo, udenafilo, tadalafilo, vardenafilo o zaprinast; rofumilast; etanercept (Enbrel); procoagulante; prostaglandinas, tales como PGE2, PRX-08066, un antagonista del receptor de 5HT2B; besudotox de cintredequina, una IL13 químérica humana conjugada con una exotoxina de Pseudomonas genomanipulada; roflumilast, un inhibidor de PDE4; FG-3019, un anticuerpo monoclonal humano dirigido al factor de crecimiento del tejido conjuntivo; GC-1008, un anticuerpo monoclonal de TGF- $\beta$  humano; treprostinilo, un análogo de prostacilina; interferón- $\alpha$ ; QAX-576, un modulador de IL13; WEB 2086, un antagonista del receptor de PAF; mesilato de imatinib; FG-1019; suramina; bosentán; IFN-1b; anti-IL-4; anti-IL-13; taurina, niacina, oligonucleótidos de sentido contrario NF- $\kappa$ B; e inhibidores de la óxido nítrico sintasa.

## 60 Tratamiento de los trastornos

La presente divulgación proporciona la inhibición de la actividad de la diana administrando n anticuerpo específico de diana a un paciente que lo necesita. Cualquiera de los tipos de anticuerpos que se describen en el presente documento pueden usarse terapéuticamente. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo específico de diana es un anticuerpo humano, químérico o humanizado. En otro ejemplo de realización, la diana es humana, y el paciente es un paciente humano. Como alternativa, el paciente puede ser un mamífero que expresa una proteína diana con la que reacciona

de forma cruzada el anticuerpo específico de diana. El anticuerpo se puede administrar a un mamífero no humano que expresa una proteína diana con la que el anticuerpo reacciona de manera cruzada (es decir, un primate) con fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. Dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos específicos de diana de la divulgación.

5 La divulgación proporciona el tratamiento de una dolencia o trastorno asociado con la expresión de TGF-β que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

- 10 Los ejemplos de dolencias o trastornos asociados con la expresión de TGFβ que se pueden tratar con una sustancia de anticuerpo que se une a TGFβ (por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación) incluyen cánceres, tales como cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma y melanoma, enfermedades de los ojos (por ejemplo, oculares, ópticas, oftálmicas u oftalmológicas), 15 las dolencias o trastornos, enfermedad, dolencias o trastornos asociados con fibrosis, por ejemplo, enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos, o enfermedades, dolencias o trastornos que tienen una fibrosis asociada.

Las enfermedades fibroproliferativas, dolencias, o trastornos fibroproliferativos, o las enfermedades que tienen una fibrosis asociada incluyen aquellas que afectan cualquier órgano o tejido en el cuerpo, incluyendo, aunque no de forma limitativa la piel, pulmón, riñón, corazón, cerebro y ojo. Las enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos, o las enfermedades que tienen una fibrosis asociada incluyen, aunque no de forma limitativa, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis peribronquial, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de las vías aéreas pequeñas (por ejemplo, bronquiolitis obstructiva), enfisema, síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), fibrosis pulmonar debida a agentes 20 infecciosos o tóxicos, fibrosis renal, glomerulonefritis de todas las etiología (GN), por ejemplo, GN proliferativa mesangial, GN inmunitaria y CN semilunar, glomeruloesclerosis, lesión tubulointersticial, fibrosis renal intersticial, fibrosis renal y todas las causa de fibrosis renal intersticial, fibrosis renal que es el resultado de complicaciones de exposición a fármacos, incluyendo el tratamiento con ciclosporina de receptores de trasplantes, por ejemplo, tratamiento con ciclosporina, nefropatía asociada al VIH, necropatía del trasplante, enfermedad renal diabética (por 25 ejemplo, nefropatía diabética), fibrosis sistémica nefrógena, diabetes, fibrosis retroperitoneal idiopática, esclerodermia, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas asociadas con una cicatrización excesiva y una esclerosis progresiva, incluyendo cirrosis hepática debida a todas las etiologías, trastornos del árbol biliar, disfunción hepática atribuible a infecciones, enfermedades fibroquísticas, enfermedades cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca congestiva; miocardiopatía dilatada, miocarditis, estenosis vascular, fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis cardíaca posterior a infarto), postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad venooclusiva, restenosis (por 30 ejemplo, restenosis posterior a angioplastia), fallo del injerto arteriovenoso, ateroesclerosis, hipertensión, cardiopatía hipertensiva, hipertrofia cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la aorta, esclerosis sistémica progresiva, polimiositis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, fascias, síndrome de Raynaud, artritis reumatoide, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología o fibrosis asociada 35 con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea), fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas 40 del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, giosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), cirugía postretiniana y de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción 45 del tejido en retinopatía diabética, enfermedad de Peyronie, esclerosis sistémica, lesión posterior de la médula espinal, osteoporosis, enfermedad de Camurati-Engelmann, enfermedad de Crohn, formación de cicatrices, síndrome de Marfan, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, fibrosis debida a incisiones quirúrgicas o trauma mecánico, fibrosis asociada con cirugía ocular, y cicatriz excesiva o hipertrófica o formación de queloide en la dermis que se produce durante la cicatrización de la herida resultante de trauma o heridas 50 quirúrgicas.

55 Las enfermedades de los ojos ilustrativas (por ejemplo, oculares, ópticas, oftálmicas u oftalmológicas), las dolencias o trastornos, incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos fibroproliferativos, fibrosis ocular, fibrosis oftálmicas, disfunción retiniana, fibrosis asociada con disfunción retiniana, degeneración macular húmeda o seca, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, quemadura alcalina (por ejemplo, quemadura alcalina en la córnea), fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, 60 fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular 65

(asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.

Ejemplos de enfermedades fibroproliferativas, dolencias o trastornos del ojo, fibrosis ocular, fibrosis ocular o fibrosis oftálmica incluyen, aunque no de forma limitativa, vitreoretinopatía proliferativa, vitreoretinopatía de cualquier etiología, fibrosis asociada con disfunción retiniana, fibrosis asociada con degeneración macular húmeda o seca, fibrosis asociada con cirugía ocular tal como tratamiento del glaucoma, desprendimiento de retina, extracción de cataratas, o procedimientos de drenaje de cualquier tipo, cicatrización en la córnea y la conjuntiva, fibrosis en el endotelio de la córnea, fibrosis asociada con quemadura alcalina, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la cápsula de la lente, cicatrización en exceso en el tejido alrededor de los músculos extraoculares en la cirugía del estrabismo, catarata subcapsular anterior y opacificación de la cápsula posterior, enfermedades fibróticas del segmento anterior del ojo, fibrosis del estroma de la córnea (asociada, por ejemplo, con opacificación de la córnea), fibrosis de la red trabecular (asociada, por ejemplo, con glaucoma), enfermedades fibróticas del segmento posterior del ojo, cicatrización fibrovascular (por ejemplo, en la vasculatura retiniana o coroidea del ojo), fibrosis retiniana, fibrosis epirretiniana, gliosis retiniana, fibrosis subretiniana (por ejemplo, asociada con degeneración macular relacionada con la edad), fibrosis asociada con cirugía postretiniana y cirugía de glaucoma, desprendimiento de retina por tracción en asociación con contracción del tejido en retinopatía diabética.

La enfermedad, dolencia o trastornos fibroproliferativos del ojo se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en vitreoretinopatía proliferativa, fibrosis asociada con cirugía ocular, fibrosis debida a cirugía posterior a cataratas de la lente, fibrosis del estroma de la córnea y cirugía alcalina.

Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar con una sustancia de anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluyen cánceres, tales como cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma y melanoma.

Se ha observado que muchos tumores humanos (deMartin *et al.*, EMBO J., 6: 3673 (1987), Kuppner *et al.*, Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)) y muchas líneas de células tumorales (Derynck *et al.*, Cancer Res., 47: 707 (1987), Roberts *et al.*, Br. J. Cancer, 57: 594 (1988)) producen TGF $\beta$  y se sugiere un posible mecanismo para aquellos tumores que evaden la supervivencia inmunitaria normal.

La expresión de la isoforma TGF $\beta$  en cáncer es compleja y variable con diferentes combinaciones de isoformas de TGF $\beta$  que tienen diferentes papeles en cánceres concretos. Las moléculas de TGF $\beta$  pueden actuar como supresores tumorales y como promotores tumorales. Por ejemplo, la delección o regulación defectiva de la señalización de TGF $\beta$  en animales puede dar como resultado un aumento en cáncer de mama, cáncer de intestino, cáncer de páncreas, cáncer de colon y carcinoma escamocelular, lo que indica que la presencia de TGF $\beta$  es importante para prevenir o ralentizar la progresión tumoral (Yang *et al.*, Trends Immunol 31:220-27, 2010). Sin embargo, se sabe que la expresión en exceso de TGF $\beta$  es prooncogénica, y se detecta un aumento de la expresión en muchos tipos de tumores (Yang *et al.*, más arriba).

Las complejidades adicionales también se divultan en las patentes de Estados Unidos 7.927.593. Por ejemplo, diferentes isoformas de TGF $\beta$  parecen ser más relevantes para diferentes tipos de cánceres. TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 un papel mayor en el cáncer de ovario y su progresión que en TGF $\beta$ 2; mientras que la expresión de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 es mayor en tumores de condrosarcoma de grado superior que en TGF $\beta$ 3. En cáncer de mama humano, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 se expresan mucho, donde la expresión de TGF $\beta$ 3 está correlacionada con la supervivencia global, mientras que los pacientes con metástasis ganglionar y expresión positiva para TGF $\beta$ 3 tienen mal resultado pronóstico. Sin embargo, en el cáncer de colon, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 se expresan más que TGF $\beta$ 3 y están presentes en niveles en circulación mayores que en individuos exentos de cáncer. En gliomas, TGF $\beta$ 2 es importante para la migración celular. A partir de estudios recientes, no es evidente qué isoformas de TGF $\beta$  serían más útil para inhibir un determinado cáncer y en qué medida.

Se cree que la infiltración de células inmunitarias en sitios tumorales es un factor de contribución común al crecimiento tumoral. Estos infiltrados de células inmunitarias pueden tener un efecto beneficioso ayudando a aclarar el tumor, pero también tienen un efecto perjudicial ya que habilitan la tolerancia a antígenos tumorales. Se ha comprobado que TGF $\beta$  puede afectar a los niveles de células inmunitarias en tumores (véanse, por ejemplo, Yang *et al.*, Trends Immunol 31:220-27, 2010; Flavell *et al.*, Nature Immunol 10:554-567, 2010; Nagarau *et al.*, Expert Opin Investig Drugs 19:77-91, 2010). Por ejemplo, TGF $\beta$  suprime los linfocitos citolíticos naturales que se infiltran en los tumores para aclarar los tumores del cuerpo. TGF $\beta$  también suprime la actividad de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos T auxiliares CD4+, tipos celulares que ayudan en el aclaramiento de los tumores (Yang, más arriba). TGF $\beta$  también tiene un papel en la regulación de la actividad de las células dendríticas, por ejemplo, inhibiendo la migración hacia los sitios de la lesión y la presentación de antígenos para fomentar una respuesta inmunitaria. Las células dendríticas a la vez son sensibles a TGF $\beta$  y secretan TGF $\beta$ . Por ejemplo, las células dendríticas se infiltran en los tumores y capturan las células,

secretan TGF $\beta$  y activan los linfocitos T reguladores, lo que a su vez impide el aclaramiento del tumor (Flavell *et al.*, más arriba). Adicionalmente, las células supresoras derivadas de mieloídes (MDSC) son células derivadas de la médula ósea que se expanden durante la progresión tumoral. Las MDSC inhiben la proliferación de los linfocitos T, suprimen la maduración de células dendríticas e inhiben la actividad de linfocitos citolíticos naturales, ayudando de esta forma a las células a evitar la respuesta inmunitaria (Li *et al.*, J Immunol. 182:240-49, 2009). Se ha comprobado que TGF $\beta$  contribuye a los efectos de las MDSC sobre la inhibición de la actividad de linfocitos citolíticos naturales (Li *et al.*, *anteriormente citado*; Xiang *et al.*, Int J Cancer 124:2621-33, 2009). El papel de las distintas isoformas de TGF $\beta$  en cada uno de estos procesos inmunitarios no está claro. El direccionamiento selectivo de las isoformas de TGF $\beta$  y su inhibición en diferentes grados puede ser un instrumento para modular la respuesta inmunitaria del hospedador para combatir y aclarar el tumor.

El anticuerpo o composición descritos en el presente documento puede modular las células inmunitarias en un tumor. El anticuerpo o composición pueden aumentar el número de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un tumor y/o aumentar la actividad citolítica de los linfocitos NK. El anticuerpo o composición descritos en el presente documento pueden reducir el número de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhibe la función de los linfocitos T reguladores. Por ejemplo, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento pueden inhibir la capacidad de los Treg de regular por defecto una respuesta inmunitaria o de migrar a un sitio de una respuesta inmunitaria.

el anticuerpo o composición descritos en el presente documento hacen algo a los linfocitos T citotóxicos en un tumor, y/o potencian la actividad de los LTC, por ejemplo, refuerza, aumenta o promueve la actividad de los LTC. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento aumenta la producción de perforina y granzima por los LTC y aumenta la actividad citolítica de los LTC.

El anticuerpo o composición descritos en el presente documento pueden reducir el número de citoblastos derivados de monocitos en un tumor y/o inhibe la función de los MDSC. Por ejemplo, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento pueden inhibir la capacidad de los MDSC de suprimir una respuesta inmunitaria, inhibir la actividad inmunosupresora de los MDSC, y/o inhibir la capacidad de los MDSC de promover la expansión y/o la función de los Treg.

El anticuerpo o composición descritos en el presente documento pueden reducir el número de células dendríticas (CD) en un tumor y/o inhibir la función tolerogénica (por ejemplo, efecto tolerogénico) de las células dendríticas. Por ejemplo, el anticuerpo o composición descritos en el presente documento puede reducir el efecto toleragénico de las células dendríticas CD8+.

En diversas realizaciones, el anticuerpo XPA.42.089 o variantes del mismo como se describe en el presente documento modula una o más de las actividades inmunitarias anteriormente descritas.

Como se ha indicado previamente, Se ha implicado también la expresión de TGF $\beta$  en el inicio de diversas fibrosis tisulares, tales como nefroesclerosis, fibrosis pulmonar y cirrosis; así como en el inicio de diversos estados, tales como hepatitis crónica, artritis reumatoide, restenosis vascular y queloide de la piel. Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar la fibrosis o una enfermedad fibrótica. Los ejemplos de fibrosis o enfermedades fibróticas incluyen, aunque no de forma limitativa, glomerulonefritis, síndrome de dificultad respiratoria aguda o del adulto (SDRA), diabetes, enfermedad renal diabética, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis cardíaca posterior al infarto, enfermedades fibroquísticas, cáncer fibrótico, postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, enfermedad venooclusiva, lesión posterior de la médula espinal, cirugía postretiniana y de glaucoma, restenosis posterior a angioplastia, fibrosis renal intersticial, fracaso y cicatrización de injerto arteriovenoso.

El tratamiento de estos trastornos o dolencias en un animal que necesita dicho tratamiento, comprende administrar al animal una cantidad eficaz de un anticuerpo o una composición que comprende un anticuerpo descritos en el presente documento.

Las dolencias que se pueden tratar por los métodos de la presente divulgación se producen preferentemente en mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos y otros primates, así como mascotas o animales de compañía tales como perros y gatos, animales de laboratorio tales como ratas, ratones y conejos, y animales de granja tales como caballos, cerdos, ovejas y ganado vacuno.

### **Usos no terapéuticos**

Los anticuerpos de la presente divulgación se puedan usar como agentes de purificación por afinidad para dianas, o bien en ensayos de diagnóstico para la proteína diana, por ejemplo, para detectar su expresión en células específicas, tejidos o suero. Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, para estos fines, el anticuerpo está marcado con un radionucleido (tales como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{3}\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  or  $^{35}\text{S}$ ) de manera que el anticuerpo se pueda localizar usando inmunogammagrafía.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tales como

ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, tales como ELISA y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987). Los anticuerpos también se pueden usar para inmunohistoquímica, para marcar tejidos o muestras de células usando métodos conocidos en la técnica.

- 5 Los anticuerpos específicos de diana se pueden usar en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ELISA, un RIA, FACS, inmunohistoquímica tisular, transferencia Western o inmunoprecipitación, que son técnicas bien conocidas en la materia. Los anticuerpos de la divulgación se pueden usar para detectar dianas en seres humanos y otros mamíferos. La presente divulgación proporciona un método para detectar dianas en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo específico de diana de la divulgación y detectar el anticuerpo unido. En una realización, el anticuerpo específico de diana está directamente marcado con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo específico de diana (el primer anticuerpo) no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que se puede unir al anticuerpo específico de diana está marcado. Como es bien sabido por el experto en la técnica, se selecciona un segundo anticuerpo que tenga la capacidad de unirse específicamente a la especie y clase particular del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo específico de diana es una IgG humana, entonces el anticuerpo secundario podría ser uno dirigido contra IgG humana. Otras moléculas que se pueden unir a los anticuerpos incluyen, sin limitación, proteína A y proteína G, ambos de los cuales están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.
- 10 20 Se contempla que los inmunoensayos divulgados anteriormente se utilicen para numerosos fines. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de diana se pueden utilizar para detectar dianas en células o sobre la superficie de las células en cultivo, o secretadas en el medio de cultivo de tejidos. Los anticuerpos específicos de diana se pueden usar para determinar la cantidad de diana sobre la superficie de células o secretarse en el medio de cultivo de tejido que se ha tratado con los diversos compuestos. Este método se puede usar para identificar compuestos que son útiles para inhibir o activar la expresión o la secreción de la diana. De acuerdo con este método, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un periodo de tiempo mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si se va a medir el nivel total de la diana, las células se lisan, y el nivel total de la diana se mide usando uno de los inmunoensayos descritos anteriormente. El nivel total de la diana en las células tratadas se compara con el de las células no tratadas para determinar la eficacia del compuesto de ensayo.
- 25 30 **Marcadores**

- 35 La sustancia de anticuerpo se puede marcar para permitir su detección. Una "marca" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores adecuados para usar en la presente divulgación incluyen, marcas radioactivas (por ejemplo, <sup>32</sup>P), fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína), reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos así como proteínas que puedan volverse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el hapteno o péptido, o de utilidad para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.
- 40 45 Los ejemplos de marcadores adecuados para usar incluyen, aunque no de forma limitativa, tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras habitualmente utilizadas en un ELISA) y marcas colorimétricas tales como oro coloidal, vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

- 50 55 El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el marcador se une covalentemente al biopolímero usando un reactivo de isocianato para su conjugación con un agente activo de acuerdo con la divulgación. Los reactivos de isocianato bifuncionales se pueden usar para conjugar un marcador a un biopolímero para formar un conjugado de marcador con biopolímero sin un principio activo unido al anterior. El conjugado de marcador con biopolímero se puede usar como compuesto intermedio en la síntesis de un conjugado marcado de acuerdo con la divulgación, o bien se puede usar para detectar el conjugado de biopolímero. Como se ha indicado anteriormente, se puede utilizar una amplia variedad de marcadores, donde la selección de la marca depende de la sensibilidad necesaria, facilidad de conjugación con el componente deseado del ensayo, requisitos de estabilidad, instrumentación disponible y provisiones de eliminación. Los marcadores no radioactivos frecuentemente están unidos por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) está covalentemente unida a la molécula. Seguidamente, el ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), que bien es detectable inherentemente o bien está unida covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

- 60 65 Los compuestos de la presente divulgación también se pueden conjugar directamente con compuestos generadores de la señal, por ejemplo, mediante la conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas adecuadas para usar como marcadores incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrolasas, especialmente fosfatases, esterasas y glicosidasas, u oxidotasas, especialmente las peroxidatas. Los compuestos fluorescentes, es decir, fluoróforos, adecuados para usar como marcadores incluyen, aunque no de forma limitativa, fluoresceína y sus derivados,

rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Ejemplos adicionales de fluoróforos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina rodamina, cloruro de B sulfonilo con eritrosceína, rutenio (tris, bipiridinio), Rojo Texas, nicotinamida adenina dinucleótido, flavina adenina dinucleótido, etc. Las compuestos quimioluminiscentes adecuadas para usar como marcadores incluyen, aunque no

5 de forma limitativa, luciferina y 2,3-dihidroftalazinedionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los diversos sistemas de marcaje y producción de señales que se pueden usar, véase la patente de los Estados Unidos n.º 4.391.904.

10 Los medios para detectar los marcadores son bien conocidos de los expertos en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, cuando el marcador es radiactivo, los medios de detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica, como una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar por excitación del fluorocromo con la longitud de onda de la luz adecuada, y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y la detección del producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes se pueden detectar simplemente observando el color asociado a la marca. Otros marcadores y los sistemas de detección adecuados para usar en los métodos de la presente divulgación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Dichos moduladores y ligandos marcados se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o estado de salud.

## 20 Formulación de composiciones farmacéuticas

Para administrar sustancias de anticuerpo de la presente divulgación a seres humanos o animales de ensayo, es preferible formular las sustancias de anticuerpo en una composición que comprende: uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen reacciones alérgicas u otras reacciones no deseadas cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares.

30 Asimismo, los compuestos pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos comunes. Dichos solvatos también están contemplados.

35 El anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Asimismo, el anticuerpo se administra de manera adecuada mediante infusión pulsada, especialmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente la dosificación se administra mediante inyecciones, con máxima preferencia inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es corta o crónica. Se contemplan otros métodos de administración, incluida la administración tópica, especialmente la administración transdérmica, transmucosal, rectal, oral o local, por ejemplo, mediante un catéter situado cerca del sitio deseado. La inyección, especialmente la intravenosa, es la preferida.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que contienen una sustancia de anticuerpo de la divulgación como principio activo pueden contener vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables dependiendo de la vía de administración. Los ejemplos de dichos vehículos o aditivos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, polí(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, almidón de carboximetilo sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, glicerina, 50 propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un tensioactivo farmacéuticamente aceptable y similares. Los aditivos usados se seleccionan de, aunque no de forma limitativa, los anteriores o combinaciones de los mismos, según sea adecuado, dependiendo de la forma farmacéutica de la presente divulgación.

55 La formulación de la composición farmacéutica variará de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión). Una composición adecuada que comprende el anticuerpo a administrar se puede preparar en un vehículo fisiológicamente aceptable. Para las soluciones o emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer lactados o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes o fluido, recuperadores de nutrientes o de electrolitos.

65 Varios vehículos acuosos, por ejemplo, soluciones salinas estériles tamponadas con fosfato, agua bacteriostática, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, y similares, y pueden incluir otras proteínas para mayor estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc., sometidas a modificaciones químicas suaves o similares.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a utilizar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las suspensiones acuosas pueden contener los principios activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes suspensores, por ejemplo, carmelosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátilo de origen natural, por ejemplo lecitina o productos de condensación de un óxido de alquíleno con ácidos grasos, por ejemplo estearylato de polioxietileno o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxacetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhidridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán polietilenado. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden liofilizar para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso. Se ha comprobado que esta técnica es eficaz con las inmunoglobulinas convencionales. Se pueden emplear cualesquier técnicas de liofilización y reconstitución adecuadas. Los expertos en la técnica apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo y que los niveles de uso deben ajustarse para compensar.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en premezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes suspensores se exemplifican mediante los ya mencionados anteriormente.

La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo, desde menos de aproximadamente un 0,5 %, habitualmente hasta o al menos aproximadamente un 1 % hasta un máximo de 15 o 20 % en peso, y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por consiguiente, una composición farmacéutica típica para inyección parenteral podría prepararse para contener 1 ml de agua tamponada estéril y 50 mg de anticuerpo. Una composición típica para infusión intravenosa podría prepararse para contener 250 ml de solución de Ringer estéril y 150 mg de anticuerpo. Los métodos actuales para preparar composiciones para su administración por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen más detalladamente en publicaciones tales como, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Una dosificación eficaz de un anticuerpo está comprendida en el intervalo de 0,01 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión inyectable estéril acuosa u oleaginosa, dispersiones o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril

- 5 puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propileneglicol y polietileneglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Asimismo, se usan aceites no volátiles estériles convencionalmente como disolvente o medio de suspensión.
- 10 Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Asimismo, los ácidos grasos tales como el ácido oleico son de utilidad en la preparación de inyectables.

En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe protegerse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sóblico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede lograrse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones útiles para la administración se pueden formular con potenciadores de la captación o la absorción para aumentar su eficacia. Dichos portenciadores incluyen por ejemplo, salicilato, glicocolato/linoleato, glicolato, aprotinina, bacitracina, SDS, caprato y similares. Véase, por ejemplo, Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285 (1996)) y Oliyai y Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544 (1993)).

Las composiciones de anticuerpo contempladas para usar para inhibir la actividad de la diana, incluyen la unión de la diana a su receptor o ligando análogo, señalización mediada por la diana, y similares. En particular, las composiciones presentan propiedades inhibidoras a concentraciones que están sustancialmente exentas de efectos secundarios, y por lo tanto son útiles para protocolos de tratamiento prolongados. Por ejemplo, la administración simultánea de una composición de anticuerpo con otro agente citotóxico, más tóxico, puede conseguir la inhibición benevidiosa de una dolencia o trastorno en tratamiento, a la vez que reduce eficazmente los efectos secundarios tóxicos en el paciente.

35 Asimismo, las propiedades de hidrofilicidad e hidrofobicidad de las composiciones consideradas para usar en la presente divulgación están bien equilibradas, potenciando de este modo la utilidad para uso tanto *in vitro* como, especialmente, *in vivo*, mientras que otras composiciones que carecen de dicho equilibrio tienen sustancialmente menos utilidad. Específicamente, las composiciones consideradas para usar en la divulgación tienen un grado de solubilidad adecuado en medio acuoso que permite la absorción y la biodisponibilidad en el organismo, a la vez que tienen también una grado de solubilidad en lípidos que permite a los compuestos atravesar la membrana celular hasta un posible sitio de acción. Por consiguiente, las composiciones de anticuerpo consideradas tienen eficacia máxima cuando se pueden administrar al sitio de la actividad antigénica diana.

#### **Administración y dosificación**

45 Una composición farmacéutica puede ser una composición estéril.

Se puede usar cualquier medio médicaamente aceptado para introducir un compuesto terapéutico directa o indirectamente en un sujeto mamífero, incluyendo, aunque no de forma limitativa, inyecciones, ingestión oral, intranasal, tópica, transdérmica, parenteral, aerosol de inhalación, administración vaginal o rectal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares e intracistenciales, así como técnicas de catéter o infusión. La administración mediante inyección intradérmica, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implante quirúrgico en un sitio concreto también se contempla.

55 La administración se puede llevar a cabo en el sitio de un cáncer, fibrosis o tejido afectado que necesite tratamiento mediante la inyección directa en el sitio o mediante una administración sostenida o un mecanismo de liberación sostenida, que pueda administrar la formulación internamente. Por ejemplo, microesferas o cápsulas biodegradables u otras configuraciones de polímero biodegradable con capacidad de administración sostenida de una composición (por ejemplo, un polipéptido soluble, anticuerpo o molécula pequeña) se puede incluir en las formulaciones de la divulgación implantada cerca o en el sitio del cáncer, fibrosis o tejido u órgano afectado.

65 Las composiciones terapéuticas también se pueden administrar al paciente en múltiples sitios. Las múltiples administraciones pueden proporcionarse simultáneamente o bien se pueden administrar durante un periodo de tiempo. En algunos casos es recomendable proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. La terapia adicional se puede administrar periódicamente, por ejemplo, por hora, diariamente, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3

semanas, mensualmente o en un intervalo más largo.

También se contempla en la presente divulgación la administración de agentes múltiples, tal como una composición de anticuerpo junto con un segundo agente como se describe en el presente documento, incluidos, aunque no de forma limitativa, un agente quimioterapéutico o un agente útil para tratar la fibrosis.

- 5 Las cantidades de composición de anticuerpo en una dosificación dada pueden variar según el tamaño del individuo al que se administra la terapia, así como de las características del trastorno que se está tratando. En tratamientos ilustrativos, puede ser necesario administrar aproximadamente 1 mg/día, 5 mg/día, 10 mg/día, 20 mg/día, 50 mg/día, 10 75 mg/día, 100 mg/día, 150 mg/día, 200 mg/día, 250 mg/día, 500 mg/día o 1000 mg/día. Estas concentraciones pueden administrarse como una forma farmacéutica única o como múltiples dosis. Los estudios convencionales de respuesta a la dosis, primero en modelos animales y después en ensayos clínicos, revelan las dosificaciones ideales para patologías y poblaciones de pacientes en particular.
- 15 También será evidente que la dosificación se puede modificar si se administran sustancias terapéuticas convencionales junto con las sustancias terapéuticas de la divulgación.

#### **Kits**

- 20 Como aspecto adicional, la divulgación incluye kits que comprenden uno o más compuestos o composiciones envasados de una forma que facilite su utilización para llevar a la práctica los métodos de la divulgación. Dicho kit puede incluir un compuesto o composición descrito en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo específico de diana, en solitario o junto con un segundo agente), envasado en un recipiente tal como un frasco o envase precintado, con una etiqueta prefijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. Preferentemente, el compuesto o composición se envasa en una forma farmacéutica unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica o para llevar a la práctica un ensayo de cribado. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición de anticuerpo.
- 25 30 Aspectos y detalles adicionales de la divulgación serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos y nunca limitantes. Los ejemplos no incluidos en las reivindicaciones son para referencia.

#### **Ejemplos**

35 **Ejemplo 1. Aislamiento de anticuerpos dirigidos contra TGFβ a partir de fagotecas**

Para aislar un panel de anticuerpos con capacidad de neutralizar la actividad del TGFβ humano, se usaron tres isoformas de la proteína TGFβ, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, para separar mediante absorción fagotecas de anticuerpos humanos como se describe a continuación.

- 40 Separación:
- 45 Los antígenos de TGFβ (PeproTech, Rocky Hill, NJ n.º 100-21,100-35B, 100-36E) se prepararon en primer lugar mediante biotinilación con NHS-PEG4-Biotina (Pierce, Rockford, IL) usando el protocolo del fabricante. En resumen, los antígenos de TGFβ, que estaban almacenados en un tampón de pH bajo, se neutralizaron por adición de PBS 20X para llevar el pH a aproximadamente 6,0. Un exceso molar de 30 veces de la biotina preactivada anterior se añadió y se mezcló, después se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se añadió un volumen igual de glicina 10 mM pH 3,0 y las muestras se introdujeron inmediatamente en diáisis usando una unidad de corte de diáisis de 6-8 kDa contra tampón citrato 10 mM, pH 3,5. Una fagoteca de Fab (XOMA, Berkeley, CA) se seleccionó por adsorción con el TGFβ biotinilado usando un método de selección en solución. Cada isoforma de TGFβ se separó independientemente en tres rondas de selección. Las subbibliotecas kappa y lambda se seleccionaron por separado.

- 50 Para la primera ronda de selección de fagos por adsorción, 50X equivalentes de biblioteca (~2x 10<sup>12</sup> ufc) de la biblioteca se bloquearon sobre hielo durante 1 h en 1 ml de leche al 5 %/PBS. Los aglutinantes de la estreptavidina se deselegionaron del fago bloqueado por adición de fago bloqueado a DYNABEADS® M-280 magnéticas revestidas de estreptavidina y se incubaron con rotación durante 30 minutos. La etapa de deselegcción se repitió una vez más. Se usó un imán para separar las perlas del fago. En paralelo a las etapas de deselegcción, 200 pmoles de TGFβ biotinilado se dejó unir a las DYNABEADS® M-280 magnéticas revestidas de estreptavidina por incubación a temperatura ambiente con rotación durante 30 minutos. Tras la unión, las perlas de TGFβ biotinilado se lavaron dos veces con leche al 5 %/PBS. La selección se llevó a cabo añadiendo fago deselegionado al TGFβ biotinilado unido a las perlas magnéticas de estreptavidina e incubando por rotación durante 1,5 a 2 horas. Después de la selección, el fago no unido se eliminó por lavado de las perlas utilizando un procesador de perlas magnéticas Kingfisher (Thermo Scientific) que se programó para lavar las perlas rápidamente 3 veces con PBS-TWEEN al 0,1 %, seguido por 3 lavados rápidos adicionales con PBS. El fago unido se eluyó de las perlas tras la etapa de lavado por adición de trietilamina 100 mM e incubación con rotación a temperatura ambiente durante 30 minutos. El fago eluido se neutralizó por adición de un volumen igual de Tris-HCl 1 M, pH 7,4. El fago neutralizado eluido se recogió a continuación en un tubo Falcon de 50

- ml (Falcon N.º 352070) y se usó para infectar células bacterianas TG1 en crecimiento logarítmico ( $DO_{600} \sim 0,5$ ). La infección se estableció a 37 °C durante 30 min sin agitación, seguido por incubación adicional durante 30 min a 37 °C con agitación a 90 rpm. Las células se sembraron en placas de agar para bioensayo con medio 2YT suplementado con carbenicilina 100 ug/ml y glucosa al 2 % (2YTCG) y se incubaron durante la noche a 30 °C para permitir el crecimiento del césped.
- En la preparación para usar como entrada de la siguiente ronda, 100X del resultado de la ronda anterior se recogieron mediante sobreinfección usando el fago auxiliar MK07. Esto se llevó a cabo inoculando medio 2YTCG con células raspadas procedentes del resultado de la ronda de selección anterior. Se midió la  $DO_{600\text{ nm}}$  del cultivo inicial y se ajustó para reflejar una  $DO_{600\text{ nm}}$  de partida de ~0,05. Las células se hicieron crecer a 37 °C con agitación hasta células alcanzaron la fase de crecimiento logarítmico con una  $DO_{600\text{ nm}}$  de ~0,5. Las células se infectaron con MK07 (New England Biolabs, MA) con una multiplicidad de infección (MOI) = -20, a 37 °C durante 30 min sin agitación, seguido por incubación adicional durante 30 min a 37 °C con agitación a 150 rpm. Después de la infección a 37 °C, las se aglomeraron y se transfirieron a medio 2YT nuevo suplementado con canamicina 50 ug/ml y carbenicilina 100 ug/ml (2YTCK). Los cultivos se dejaron crecer durante la noche a 25 °C, Los fagos se separaron de las células y los residuos mediante centrifugación, y el sobrenadante resultante se recuperó y utilizó como entrada de la siguiente ronda de selección. El enriquecimiento de selección se supervisó mediante la cantidad de entrada utilizada en cada ronda de selección y el título resultante de fagos en el resultado.
- Para la segunda y tercera rondas de selección, se usaron los mismos protocolos en fase de solución seguidos en la ronda uno con las siguientes excepciones. La cantidad de fago de entrada usada en las rondas de selección segunda y tercera fue  $-1,0 \times 10^{11}$  ufc. EN la ronda dos, se usaron 100 pmoles de antígeno biotinilado en la selección y, en la ronda tres, se usaron 50 pmoles de antígeno biotinilado. Se usó el Kingfisher para lavar el fago no unido de las perlas después de las selecciones. En la ronda dos, el Kingfisher se programó para lavar las perlas 3 veces con PBS-TWEEN al 0,1 % durante 2 minutos seguido por lavado con 1 ml de PBS nuevo durante 2 minutos repetido 3 veces. En la ronda tres de la selección, las perlas se lavaron 3 veces con PBS-TWEEN al 0,1 % durante 6 minutos, seguido por dos lavados de cuatro minutos cada uno y un lavado con PBS durante 6 minutos.
- Extractos periplásmicos bacterianos que contenían fragmentos de anticuerpo secretados para usar en el cribado de los aglutinantes de TGFβ se prepararon según métodos convencionales. Las colonias individuales se repicaron en placas de 96 pocillos llenas de 2YTC suplementado con carbenicilina 100 ug/ml y medio de glucosa al 0,1 %. Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C con agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,5$ ). A continuación se indujo a las colonias a producir fragmentos de anticuerpo solubles mediante la adición de IPTG 1 mM final y se incubaron durante la noche a 25 °C con agitación. Extractos periplásmicos (PPE) que contenían fragmentos de anticuerpo solubles se prepararon a partir de las células inducidas usando el método convencional de añadir una relación de volumen 1:3 de solución de PPB enfriada en hielo (Teknova, Hollister, CA) y agua bidestilada ( $H_2O\cdot bd$ ) con comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa exento de EDTA. A continuación se usaron los PPE para cribar los aglutinantes de TGF-β.
- Cribado:**
- Se usaron dos formatos de ensayo de cribado alternativos para identificar los clones que se unían a TGFβ, incluidos los clones que se unían a las tres isoformas de TGFβ y eran únicos en sus secuencias. El primer ensayo de cribado utilizó un inmunoensayo en placa y el otro ensayo de cribado se llevó a cabo utilizando un método de cribado SPR. El ensayo en placa implicaba placas EIA opacas de 384 pocillos blancos revestidos con 1 ug/ml del clon de anticuerpo AD.1.10 dirigido contra His (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 1 ug/ml en tampón PBS durante cuatro horas a temperatura ambiente. A continuación la placa se lavó 3X en PBS-TWEEN y se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-TWEEN durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 30 ul/pocillo de TGFβ biotinilado a entre 0,1 ug/ml para TGFβ1 y TGFβ2 y 0,2 ug/ml para TGFβ3, diluido en tampón de bloqueo. A continuación se añadieron 30 ul de extracto periplásmico y se incubaron a 4 °C durante una noche en un agitador de placas a intensidad moderada. Las placas se lavaron 3X en PBS-TWEEN después se añadieron 50 ul/pocillo de 2,5 ug/ml de estreptavidina-europio (SA-Eu, PerkinElmer) diluido en tampón de dilución DELFIA (PerkinElmer) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador. Las placas se lavaron 7 veces con PBS-TWEEN y se añadieron 50ul/pocillo del reactivo potenciador DELFIA (PerkinElmer) y se pusieron en el agitador durante 8 minutos a temperatura ambiente y se leyeron a continuación en un lector de placas de Molecular Devices FlexStation 3 en modo TRF con un tiempo de recogida de 200-1200  $\mu$ s y Exc.=345 nm, Emi.=618 nm y corte=590 nm, configuración de PMT alto, 20 lecturas/pocillo. Las muestras con una señal superior a 2,1 veces la señal más alta que el control de PPE negativo se consideraron positivas.
- El ensayo SPR se llevó a cabo como un ensayo de enlace directo BIACORE A100. En este ensayo, se preparó un chip CM5 BIACORE mediante química de acoplamiento de aminas convencional usando el kit BIACORE Amine Coupling (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los antígenos de TGFβ se diluyeron hasta 6 ug/ml en acetato pH 4,0 y se injectaron durante 7 minutos (manchas 1, que es TGFβ1) y 10 minutos (manchas 2 y 4, que son TGFβ2 y TGFβ3). Esto inmoviliza entre 3400 y 4800 UR de cada antígeno de TGFβ. Las muestras se desactivaron con etanolamina 1 M. Los extractos periplásmicos se diluyeron 1:1 con HBS-EP+ (Teknova) con 2 mg/ml de BSA y se filtraron a través de una placa filtrante 0,2 uM Millex GV (Millipore) y se injectaron a continuación a 30 ul/minuto durante 240 segundos

con una disociación de 30 segundos. La regeneración después de cada inyección de PPE necesitaba 10 segundos de HCl 100 mM. Se usó el punto de estabilidad de notificación temprana de del programa informático BIACORE A100 para evaluar los niveles de unión de PPE. Se determinaron los niveles de corte para cada isoforma de TGF $\beta$  independientemente de estar visualmente por encima de nivel de fondo. Los cortes de UR fueron 245, 175 y 125 para TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, respectivamente.

5

Maduración por afinidad:

10 Un anticuerpo, XPA.42.068, que tenía actividad de unión y neutralización significativamente mayor por TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en relación con TGF $\beta$ 3, se sometió a maduración por afinidad para aumentar su afinidad y potencia contra TGF $\beta$ 3. Una biblioteca de variantes de secuencia generadas a partir de la maduración por afinidad se seleccionó usando TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, donde los clones resultantes se cribaron principalmente según una unión a TGF $\beta$ 3 mejorada.

15 Para el cribado, el ensayo SPR se llevó a cabo como un ensayo de enlace directo BIACORE A100. En este ensayo se preparó un chip CM5 BIACORE mediante química de acoplamiento de aminas convencional usando el kit BIACORE Amine Coupling. Los antígenos de TGF $\beta$  se diluyeron a 1 ug/ml en acetato pH 4,0 y se inyectaron durante 5 minutos (manchas 1 y 5, que son TGF $\beta$ 3 y TGF $\beta$ 1, respectivamente) y 8 minutos (manchas 2, que es TGF $\beta$ 2). Esto inmoviliza entre 200 y 450 UR de cada TGF $\beta$ . Las muestras se desactivaron con etanolamina 1 M. Los extractos periplásmicos se diluyeron 1:1 con HBS-EP+ con 2 mg/ml de BSA y se filtraron a través de una placa filtrante 0,2  $\mu$ m Millex GV (Millipore) y se inyectaron a continuación a 30  $\mu$ l/minuto durante 240 segundos con una disociación de 600 segundos. La regeneración después de cada inyección de PPE necesitaba 10 segundos de HCl 100 mM. Los datos con la referencia restada se representaron gráficamente y se examinaron visualmente para determinar los clones que parecían tener mayor estabilidad o mayores niveles de unión. Un clon derivado, denominado XPA.42.681, que demostró una unión mejorada a TGF $\beta$ 3, se incluyó en los estudios de caracterización posteriores.

25

20 Los clones seleccionados se reformatearon a anticuerpos de IgG2. Las cadenas variables pesada (VH) y ligera (VL) de los fragmentos Fab seleccionados se amplificaron mediante PCR, se clonaron en vectores plasmídicos que contenían secuencias de la región constante del anticuerpo, y se transfecaron transitoriamente en células 293E utilizando métodos convencionales para generar material para la caracterización posterior, incluidos los estudios que 25 se describen a continuación.

30

**Ejemplo 2. Medición de las afinidades de unión de los anticuerpos contra TGF $\beta$**

35 Los anticuerpos se caracterizaron contra las isoformas de TGF $\beta$  TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 según su afinidad de unión (KD), constante de disociación (kd) y constante de asociación (ka) usando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR). Los análisis se llevaron a cabo usando dos métodos. Un método fue un método de inmovilización directa del antígeno en el que las proteínas TGF $\beta$  se inmovilizaron en una superficie a baja densidad y los anticuerpos se inyectaron a diversas concentraciones para el análisis cinético. El otro método fue un método de anticuerpo inmovilizado utilizando inyecciones de varias concentraciones de las proteínas TGF $\beta$  inyectadas.

40

Método cinético con anticuerpo inmovilizado:

45 Se usó un chip sensor CM4 (GE Healthcare) en un sistema BIACORE 2000 (GE Healthcare). El chip se preacondicionó con dos inyecciones de 30 segundos cada una con un caudal de 50  $\mu$ l/minuto de HCl 100 mM, glicina pH 2,0, NaOH 50 mM y tampón de análisis antes de la inmovilización. El tampón de análisis para la inmovilización fue solución salina tamponada con HEPES (HBS-EP+) con Hepes 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,05 % (Teknova). La superficie del chip se activó con una inyección de siete minutos a 10  $\mu$ l/minuto de una solución 1:1 recientemente preparada de N-Hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,4 M. Después de la inyección de activación, se inyectó 1 ug/ml de anticuerpo dirigido contra TGF $\beta$  en acetato pH 4,5 a 10  $\mu$ l/minuto durante un minuto, donde las inyecciones se dirigían a 120 UR. Se inyectaron 8 minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH pH 8,5 para bloquear la superficie. La NHS, la EDC y la etanolamina usadas procedían del kit BIACORE Amine Coupling.

55 Se llevó a cabo el análisis cinético usando un tampón de ejecución de una forma completamente desgasificada del tampón HBS-EP+ anterior suplementado con 1 mg/ml de BSA (Sigma Aldrich, St. Louis MO). Las inyecciones con la muestra de TGF $\beta$  se realizaron a 50  $\mu$ l/minuto durante cuatro minutos con un tiempo de disociación de 900 segundos. Cada proteína de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3) se inyectó a 10 nM, 2 nM, 0,4 nM, 0,08 nM (350 ng/ml con dilución en serie de 5 veces) con blancos dirigidos a cada serie de concentraciones e inyecciones por cuadruplicado. A continuación se llevó a cabo la regeneración con tres inyecciones de 30 segundos cada una de HCl 100 mM en MgCl<sub>2</sub> 3 M seguido por una inyección de blanco de tampón de 30 segundos final.

60

65 Los datos se analizaron mediante Scrubber2 (BioLogic Software, Campbell Australia) y se referenció por duplicado restando tanto los datos de las celdas de flujo en blanco como un promedio de las inyecciones de blanco realizadas. Los datos se ajustaron mediante ajuste simultáneo de la (KD) para la disociación (kd) y la asociación (ka), y se muestran en la siguiente Tabla 2. Los datos de un anticuerpo comparativo anteriormente medido, denominado BM-1 (1D11, R&D Systems MAB1835) también se han incluido en la Tabla 2. Los datos de BM-1 se generaron en el

BIACORE A100. En resumen, el anticuerpo BM-1 se capturó a una densidad de aproximadamente 100 UR en la superficie de un chip CM5 con una alta densidad de Fc de conejo dirigido contra Ig de ratón (GE Healthcare). Las proteínas de TGF $\beta$  se inyectaron a las mismas concentraciones que se han descrito anteriormente a 30  $\mu$ l/minuto. Estos datos se referenciaron por duplicado y se analizaron con el programa informático BIACORE A100.

5

**Tabla 2. Datos de afinidad del ensayo que utiliza anticuerpo inmovilizado y TGF $\beta$  inyectado**

		TGF $\beta$ 1			TGF $\beta$ 2			TGF $\beta$ 3	
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
XPA.42.068	1,53E+07	9,05E-04	59 pM	1,04E+07	5,35E-04	51 pM	8,45E+06	3,84E-03	455 pM
XPA.42.089	4,40E+07	1,67E-04	3,8 pM	1,62E+07	4,14E-04	25 pM	7,70E+06	1,09E-02	1,4 nM
XPA.42.681	4,25E+07	7,20E-05	1,7 pM	1,71E+07	4,99E-05	2,9 pM	1,30E+07	7,50E-05	5,7 pM
BM-1	1,90E+07	1,40E-03	72 pM	1,10E+07	2,00E-03	170 pM	6,50E+06	3,10E-04	48 pM

Los datos de afinidad medidos en este ensayo utilizando anticuerpos inmovilizados mostraron que XPA.42.681 tenía la unión más fuerte (más intensa) de cualesquiera de los anticuerpos por cada una de las tres isoformas de TGF $\beta$  y también se unía a cada una de las isoformas de TGF $\beta$  con afinidades similares. Asimismo, los anticuerpos XPA.42.068 y XPA.42.089 tenían una unión similar o más fuerte para las isoformas TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en comparación con el anticuerpo BM-1, pero mostraron una unión significativamente menor con la isoforma TGF $\beta$ 3, en comparación tanto con el anticuerpo BM-1 o con respecto a la unión a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2.

15 Método de afinidad de TGF $\beta$  inmovilizado:

Un chip sensor CM1 (GE Healthcare) con una superficie de -COOH plana se usó en un sistema BIACORE 2000. El chip se preacondicionó con dos inyecciones de 30 segundos cada una con un caudal de 50  $\mu$ l/minuto de HCl 100 mM, glicina pH 2,0, NaOH 50 mM, SDS al 1 % y tampón de análisis antes de la inmovilización. El tampón de análisis para la inmovilización fue solución salina tamponada con HEPES (HBS-EP+) con Hepes 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,05 %. La superficie del chip se activó con inyecciones de cuatro minutos a 20  $\mu$ l/minuto de una solución 1:1 recientemente preparada de N-Hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,4 M. Despues de la inyección de activación, se inyectó una solución 0,1 ug/ml de TGF $\beta$  en acetato pH 4,0 a 20  $\mu$ l/minuto durante varios minutos. Cada TGF $\beta$  utilizó una etapa de activación independiente en su propia celda de flujo de modo que TGF $\beta$ 1 se inmovilizó sobre Fc2, TGF $\beta$ 2 sobre Fc3 y TGF $\beta$ 3 sobre Fc4, con Fc1 como blanco activado e inactivado. Las inyecciones de TGF $\beta$  se realizaron en una serie de 1 a 2 minutos mirando el nivel inmovilizado entre cada inyección. La densidad de la diana inmovilizada en cada ligando de TGF $\beta$  fue de 30 UR. Despues de las inyecciones de inmovilización de TGF $\beta$ , se inyectaron 4 minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH pH 8,5 para bloquear la superficie. La NHS, la EDC y la etanolamina usadas procedían del kit BIACORE Amine Coupling, y la TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 procedían de R&D Systems.

Para el análisis de afinidad, el tampón de ejecución se cambió a una forma completamente desgasificada del tampón HBS-EP+ anterior suplementado con 1 mg/ml de BSA (Sigma Aldrich, St. Louis MO). Cada uno de los anticuerpos se diluyó en tampón de ejecución hasta 5  $\mu$ g/ml (33,3 nM) y se prepararon 4 diluciones posteriores en serie de cinco veces hasta concentraciones de 33,33 nM, 6,67 nM, 1,33 nM, 267 pM y 53 pM para cada uno. Estas se inyectaron a continuación utilizando la configuración Kinject durante cuatro minutos a 50  $\mu$ l/minuto, con un tiempo de disociación de 900 segundos. A continuación se llevó a cabo la regeneración con una inyección de 12  $\mu$ l (14,4 segundos) de HCl 100 mM a 50  $\mu$ l/minuto seguida de una inyección de 18 segundos de tampón. Las inyecciones se realizaron a través de todas las celdas de flujo simultáneamente, y las muestras se inyectaron por cuadruplicado con inyecciones de blanco intercaladas entre cada conjunto de grupos de inyección de concentración descendente para cada anticuerpo. Esto significa que antes de inyectar la misma muestra una segunda vez, todas las demás concentraciones de todos los anticuerpos se habían inyectado una vez.

45 Los datos se analizaron mediante Scrubber2 (BioLogic Software, Campbell Australia) y se referenciaron por duplicado restando tanto los datos de las celdas de flujo en blanco como un promedio de las inyecciones de blanco realizadas. Los datos se ajustaron mediante ajuste simultáneo de la (KD) para la disociación (kd) y la asociación (ka), y se muestran en la siguiente Tabla 3.

**Tabla 3. Datos de afinidad del ensayo que utiliza TGF $\beta$  inmovilizado y anticuerpos inyectados.**

		TGF $\beta$ 1			TGF $\beta$ 2			TGF $\beta$ 3	
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
XPA.42.068	5,44E+06	1,70E-03	313 pM	7,30E+06	7,98E-04	109 pM	5,45E+06	6,96E-03	1,3 nM
XPA.42.089	5,9SE+06	1,06E-03	177 pM	4,80E+06	1,39E-03	290 pM	3,40E+06	5,70E-02	>17 nM
XPA.42.681	1,14E+07	3,63E-04	32 pM	1,28E+07	3,94E-04	31 pM	1,23E+07	6,65E-04	54 pM
BM-1	1,28E+07	3,90E-03	304 pM	7,00E+06	6,84E-03	977 pM	5,05E+06	9,46E-04	188 pM

50

Consistente con los resultados del anticuerpo inmovilizado de la Tabla 2, los datos de afinidad medidos en los ensayos que usaron antígeno inmovilizado (Tabla 3) también mostraron que XPA.42.681 tenía la unión más fuerte (más intensa) de cualesquiera de los anticuerpos por cada una de las tres isoformas de TGF $\beta$ , con afinidad similar para cada una de las isoformas de TGF $\beta$ . Asimismo, XPA.42.068 y XPA.42.089 tuvieron una unión similar o más fuerte para las isoformas TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en comparación con BM-1, pero una unión significativamente menor con la isoforma TGF $\beta$ 3, en comparación tanto con el anticuerpo BM-1 o con respecto a la unión a TGF $\beta$ 1. La diferencia entre las constantes de velocidad medidas usando el anticuerpo inmovilizado en comparación con los ensayos con antígeno inmovilizado son probablemente el resultado de las complejidades intrínsecas del sistema, pero en cualquier caso cada uno de ellos proporciona datos cinéticos de calidad relativamente alta y consistentes en las propiedades de unión para las isoformas de TGF $\beta$  y entre los anticuerpos relativos entre sí.

### Ejemplo 3. Medición de la competencia por el receptores de los anticuerpos contra TGF $\beta$

Los anticuerpos se caracterizaron por su capacidad para inhibir o bloquear la unión de cada uno de los tres ligandos de TGF $\beta$  a los receptores de TGF $\beta$  mediante ensayos de competición SPR. Las señales del TGF $\beta$  para el receptor TGF $\beta$  de tipo II (TGF $\beta$ -RII que es una proteína serina treonina cinasa transmembrana y requiere la asociación citoplasmática de la proteína del receptor TGF $\beta$  de tipo 1 (TGF $\beta$ -R1) para su activación. El papel de unión al ligando de TGF $\beta$ -RI no es evidente, y la forma recombinante de TGF $\beta$ -RI no demostró ninguna unión a las concentraciones estudiadas para ninguno de los ligandos TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3, ni para las formas TGF $\beta$ -RII unidas de dichos ligandos y, por lo tanto, no se pudo evaluar en experimentos de competición por el receptor. El receptor TGF $\beta$  de tipo III (TGF $\beta$ -RIII) tiene formas tanto unidas a membrana como solubles, y no se cree que participe en la señalización del TGF $\beta$ . TGF $\beta$ -RIIb es una variante de corte y empalme que contiene 26 aminoácidos de inserción cerca del extremo N y tiene la propiedad única de unirse a las tres isoformas de TGF $\beta$  con buena afinidad. TGF $\beta$ -RII se une fuertemente solamente a los ligandos TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3, mientras que TGF $\beta$ -RIII se une mejor al ligando TGF $\beta$ 2.

Se usó un chip sensor CM5 (GE Healthcare) en un sistema BIACORE 2000. El chip se preacondicionó con varias inyecciones de 30 segundos cada una con un caudal de 50  $\mu$ l/minuto de HCl 100 mM y NaOH 50 mM antes de la inmovilización. El tampón de análisis para la inmovilización fue solución salina tamponada con HEPES (HBS-EP+) con Hepes 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,05 %. La superficie del chip se activó con una inyección de siete minutos a 10  $\mu$ l/minuto de una solución 1:1 recientemente preparada de N-Hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,4 M. Después de la inyección de activación, 5 ug/ml de TGF $\beta$ -RII, TGF $\beta$ -RIIb o TGF $\beta$ -RIII (R&D Systems) en acetato pH 4,5 se inyectaron a 20  $\mu$ l/minuto durante cuatro minutos y dio como resultado 1000-4000 UR inmovilizadas para cada uno de los receptores de TGF $\beta$ . A continuación, Se inyectaron 8 minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH pH 8,5 para bloquear la superficie. La NHS, la EDC y la etanolamina usadas procedían del kit BIACORE Amine Coupling. Fc1 fue el control activado y desactivado.

Se llevaron a cabo los ensayos de competición usando un tampón de ejecución de una forma completamente desgasificada del tampón HBS-EP+ anterior suplementado con 1 mg/ml de BSA. Se usaron ligandos de TGF $\beta$  en todas las inyecciones salvo los controles con blanco de 100 ng/ml (10 nM) a 40 ng/ml (4 nM) y se prepararon con 10 ug/ml (66,6 nM) de anticuerpos de competición y de control. Se dejó que las muestras llegaran al equilibrio durante 40 minutos a temperatura ambiente antes de iniciar el análisis BIACORE. A continuación, las muestras equilibradas se inyectaron a 10  $\mu$ l/minuto durante dos minutos. La regeneración se llevó a cabo cada ciclo con una inyección de glicina pH 2,5 a 50  $\mu$ l/minuto durante 9,6 segundos (8  $\mu$ l). Las muestras se analizaron al menos por duplicado y se analizaron para determinar el nivel de TGF $\beta$  unido.

Como se muestra en la Tabla 4 más adelante, los resultados para los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 y el comparador BM-1 sugieren que cada uno de estos anticuerpos bloquea la asociación de los tres ligandos de TGF $\beta$  con los receptores TFG $\beta$ -RII y TGF $\beta$ -RIII, y no se hizo una distinción evidente. Este patrón de competencia por el receptor no fue universal para la totalidad del resto de anticuerpos estudiados, pero cuyos datos no se muestran en la presente divulgación.

**Tabla 4. Ensayo de competición del receptor CE50 (nM anticuerpo)**

	XPA.42.068	XPA.42.089	XPA.42.681	BM-1
TGF $\beta$ 1/TGF $\beta$ -RII	2,0E-09	1,7E-09	2,3E-09	2,4E-09
TGF $\beta$ 2/TGF $\beta$ -RII	2,2E-09	1,8E-09	1,7E-09	2,8E-09
TGF $\beta$ 3/TGF $\beta$ -RII	1,4E-09	3,4E-08	1,2E-09	1,6E-09
TGF $\beta$ 1/TGF $\beta$ -RIII	6,0E-10	1,2E-09	2,2E-09	2,1E-09
TGF $\beta$ 2/TGF $\beta$ -RIII	2,4E-09	1,6E-09	2,1E-09	2,5E-09
TGF $\beta$ 3/TGF $\beta$ -RIII	1,9E-09	3,1E-08	1,1E-09	1,4E-09

La potencia de los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 y BM-1 en la competición por el receptor generalmente se correlaciona con sus afinidades por las diversas isoformas de TGF $\beta$ .

**Ejemplo 4. Medición de la competición epitópica entre los anticuerpos de TGFβ**

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos XPA.42.068 y XPA.42.089 para unirse a epítopos independientes o solapantes en las proteínas de TGFβ. Aunque este análisis por pares no es directo debido a la variación en las 5 afinidades de los anticuerpos entre las diferentes isoformas de TGFβ y la homodimerización covalente de los ligandos de TGFβ, que da como resultado la unión con dos IgG por relación de homodímero (por ejemplo, autoemparejamiento), se desarrolló una especie de ensayo de competición en solución.

Se usó un chip sensor CM5 (GE Healthcare) en un sistema BIACORE 2000. El chip se preacondicionó con cuatro 10 inyecciones de 30 segundos con un caudal de 50  $\mu$ l/minuto de HCl 100 mM antes de la inmovilización. El tampón de análisis para la inmovilización fue solución salina tamponada con HEPES (HBS-EP+) con Hepes 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,05 %. La superficie del chip se activó con una inyección de siete 15 minutos a 10  $\mu$ l/minuto de una solución 1:1 recientemente preparada de N-Hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímidida (EDC) 0,4 M. Después de la inyección de activación, se injectó 1 ug/ml 20 de anticuerpo XPA.42.089 en acetato pH 4,5 y se injectó a 10  $\mu$ l/minuto en inyecciones de varios minutos. Las inyecciones se monitorizaron y se realizaron secuencialmente para establecer los niveles de inmovilización muy cerca de 300 UR. Se inyectaron ocho minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH pH 8,5 para bloquear la superficie. La NHS, la EDC y la etanolamina usadas procedían del kit BIACORE Amine Coupling. Fc1 fue el control activado y desactivado.

Se llevaron a cabo los ensayos de competición usando un tampón de ejecución de una forma completamente desgasificada del tampón HBS-EP+ anterior suplementado con 1 mg/ml de BSA. TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 se usaron 25 en todas las inyecciones a 0,1 ug/ml (4 nM) excepto los controles con blanco, y se prepararon con 20 ug/ml (133 nM) de anticuerpos de competición. El receptor recombinante TGFβ-RIIb-Fc (R&D Systems) también se incluyó como competidor. Se dejó que las muestras llegaran al equilibrio durante 40 minutos a temperatura ambiente antes de iniciar el análisis BIACORE. Las muestras equilibradas se inyectaron a continuación a 30  $\mu$ l/minuto durante tres minutos en 30 todas las celdas de flujo. La regeneración se llevó a cabo cada ciclo con una inyección de NaOH 50 mM a 50  $\mu$ l/minuto durante 6 segundos (5  $\mu$ l) y seguida de una inyección de tampón de 30 segundos. Las muestras se analizaron por duplicado y se analizaron para determinar en nivel de TGFβ unido al final de los tres minutos.

**Tabla 5. Competición por la unión (XPA.42.089 inmovilizado)**

	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3
<b>Blanco</b>	-0,568	0,0655	0,3684
<b>Sin Ac</b>	63,85	61,05	23,65
<b>XPA.42.068</b>	10,85	5,18	7,32
<b>XPA.42.089</b>	1,7	0,3635	9,77
<b>TGFβ-RIIb</b>	-0,316	38,2	-0,378

Como se muestra en la Tabla 5 anterior, los datos indican que XPA.42.068 y XPA.42.089 mostraron una fuerte competencia entre sí por la unión a cada una de las isoformas de TGFβ. Los valores representan el promedio de UR 35 o la intensidad de la señal para la unión a TGFβ que se midió durante las inyecciones del complejo. Esto muestra que la señal se reduce considerablemente cuando el anticuerpo complejado está presente. Cualquier disociación del complejo durante la inyección podría permitir que el TGFβ libre o unido monovalentemente se une al anticuerpo de captura XPA.42.089. Se ha comprobado que la interacción de TGFβ-RIIb con TGFβ2 es mucho más débil que la de 40 las proteínas TGFβ1 y TGFβ3 y la rápida descomposición permite una competición relativamente baja por TGFβ2 frente a la elevada afinidad de XPA.42.089. El anticuerpo XPA.42.681, que se derivó de XPA.42.068, no se analizó en los ensayos de competición.

**Ejemplo 5. Medición de la competencia por el rhLAP de los anticuerpos contra TGFβ**

Se llevaron a cabo ensayos de competición adicionales para determinar si los anticuerpos también interactúan con la 45 forma latente de TGFβ. La pro-proteína TGFβ se escinde dentro del golgi mediante una convertasa de tipo furina en un péptido asociado a la latencia con 249 aminoácidos del extremo N y un TGFβ1 maduro con 112 aminoácidos del extremo C.

Se usó un chip sensor CM5 (GE Healthcare) en un sistema BIACORE 2000. El chip se preacondicionó con varias 50 inyecciones de 30 segundos cada una con un caudal de 50  $\mu$ l/minuto de HCl 100 mM y NaOH 50 mM antes de la inmovilización. El tampón de análisis para la inmovilización fue solución salina tamponada con HEPES (HBS-EP+) con Hepes 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM y polisorbato 20 al 0,05 %. La superficie del chip se activó con una inyección de siete minutos a 10  $\mu$ l/minuto de una solución 1:1 recientemente preparada de N-Hidroxisuccinimida 55 (NHS) 0,1 M y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímidida (EDC) 0,4 M. Tras la inyección de activación, se inyectaron 2 ug/ml de péptido asociado a la latencia de TGFβ1 humano recombinante (rhLAP) (R&D Systems) en acetato pH 4,5 a 10  $\mu$ l/minuto durante cuatro minutos y dio como resultado 400 UR de rhLAP inmovilizado. Se inyectaron 8 minutos de clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH pH 8,5 para bloquear la superficie. Fc1 fue el control

activado y desactivado.

El ensayo de competición por rhLAP se llevó a cabo utilizando un tampón de ejecución de tampón HBS-EP+ completamente desgasificado como anteriormente suplementado con 1 mg/ml de BSA. Se usó TGF $\beta$ 1 en todas las inyecciones salvo los controles con blanco a 0,25 ug/ml (10 nM) y se preparó con 10 ug/ml (66,6 nM) de anticuerpos de competición y de control. Se dejó que las muestras llegaran al equilibrio durante 40 minutos a temperatura ambiente antes iniciar el análisis BIACORE. Las muestras equilibradas se inyectaron a continuación a 40 ul/minuto durante dos minutos en la superficie del control y de rhLAP. La regeneración se llevó a cabo cada ciclo con dos inyecciones de HCl 100 mM a 100 ul/minuto durante 9,6 segundos (16  $\mu$ l). Las muestras se analizaron por duplicado y se analizaron para determinar el nivel de TGF $\beta$ 1 unido.

Los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089 y el comparador BM-1 se analizaron todos en el ensayo de competición de rhLAP. El anticuerpo XPA.42.681, que se derivó de XPA.42.068, no se analizó. Como se muestra en la Figura 1, cada uno de XPA.42.068, XPA.42.089 y BM-1 mostró un elevado nivel de competición con rhLAP, lo que indica que los anticuerpos interactúan con la forma activa de TGF $\beta$  y no reconocen el TGF $\beta$  latente.

#### Ejemplo 6. Medición de neutralización con anticuerpos de TGF $\beta$ en el ensayo HT-2

Para determinar si los anticuerpos neutralizaban funcionalmente las isoformas de TGF $\beta$ , los métodos de ensayo de Ruegemer *et al.* (J Immunol. 144:1767-76; 1990) se adaptaron de modo que linfocitos T HT-2 de murino se hicieron crecer con IL-4, y con o sin la adición de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3. Las isoformas de TGF $\beta$  inhiben el crecimiento dependiente de IL-4 de los linfocitos HT-2 mediante transactivación de genes que fomentan la detención del ciclo celular. IL-4 transactiva el programa de expresión de un gen mitógeno activando dianas tales como c-myc y GM-CSF; mientras que la señalización de TGF $\beta$  transactiva genes que suprimen la expresión de c-myc y GM-CSF. Si la señalización de TGF $\beta$  se anula mediante un anticuerpo neutralizante, los linfocitos HT-2 proliferan. Las diferencias en el crecimiento se puntuaron mediante el ensayo de viabilidad CELL TITERGLO® (Promega n.º G7571) que mide el ATP como una lectura derivada de células metabólicamente activas.

Los linfocitos T HT-2 murinos se mantuvieron por división cada 2-3 días a 1,5e4 - 2,5e4 células/ml en RPMI + FBS al 10 %, Hepes 10 mM, glutamina 2 mM, 2-ME 50 uM. IL-2 recombinante de ratón (R&D Systems) nuevo se añadió a 200 UI/ml a cada matraz de un concentrado de stock. El día 1, las células se lavaron con medio para eliminar IL-2 y se dispensaron a placas de 96 pocillos opacos a 10.000 células por pocillo con 2000 UI/ml de IL-4 recombinante de ratón (R&D Systems). TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 (PeproTech n.º 100-21,100-35B, 100-36E) se añadió después de 1 hora de preincubación con o sin anticuerpos a lo largo de una serie de titulación. Después de una incubación de 48 horas a 37 °C, la población de células viables se puntuó con MDS Flexstation3 usando CELL TITERGLO® de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

**Tabla 6. Ensayo de neutralización de linfocitos HT-2**

Anticuerpo	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 3
XPA.42.068	+	98,0	0,0
XPA.42.089	+	57,0	0,0
XPA.42.681	+	Potente	30,3
BM-1	+	220,0	196,0

Los anticuerpos se analizaron inicialmente por su actividad de neutralización de TGF $\beta$ 2 en un único punto de dilución a 10 ug/ml en el ensayo de HT-2, y se confirmó que cada uno de los anticuerpos era positivo, teniendo los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681 mayor potencia que el anticuerpo de comparación BM-1 en el único punto estudiado. A continuación se determinó la neutralización de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 y se calculó un valor de IC50 para cada anticuerpo a través de una serie de dilución de 6 puntos. De nuevo, cada uno de los XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681 demostró mayor potencia que el comparador BM-1 con respecto a la neutralización de TGF $\beta$ 1, pero solo se descubrió que XPA.42.681 mostraba mayor potencia que para neutralización de TGF $\beta$ 3 y, por lo tanto fue el pan-inhibidor más potente de TGF $\beta$  (Tabla 6). XPA.42.681 mostró una potencia mejorada en este ensayo, donde las concentraciones más bajas analizadas inhibieron significativamente TGF $\beta$ 1 y, por tanto, no se pudo realizar un cálculo de la CI50 específica.

#### Ejemplo 7. Medición de neutralización con anticuerpos de TGF $\beta$ en un ensayo de liberación de IL-11

Un segundo ensayo de neutralización puntuó la secreción mediada por TGF $\beta$  de IL-11 desde células de carcinoma de pulmón A-549, que forma parte de una respuesta profibrotica en fibroblastos de pulmón y células epiteliales. TGF $\beta$  también media en la secreción de IL-11 desde células MDA-MB-231 que fomentan la metástasis al hueso. Este ensayo modela las respuestas biológicas mediadas por TGF $\beta$  que contribuyen a la fibrosis y a la enfermedad metastásica. El ensayo de liberación de IL-11 se adaptó de Rapoza *et al.* (J Immunol. Methods 316: 18-26; 2006), en donde células A549 se sembraron en placas de 96 pocillos y al día siguiente, las células se trataron con o sin las isoformas de TGF $\beta$ , se preincubaron con o sin anticuerpos neutralizantes. La liberación de IL-11 se puntuó en sobrenadantes de cultivo

celular mediante ELISA.

En este ensayo, las células A549 se hicieron crecer en F12 + 10 % de suero bovino. El día anterior al análisis, las células se desprendieron con verseno (para retener la expresión del receptor) y se sembraron a 40.000 células/pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos. Al día siguiente TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 a CE80 se preincubó durante 1 hora con o sin anticuerpos a través de una serie de dilución antes de añadir a las células. Como control, TGF $\beta$  en solitario, TGF $\beta$  + anticuerpo de control contra KLH-G2 o media en solitario se añadieron a las placas. Después de 24 horas a 37 °C, se recogió el sobrenadante e IL-11 se puntuó mediante ELISA usando el kit IL-11 Duo Set ELISA (R&D Systems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

10

**Tabla 7. Ensayo de liberación- de IL-11 - CI50 (ng/ml)**

Anticuerpo	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3
XPA.42.068	220,5	110,5	1795,0
XPA.42.089	37,0	58,0	0,0
XPA.42.681	0,4	1,0	0,8
BM-1	292,0	498,0	12,0

Tal como se muestra en la Tabla 7 anterior, y análogamente al ensayo con HT-2, los resultados del ensayo de liberación de IL-11 indicaron que XPA.42.681 era el más potente de todos los anticuerpos por cada una de las tres isoformas de TGF $\beta$ . A diferencia del ensayo de HT-2, el anticuerpo XPA.42.681 mostró un efecto dependiente de la dosis sobre la liberación de IL-11 que permitió la determinación de CI50, y también reveló valores de CI50 generalmente similares para cada isoforma de TGF $\beta$ . Los anticuerpos XPA.42.068 y XPA.42.089 también mostró buena neutralización de las isoformas TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 (más potentes que el comparador BM-1) pero con significativamente menos neutralización de TGF $\beta$ 3 en comparación con cualquiera del anticuerpo BM-1 o con respecto a la neutralización de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2.

20

#### Ejemplo 8. Medición de neutralización con anticuerpos de TGF $\beta$ en el ensayo pSMAD2

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos, se desarrolló un ensayo fosfo-SMAD2 (pSMAD2) para puntuar la neutralización de la señalización de TGF $\beta$  a través del complejo receptor TGF $\beta$ RII/TGF $\beta$ RI. Las células Detroit 562 se mantuvieron en IMDM + FBS al 10 %. Las células se desprendieron con verseno y se sembraron en una placa de 6 pocillos a 500.000 células por pocillo. Al día siguiente, las células se privaron de suero en IMDM exento de suero durante 3 horas antes de 30 minutos de exposición a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 preincubados durante 1 hora con o sin anticuerpos. Después de 30 minutos a 37 °C, las células se lisaron y pSMAD2 y el SMAD2 total se puntuó mediante ELISA usando kits comerciales (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para la detección. El porcentaje de pSMAD2 se normalizó a SMAD2t total y se calculó el porcentaje de inhibición para cada clon a partir de % pSMAD2 normalizado con respecto al control contra KLH (Figura 2). El ensayo con T (bilateral) mostró que el anticuerpo XPA.42.681 era significativamente más potente que el anticuerpo comparador BM-1 en la neutralización de la señalización de pSMAD para todas las isoformas de TGF $\beta$  ( $p<0,05$ ). Además, XPA.42.068 fue significativamente más potente contra TGF $\beta$ 2 respecto al comparador BM-1.

25

#### Ejemplo 9. Medición de la actividad del anticuerpo de TGF $\beta$ en un ensayo de linfocitos T reguladores

Para caracterizar la actividad de los anticuerpos sobre el TGF $\beta$  endógeno, se estableció un ensayo con linfocitos T reguladores (Treg), basándose en métodos similares a Tran *et al.* (Blood 110:2983-2990; 2007). Los linfocitos T se aislaron a partir de viales congelados de PBMC humanas usando el kit EasySep T cell Enrichment (StemCell Technologies, Vancouver, BC). Los linfocitos T se activaron con el anticuerpo dirigido contra CD3 humano unido a placa (eBioscience, San Diego, CA) a 10 ug/ml y anticuerpo dirigido contra CD28 humano soluble (eBioscience) a 2 ug/ml. Las células también se trataron en paralelo con 15 ug/ml de los anticuerpos de TGF $\beta$  o los controles. Después de 4 días, las células se tiñeron con anticuerpo contra CD4-FITC humano (BD Biosciences) y anticuerpo contra CD25-A647 humano (BioLegend, San Diego, CA) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se fijaron con tampón de fijación FOXP3 Fix (BioLegend) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se permeabilizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con tampón de permeabilización FOXP3 (BioLegend). Las células se tiñeron con una dilución 1:25 de anticuerpo contra FOXP3-PE humano (BioLegend) y se analizaron en un sistema BD FACSCanto™. Los linfocitos CD4+ se clasificaron y las subpoblaciones CD4+CD25+FOXP3+ se cuantificaron con el programa informático Flowjo. Los anticuerpos se evaluaron en este ensayo usando 4 o 5 donantes de PBMC diferentes, y se muestran los datos representativos de 2 donantes (Figura 3).

30

Aunque se ha descubierto un intervalo de actividad debido a las diferencias entre poblaciones de células dependientes del donante, generalmente, los anticuerpos XPA.42.681 y comparador BM-1 inhibieron la población de linfocitos Treg, mientras que los anticuerpos XPA.42.068 y XPA.42.089 proporcionaron una actividad parcial en este ensayo.

35

#### Ejemplo 10. Medición de la actividad del anticuerpo de TGF $\beta$ en un ensayo de EMT

La transición epitelial a mesenquimal (EMT) permite que la autorrenovación de las células tumorales fomente la invasión y metástasis del cáncer. La inducción de la EMT se activa mediante citocinas, que incluyen TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, y las tres isoformas pueden estar involucradas secuencialmente en la EMT dependiendo del tipo de tejido (Boyer *et al.*, Dev. Biol. 208:530-545, 1999; Bhowmick *et al.*, Mol. Biol. Cell 12:27-36, 2001; Camenisch *et al.*, Dev. Biol. 248:170-181, 2002). Se desarrolló un ensayo de EMT usando células mamarias primarias humanas (HMEC), análogamente a Mani *et al.* (Cell 133:704-715, 2008) para determinar si los anticuerpos inhiben este proceso *in vitro*.

5 Las células epiteliales mamarias humanas (Lonza, Basel, Suiza) se hicieron crecer en medio MEGM completo (Lonza) por recomendación del fabricante. Para el subcultivo, las células se tripsinizaron y se trataron con solución neutralizante de tripsina (Lonza) antes de la siembra. Las células HMEC se sembraron a 3500 células/cm<sup>2</sup> en portas con cámara de 8 pocillos y se trataron con o sin TGF $\beta$  a 2,5 ng/ml, se preincubaron con o sin anticuerpos durante 30 minutos. Las células se incubaron a 37 °C durante 8 días y se añadieron medio nuevo + reactivos después de 4 días.

10 El día 8, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se aclararon dos veces en PBS y se permeabilizaron con PBS + Triton X-100 al 0,25 % durante 10 minutos, antes de

15 bloquear con PBS-TWEEN + suero de cabra al 10 % durante 30 minutos. Las células se tiñeron durante la noche a 4 °C con un marcador mesenquimático usando un anticuerpo dirigido contra vimentina humana (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y con un marcador epitelial usando un anticuerpo dirigido contra E-Cadherina humana (Cell Signaling Technology) diluido 1:200 o 1:500, respectivamente. Las células se lavaron en PBS 3 veces y se incubaron

20 con los anticuerpos secundarios adecuados de cabra dirigido contra Ig de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 o de cabra dirigido contra Ig de conejo conjugado con Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Los portaobjetos se lavaron y se montaron con Gold Anti-Fade/DAPI antes de la microscopía de fluorescencia.

25 La exposición de las células HMEC a TGF $\beta$  en presencia del anticuerpo de control contra KLH dio como resultado un aumento en la tinción con vimentina y una reducción en la densidad de células totales, consistente con la detención del crecimiento mediada por TGF $\beta$  y diferenciación a un fenotipo mesenquimal. La neutralización de la EMT mediada por TGF $\beta$ 1 fue evidente basándose en la tinción con vimentina, que se correlacionó con el aumento en la densidad celular para los anticuerpos XPA.42.681, XPA.42.068 y XPA.42.089, mientras que se observó una respuesta intermedia para el comparador BM-1, ya que la tinción con vimentina seguía presente, aunque no en el mismo grado

30 que con el anticuerpo de control contra KLH (no se muestran los datos). Además, cada uno de los anticuerpos inhibió la EMT activada por TGF $\beta$ 2, aunque el anticuerpo comparador BM-1 parece menos potente, según la intensidad de la señal de vimentina, la tinción con E-cadherina y el aumento de la densidad celular. Para la neutralización de la EMT mediada por TGF $\beta$ 3, el anticuerpo XPA.42.681 fue el más potente, seguido por BM-1 y XPA.42.068, mientras que XPA.42.089 no pareció diferente del anticuerpo de control contra KLH.

35 **Ejemplo 11. Inhibición de tumor mediante los anticuerpos de TGF $\beta$  en un modelo de xenoinjerto en ratón**

Los anticuerpos XPA.42.068 y XPA.42.089 se evaluaron con respecto a su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores en un modelo de xenoinjerto derivado de Detroit 562, una línea de células de cáncer faríngeo humano (Van

40 Aarsen *et al.*, Cancer Res. 68:561-70; 2008). Ratones Nu/Nu de ocho a nueve semanas de edad (Charles River Laboratories) recibieron un implante subcutáneo de 5x10<sup>6</sup> células Detroit 562 en BD MATRIGEL™ (1:1.200 ul) por animal, en la región abdominal ventral inferior izquierda. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales con doce ratones cada uno: control de isotipo de IgG2 contra KLH humana (10 mg/kg), XPA.42.068

45 (dosis de 1, 3, o 10 mg/kg), XPA.42.089 (dosis de 1, 3 o 10 mg/kg), comparador BM-1 (3 mg/kg) o control de isotipo de IgG1 de ratón (3 mg/kg). La dosificación y las mediciones del volumen tumoral se realizaron quincenalmente (Figura 4). Los animales se sacrificaron el día después de la última dosis (día 28), después de la última dosis, después de 7

dosis de tratamiento con anticuerpo. Para todas las mediciones, la significación estadística se determinó mediante una prueba de la t de Student monolateral.

50 Como se muestra en la Figura 4, los tumores tratados con XPA.42.089 mostraron tendencia a tumores más pequeños que los tratados con XPA.42.068, con diferencias significativas en los niveles de dosis más altas cuando se compararon con el control con IgG2 contra KLH humana. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se comparó con el anticuerpo de control de IgG para el día 28 en todos los grupos experimentales. Los tumores en los grupos tratados con XPA.42.068 (3 y 10 mg/kg), XPA.42.089 (3 y 10 mg/kg) y también el comparador BM-1 (3 mg/kg)

55 fueron significativamente menores en el día 28 que para los grupos tratados con 1 mg/kg (valor P <0,05). Además, XPA.42.068 a 10 mg/kg y XPA.42.089 a 3 y 10 mg/kg mostraron diferencias significativas en comparación con la IgG del control usando la prueba ANOVA de Tukey (T capaz 8).

**Tabla 8. Inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto**

Grupos	Día 28		
	% ICT	Valor p para comparación múltiple por Anova de Tukey P<0,05?	Valor p con la prueba de la t monolateral
3 mg/kg de BM-1 vs IgG 1 de ratón	70,1	No	0,0089

1 mg/kg de XPA.42.068 vs IgG2 anti-KLH	21,3	No	0,3037
3 mg/kg de XPA.42.068 vs IgG2 anti-KLH	63,3	No	0,0339
10 mg/kg de XPA.42.068 vs IgG2 anti-KLH	99,8	Sí	0,0014
1 mg/kg de XPA.42.089 vs IgG2 anti-KLH	51,4	No	0,0948
3 mg/kg de XPA.42.089 vs IgG2 anti-KLH	87,3	Sí	0,0045
10 mg/kg de XPA.42.089 vs IgG2 anti-KLH	93,4	Sí	0,0024

Se realizó una evaluación adicional con el modelo de xenoinjerto Detroit 562 usando los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681. Ratones Nu/Nu de ocho a nueve semanas de edad (Charles River Laboratories) recibieron un implante subcutáneo de  $5 \times 10^6$  células Detroit 562 en BD MATRIGEL™ (1:1.200 ul) por animal, en la región abdominal ventral inferior izquierda. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales con doce ratones cada uno: control de isotipo de IgG2 contra KLH humana (3 mg/kg), XPA.42.068 (dosis de 1 o 3 mg/kg), XPA.42.089 (dosis de 1 o 3 mg/kg), XPA.42.681 (dosis de 1 o 3 mg/kg), comparador BM-1 (dosis de 1 o 3 mg/kg). La dosificación y las mediciones del volumen tumoral se realizaron quincenalmente (Figura 5). Los animales se sacrificaron el día después de la última dosis (día 30), después de la última dosis, después de 7 dosis de tratamiento con anticuerpo. Para todas las mediciones, la significación estadística se determinó mediante una prueba de la t de Student monolateral.

Como se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 9, los tumores tratados con XPA.42.681, XPA.42.089 y el comparador BM-1 a 3 mg/kg mostraron diferencias significativas en la ICT porcentual y en el volumen tumoral medio en el día 30, en comparación con el anticuerpo de control. Las comparaciones entre estos grupos no produjeron diferencias significativas usando la prueba de ANOVA de Tukey.

**Tabla 9. Inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto**

Grupos (vs. IgG2 anti-KLH)	Día 30		
	% ICT	Valor p para comparación múltiple por Anova de Tukey P<0,05?	Valor p con la prueba de la t monolateral
XPA.42.068 (1 mg/kg)	15,9	No	0,3434
XPA.42.068 (3 mg/kg)	42,7	No	0,1046
XPA.42.681 (1 mg/kg)	30,4	No	0,2183
XPA.42.681 (3 mg/kg)	78,7	No	0,0119
BM-1 (1 mg/kg)	20,7	No	0,3010
BM-1 (3 mg/kg)	79,3	No	0,0096
XPA.42.089 (1 mg/kg)	18,5	No	0,3030
XPA.42.089 (3 mg/kg)	81,8	No	0,0094

#### 20 Ejemplo 12. Inhibición del tumor mediante los anticuerpos de TGFβ en un modelo singénico en ratón

Los anticuerpos XPA.42.068 y XPA.42.089 también se evaluaron con respecto a su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores en un modelo singénico, usando células de cáncer de mama 4T1, usando un protocolo adaptado a partir de Nam *et al.* (Cancer Res. 68:3915-23; 2008). Ratones Balb/c hembra de ocho semanas de edad recibieron un implante subcutáneo con 250.000 células 4T1 en la 4<sup>a</sup> almohadilla de grasa mamaria en el día 0. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales con doce ratones cada uno, y recibieron el anticuerpo tres veces a la semana (empezando el día -1) en un único nivel de dosis de 10 mg/kg, de control de isotipo de IgG2 contra KLH humana, XPA.42.068, XPA.42.089, comparador BM-1 o control de isotipo de IgG1 de ratón. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces a la semana durante el experimento, y los datos se muestran en la Figura 6. Los datos de volumen tumoral al finalizar el estudio indicaron que tanto XPA.42.068 como XPA.42.089 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo de control KLH.

Además, los animales se sacrificaron el día final del estudio (día 23) y los tumores se extirparon para determinar el peso del tumor. Cada uno de los anticuerpos XPA.42.089, XPA.42.068 y BM-1 redujo significativamente la masa tumoral con respecto a las anticuerpos de control humano o de ratón (Figura 7).

Se realizó una evaluación adicional con el modelo de 4T1 singénico usando los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089

5 y XPA.42.681. Ratones Balb/c de ocho semanas recibieron un implante subcutáneo con 250.000 células 4T1 en la 4<sup>a</sup> almohadilla de grasa mamaria en el día 0. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales con doce ratones cada uno, y recibieron el anticuerpo tres veces a la semana (empezando el día -1) en un único nivel de dosis de 10 mg/kg, de control de isotipo de IgG2 contra KLH humana, XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681, BM-1 o control de isotipo de IgG1 de ratón. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces a la semana durante el experimento, y los datos se muestran en la Figura 8. Los datos de volumen tumoral al finalizar el estudio indicaron que cada uno de los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 y BM-1 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con los anticuerpos de control humana o de ratón.

10 Además, los animales se sacrificaron el día final del estudio (día 21) y los tumores se extirparon para determinar el peso del tumor. Cada uno de los anticuerpos XPA.42.089, XPA.42.068, XPA.42.681 y BM-1 redujo significativamente la masa tumoral con respecto a las anticuerpos de control humano o de ratón (Figura 9).

#### 15 Ejemplo 13. Efecto *in vivo* de los anticuerpos TGFβ sobre los linfocitos NK en un modelo de tumor en ratón

20 Para evaluar si los anticuerpos de TGFβ presentaban un efecto inmunomodulador *in vivo* sobre linfocitos citolíticos naturales (NK) presentes en tumores, los tumores aislados que se habían extirpado de ratones en los experimentos del modelo singénico con 4T1 anterior se digirieron para generar suspensiones de una sola célula. En resumen, los tumores recientemente recogidos se trituraron y se digirieron con 2,5 mg/ml de colagenasa II y 2,5 mg/ml de colagenasa IV en HBSS (15 minutos a 37 °C). Las células se contaron y se resuspendieron a 2e6/ml en PBS, BSA al 0,5 %, NaN3 al 0,1 % y 10 ug/ml del anticuerpo de bloqueo 2.4G2 contra Fc de ratón (eBioscience, San Diego, CA), y se incubaron durante 15 minutos a 4 °C. Tras lavar en PBS con BSA al 0,5 %, las células se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo contra CD335 (anti-NKp46), conjugado para tinción inmunofluorescente con análisis mediante citometría de flujo (BioLegend, San Diego, CA). CD335, también conocido como NKp46, es un marcador de superficie celular que se expresa exclusivamente en linfocitos NK CD3-CD56+, y se considera un marcador universal de los linfocitos NK. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % recientemente preparado y se analizaron en un sistema BD FACSCanto™. Para compensación se prepararon también controles de un solo color. Como se muestra en la Figura 10, el anticuerpo XPA.42.089 aumentó significativamente la expresión del marcador de linfocitos NK, NKp46 (CD335), dentro de los tumores extirpados de ratones, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos BM-1, XPA.42.068 y XPA.42.681 no produjeron un aumento similar de NKp46.

#### 30 Ejemplo 14. Efecto *in vivo* de los anticuerpos TGFβ sobre MDSC en un modelo de tumor en ratón

35 Para evaluar si los anticuerpos de TGFβ presentaban un efecto inmunomodulador *in vivo* sobre células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) (CD11b+/Gr1+) presentes en los tumores, los tumores aislados que se habían extirpado de los ratones en los experimentos del modelo singénico con 4T1 se prepararon como se ha descrito anteriormente y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos dirigidos contra CD11b y Gr1 conjugados para tinción inmunofluorescente con análisis mediante citometría de flujo (BioLegend, San Diego, CA). CD11b, también conocido como αM-integrina, y el antígeno Gr1 de diferenciación del linaje mieloide, también conocido como Ly6G, son marcadores de superficie celular expresados simultáneamente sobre las MDSC. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % recientemente preparado y se analizaron en un sistema BD FACSCanto™. Para compensación se prepararon también controles de un solo color. Como se muestra en la Figura 11, los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681 redujeron significativamente la acumulación de células supresoras derivadas de mieloide (MDSC, CD11b+/Gr1+) dentro de los tumores extirpados de los ratones, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. El anticuerpo comparador BM-1 no mostró una disminución similar en las MDSC.

#### 45 Ejemplo 15. Efecto *in vivo* de los anticuerpos TGFβ sobre las células dendríticas en un modelo de tumor en ratón

50 Para evaluar si los anticuerpos de TGFβ presentaban un efecto inmunomodulador *in vivo* sobre las células dendríticas (DC) presentes en tumores, los tumores aislados que se habían extirpado de los ratones en los experimentos del modelo singénico con 4T1 se prepararon como se ha descrito anteriormente y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo dirigido contra CD11c conjugado para tinción inmunofluorescente con análisis mediante citometría de flujo (BioLegend, San Diego, CA). CD11c, también conocido como αX integrina, es un marcador de superficie celular que se encuentra en las DC. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % recientemente preparado y se analizaron en un sistema BD FACSCanto™. Para compensación se prepararon también controles de un solo color. Como se muestra en la Figura 12, el anticuerpo XPA.42.089 disminuyó significativamente la expresión del marcador de DC, CD11c, dentro de los tumores extirpados de ratones, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos BM-1, XPA.42.068 y XPA.42.681 no mostraron una disminución similar en CD11c.

#### 60 Ejemplo 16. Efecto *in vivo* de los anticuerpos TGFβ sobre linfocitos T reguladores en un modelo de tumor en ratón

65 Para evaluar si los anticuerpos de TGFβ presentaban un efecto inmunomodulador *in vivo* sobre los linfocitos T reguladores (Treg) presentes en tumores, los tumores aislados que se habían extirpado de los ratones en los experimentos del modelo singénico con 4T1 se prepararon como se ha descrito anteriormente y se tiñeron durante 30

minutos a 4 °C con anticuerpos dirigidas contra CD4, CD25 y FOXP3 conjugados para tinción inmunofluorescente con análisis mediante citometría de flujo (BioLegend, San Diego, CA). CD4, también conocido como L3T4, así como CD25, también conocido como IL-2R $\alpha$  de baja afinidad, y también FOXP3, también conocido como proteína P3 de secuencia Forkhead, son todos ellos marcadores de superficie celular que aparecen en los linfocitos Treg. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % recientemente preparado y se analizaron en un sistema BD FACSCanto™. Para compensación se prepararon también controles de un solo color. Como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo XPA.42.068 disminuyó significativamente la acumulación de los linfocitos Treg dentro de los tumores extirpados de ratones, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos BM-1, XPA.42.089 y XPA.42.681 no mostraron una disminución similar en los linfocitos Treg.

**10 Ejemplo 17. Efecto *in vivo* de los anticuerpos TGF $\beta$  sobre linfocitos T citotóxicos en un modelo de tumor en ratón**

Para evaluar si los anticuerpos de TGF $\beta$  presentaban un efecto inmunomodulador *in vivo* sobre los linfocitos T citotóxicos (CTL) presentes en tumores, los tumores aislados que se habían extirpado de los ratones en los experimentos del modelo singénico con 4T1 se prepararon como se ha descrito anteriormente y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo dirigido contra CD8 conjugado para tinción inmunofluorescente con análisis mediante citometría de flujo (BioLegend, San Diego, CA). CD8 es un marcador de superficie celular que se encuentra en las CTL. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % recientemente preparado y se analizaron en un sistema BD FACSCanto™. Para compensación se prepararon también controles de un solo color. Como se muestra en la Figura 14, el anticuerpo XPA.42.068 aumentó significativamente los niveles de CTL dentro de los tumores extirpados de ratones, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos BM-1, XPA.42.089 y XPA.42.681 no mostraron un aumento similar en CTL.

25 Los resultados anteriores demuestran que los anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  divulgados en el presente documento tienen la capacidad de reducir el tamaño del volumen tumoral así como de modular las células inmunitarias que se infiltran en tumores y contribuyen al crecimiento tumoral *in vivo*. Esto sugiere que los anticuerpos contra TGF $\beta$  descritos en el presente documento proporcionarán un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer, en particular, en 30 cánceres en los que una o más de las células inmunitarias de los ejemplos anteriores se infiltran en las células tumorales.

**Ejemplo 18. Mejora de la actividad citolítica de los linfocitos NK**

35 Se desarrolló un sistema de cultivo simultáneo de linfocitos citolíticos naturales (NK) para imitar la interacción crónica entre los linfocitos NK y las células tumorales *in vivo*, para evaluar la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  para mejorar la actividad citolítica de los linfocitos NK. La línea de células de carcinoma mamario de ratón productora de TGF $\beta$ , 4T1, se usó. Los linfocitos NK se purificaron a partir de bazo de ratones Balb/c normales y se cultivaron simultáneamente con células tumorales 4T1 marcadas con CFSE durante 48 horas en presencia de IL-2 (500 UI/ml) en placas de 6 pocillos. Los anticuerpos contra TGF $\beta$  y del control se añadieron al sistema del subcultivo 40 y los linfocitos NK se recogieron 48 horas después. La producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos NK se midió inmediatamente después del cultivo simultáneo mediante tinción intracelular. Los linfocitos NK se clasificaron como células negativas para CFSE y su actividad citolítica se analizó mediante ensayos de destrucción convencionales contra la línea de células tumorales Yac-1. Los linfocitos NK se cultivaron simultáneamente con células Yac-1 45 marcadas con CFSE en una relación de efector:diana (E:T) de 20:1 durante 4 horas en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se usó la tinción de yoduro de propidio (PI) para marcar la muerte celular.

Los linfocitos NK mostraron un aumento en la producción de IFN $\gamma$  elevado pero no significativo entre los grupos tratados con anticuerpo en comparación con el grupo tratado con anti-KLH. En los ensayos de destrucción celular, para una relación efector:diana de 20:1, el anticuerpo BM-1 y los dos anticuerpos XPA.42.089 y XPA.42.681 mejoraron significativamente la actividad citolítica de los linfocitos NK (Figure 15). Además, los linfocitos XPA.42.089 y XPA.42.681 aumentaron la capacidad de los linfocitos NK para destruir las células tumorales diana hasta el 97,8 % y 96,7 %, que son niveles significativamente mayores que los del comparador estándar ( $P<0,0001$ ). Este resultado indica que los anticuerpos neutralizantes de TGF $\beta$  de la presente divulgación pueden mejorar significativamente la actividad citolítica de los linfocitos NK que se había amortiguado debido a la interacción crónica con las células tumorales productoras de TGF $\beta$  *in vitro*.

**Ejemplo 19. Inhibición de la función tolerogénica de las células dendríticas CD8+**

60 Se desarrolló un sistema *in vitro* basado en una reacción linfocitaria mixta (MLR) para evaluar la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  para inhibir la función tolerogénica de TGF- $\beta$  en células dendríticas (DC) CD8+. La MLR es un experimento clásico utilizado para probar la presentación de antígenos en las DC sin agregar antígenos externos al sistema. Bazos procedentes de ratones Balb/c normales se cortaron en fragmentos pequeños y se incubaron en RPMI al 10 % y 1 mg/ml de collagenasa de tipo IV durante 1 hora a 37 °C en una incubadora con agitación. Despues de añadir EDTA durante 5 minutos más, la solución se filtró a través de una malla de nylón. Las DC CD11c+ 65 se tiñeron con anticuerpo dirigido contra Cd11c biotinilado y se seleccionaron los resultados positivos usando un kit de purificación de biotina vendido por Stemcell Technologies. Las DC CD11c+ se tiñeron con anticuerpo dirigido contra

CD8. Las poblaciones CD8+ y CD8 se clasificaron en un clasificador celular BD FAC-SARIA™. Las DC CD8+ se cultivaron con anticuerpos dirigidos contra TGFβ o anticuerpo del control durante 24 horas y se mezclaron con las DC CD8- en una relación 1:10. Los linfocitos T se purificaron a partir de bazos B6 normales usando un kit de selección negativa para linfocitos T comercializado por Stemcell Technologies y marcado con CFSE. Las DC mezcladas se cultivaron simultáneamente con linfocitos T B6 durante 5 días en placas de 96 pocillos de fondo redondo. La función inmunoinhibidora de las DC CD8+ se evaluó mediante la proliferación de linfocitos T. Si las DC CD8+ inhiben la actividad de las CD8-DC para presentar antígenos, los linfocitos T B6 proliferaron menos. Si los anticuerpos dirigidos contra TGFβ bloquean TGFβ autocriño y amortiguan la función tolerogénica de las DC CD8+, los linfocitos T B6 proliferan más.

Como se muestra en la Figura 16, se observó poca carga en la proliferación de linfocitos T para el grupo tratado con BM-1 en comparación con el grupo de control tratados con anti-KLH. Por el contrario, los dos anticuerpos XPA.42.089 y XPA.42.681 aumentaron significativamente la proliferación de linfocitos T en comparación con el grupo del control tratado con anti-KLH, y el efecto de XPA.42.681 sobre la proliferación de linfocitos T fue significativa en comparación con el anticuerpo estándar, BM-1. Estos datos muestran que al bloquear TGF-β, el efecto tolerogénico de las DC CD8+ sobre las DC inmunogénicas se puede reducir, lo que puede proporcionar una presentación de antígenos mejorada por las DC inmunogénicas.

#### Ejemplo 20. Potenciación de la función CTL

Se desarrolló un sistema *in vitro* para imitar la activación de las CTL en condiciones de tumor y determinar si la función CTL se podría potenciar mediante los anticuerpos dirigidos contra TGFβ. La activación de CTL fue evaluada mediante la expresión y función de CD25 por tinción con perforina y granzima B (GzmB) (Massague *et al.* Cancer Cell 8: 369-380, 2005). Los linfocitos T se purificaron a partir de bazos de Balb/c normales mediante selección negativa de linfocitos T (Stemcell Technologies). Las perlas MAC se revistieron con anticuerpos contra CD3 y CD28 con el kit de activación/expansión de linfocitos T de Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Los linfocitos T y las perlas MAC revestidas con anticuerpos contra CD3 y CD28 se cultivaron simultáneamente en una relación 1:1 a una concentración de 2X10e6/ml en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en presencia de 20 ul de sobrenadante del cultivo de 4T1 durante 48 horas, con anticuerpos dirigidos contra TGFβ y anticuerpo del control. La activación de CTL se evaluó mediante la expresión de CD25 superficie celular, y la función se evaluó mediante la expresión de GzmB (Figura 17A) y perforina (Figura 17B), determinadas mediante tinción intracelular usando un protocolo de tinción FoxP3.

Consistente con los datos publicados, no se observaron cambios en la expresión de CD25 entre los grupos tratados con anticuerpo y el grupo del control. Las CTL tratadas con BM-1 mostraron cambios mínimos en la expresión tanto de GzmB como de perforina. Sin embargo, los dos anticuerpos XPA.42.089 y XPA.42.681 aumentaron significativamente la expresión de GzmB en las CTL en comparación con el tratamiento con anti-KLH del control ( $P<0,001$ ). Además, el aumento en la expresión de GzmB en CTL tratadas con XPA.42.089 fue significativamente mayor que para el comparador BM-1 ( $P<0,05$ ). Para la expresión de perforina, las CTL tratadas con XPA.42.089 y XPA.42.681 produjeron significativamente más perforina en comparación con las CTL tratadas con anti-KLH ( $P<0,05$ ). Asimismo, XPA.42.681 mejoró la expresión de perforina en las CTL significativamente más que el comparador BM-1 ( $P<0,05$ ). Por consiguiente, los dos anticuerpos XPA.42.089 y XPA.42.681 pueden restaurar la expresión tanto de GzmB como de perforina suprimida por TGF-β secretada por las células tumorales en este sistema de cultivo *in vitro* y, por lo tanto, proporciona un mecanismo para reforzar la función CTL neutralizando el TGFβ producido por las células tumorales.

#### Ejemplo 21. Inhibición de la función de las MDSC y de los Treg

Se desarrolló un sistema de cultivo simultáneo *in vitro* para evaluar el efecto de las células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) sobre la expansión y la función de los linfocitos T reguladores (Tregs), y la capacidad de los anticuerpos dirigido contra TGFβ de la presente divulgación para inhibir la actividad de las MDSC y de los Treg.

Se sabe que las MDSC suprimen la respuesta inmunitaria contra los tumores y fomentan la invasión tumoral y la metástasis, y también fomentan la expansión y la función de los Treg, conocidos por regular defectivamente las respuestas inmunitarias. Ratones BALB/c hembra se inocularon en la glándula mamaria abdominal con 7 X10<sup>3</sup> células tumorales 4T1 en 50 ul IX PBS. Los bazos se recogieron el día 21 y las MDSC se purificaron mediante anticuerpo de Cd11b marcado con biotina y un kit de selección positiva para la biotina (Stemcell Technologies). Al mismo tiempo, se recogieron bazos BALB/c normales, y los linfocitos T se purificaron con un kit de selección sustractiva para los linfocitos T (Stemcell Technologies). Las células se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra CD4-FITC y anticuerpo dirigido contra CD25-PE. Las células doblemente positivas se clasificaron con un clasificador celular FACSARIA™ (BD Bioscience). La población de Treg se marcó con CFSE y se cultivó simultáneamente con las MDSC procedentes de ratones inyectados con tumor 4T1 en una relación 1:1 durante 5 días en presencia de anticuerpos dirigidos contra TGFβ o anticuerpos del control. La expansión de los Treg se mide por las divisiones de las CFSE. Para evaluar el efecto de las MDSC sobre la función de los Treg, las MDSC recogidas a partir de ratones BalB/c que recibieron 4T1 se marcaron con CFSE y se cultivaron simultáneamente con Treg durante 5 días en presencia de anticuerpos dirigidos contra TGFβ o anticuerpos del control. Los Treg se clasificaron como población negativa para CFSE a partir de los cultivos simultáneos. Los linfocitos T procedentes de ratones BALB/c normales se marcaron con CFSE y se sembraron

en placas a  $2 \times 10^6$  células/ml con perlas anti-CD3 y anti-CD28. Los Tregs clasificados se añadieron al sistema de cultivo. La función inhibidora de los Treg se midió analizando el número de divisiones de CFSE de los linfocitos T.

#### Ejemplo 22. Inhibición de la fibrosis mediante los anticuerpos de TGF $\beta$ en un modelo de ratón

- 5 Los anticuerpos de la presente divulgación también se evaluaron por su capacidad para inhibir la fibrosis (por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis renal) en modelos de fibrosis en animales.
- 10 Fibrosis renal
- 15 Se usó un modelo de fibrosis renal para evaluar los anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  (Ling *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol. 14:377-388; 2003). Ciclosporina A (CsA, 30 mg/kg) o aceite de oliva como control con vehículo, se inyectaron por vía subcutánea una vez al día durante 4 semanas en ratones ICR de 6-7 semanas de edad que seguían una dieta baja en sal (LSD, 50-100 ppm de NaCl) para iniciar la enfermedad fibrótica renal. Los ratones del control se mantuvieron con una dieta normal y no recibieron CsA. El anticuerpo de TGF $\beta$  XPA.42.089 o un anticuerpo de IgG de control se administraron por vía intraperitoneal (2,5 mg/kg, TIW) desde el día anterior a iniciar el tratamiento con CsA. Los animales se sometieron a eutanasia, y el suero, orina y riñones se recogieron para su evaluación histológica y los criterios de valoración de la función renal.
- 20 La exploración histopatológica se llevó a cabo mediante tinción de secciones de riñón fijadas con formalina e incluidas en parafina (5  $\mu$ m) con hematoxilina-eosina (H&E) y tricrómica de Masson, usando técnicas convencionales. La valoración de los cambios histopatológicos inducidos por la CsA puede incluir una puntuación semicuantitativa habitualmente aceptada (Ling *et al.*, Am. J. Physiol. 277:F383-F390, 1999) de secciones codificadas y valoraciones sobre la base de cualquiera o de todos los daños tubulares, infiltrados intersticiales, engrosamiento de las arteriolas, expansión tubulointersticial y fibrosis, incluida por ejemplo la puntuación por recuento del porcentaje de la zona enferma por sección renal. Secciones sagitales renales procedentes de ratones del control normales, inyectados con CsA y tratados con anticuerpo XPA.42.089 se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson. Se observó la aparición de fibrosis inducida por CsA en el tubulointersticio de los ratones que recibieron CsA, pero no en los animales del control. Además, se observó un aumento en el diámetro de la luz de algunos túbulos en los ratones tratados con CsA. El tratamiento con el anticuerpo XPA.42.089 redujo la cantidad de fibrosis inducida por CsA observada en el tubulointersticio junto a una reducción en el diámetro del túbulos.
- 25 La función renal también se puede evaluar por cualquiera o todos de creatinina sérica, nitrógeno urea en sangre y biomarcadores en orina de la disfunción renal.
- 30 La función renal también se puede evaluar por cualquiera o todos de creatinina sérica, nitrógeno urea en sangre y biomarcadores en orina de la disfunción renal.
- 35 El nitrógeno ureico en suero sanguíneo (BUN) es un indicador de la disfunción renal. En este estudio, BUN aumentó significativamente en los ratones expuestos a la CsA en comparación con los ratones del control alimentados con pienso para mascotas o LSD (Figura 18). El tratamiento con XPA.42.089 redujo significativamente la BUN sérica en comparación con el anticuerpo de IgG del control.
- 40 La albuminuria, o un aumento en la acumulación de albúmina en la orina, es característica de la disfunción glomerular del riñón enfermo. En este estudio, la albúmina en orina aumentó casi cuatro veces en ratones CsA con respecto a los ratones del control alimentados con pienso para mascotas o LSD (Figura 19). El tratamiento con XPA.42.089 dio como resultado una mejora significativa en la albuminuria en comparación con los ratones.
- 45 Los niveles de colágeno de tipo IV en orina, que reflejan la extensión de la deposición de ECM y la fibrosis en los riñones, aumentaron significativamente en los ratones CsA con respecto a los ratones del control alimentados con pienso para mascotas o LSD (Figura 20). El tratamiento con XPA.42.089 disminuyó moderadamente el colágeno de tipo IV en orina, comparados con el anticuerpo de IgG del control.
- 50 Se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa sobre el tejido renal para determinar la expresión de los genes involucrados en la fibrosis. El ARN total se aisló de los riñones (corteza y médula) utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se sintetizó la primera hebra de ADNc utilizando cebadores aleatorios y MULTISCRIBE™ RT (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). A continuación se realizó la RT-PCR cuantitativa sobre 2  $\mu$ l de ADNc usando la mezcla SYBR Green (Roche) en el sistema LIGHTCYCLER 480 Real Time PCR (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los valores se normalizaron a la ciclofilina y se calcularon usando el método comparativo CT. TGF- $\beta$ 1 es un potente inductor de la diferenciación de fibroblastos y de la deposición de proteínas ECM, incluido el colágeno de tipo III. La expresión de TGF- $\beta$ 1 fue casi dos veces mayor en animales tratados con CsA en comparación con los ratones del control (Figura 21A). El tratamiento con XPA.42.089 redujo significativamente los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 en el riñón, en comparación con el anticuerpo de IgG del control. Se observó un efecto similar para la expresión de colágeno tipo III, con una elevación moderada observada en ratones tratados con CsA (Figura 21B). El tratamiento con XPA.42.089 dio como resultado una disminución en los niveles de expresión de colágeno de tipo III en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de IgG del control.
- 55 Fibrosis pulmonar
- 60

Se puede usar un modelo de fibrosis pulmonar, esencialmente como el descrito por Wilson *et al.* (J. Exp. Med. 207:535-552; 2010). Ratones C57BL/6 se anestesiaron e instilaron por vía intratraqueal con 0,15 U de sulfato de bleomicina (Calbiochem, La Jolla, CA) en suero salino, con o sin anticuerpo (por ejemplo, n=10 por grupo, 500 ug) los días -1,3 y 5. Los animales se sacrificaron el día 7 para el análisis de la histología pulmonar, contenido de colágeno en pulmón (por ejemplo, deposición de colágeno) e infiltración inflamatorias. Para la histología pulmonar, secciones de 5 µm de tejido pulmonar incluido en parafina se tiñeron con tricrómica de Masson. La lesión pulmonar, medida como colágeno en lavado broncoalveolar (LBA) y deposición de colágeno en el pulmón, se cuantificó usando el ensayo Sircol. La infiltración inflamatoria se midió en los BAL mediante citometría de flujo.

10 **Ejemplo 23. Tratamiento de trastornos oftalmológicos mediados por el TGFβ**

Los anticuerpos dirigidos contra TGF β de la presente divulgación se puedan usar para el tratamiento de numerosas dolencias y patologías oftalmológicas (es decir, del ojo), incluidas por ejemplo enfermedades fibróticas del ojo (por ejemplo, enfermedades asociadas con estados fibroproliferativos).

15 *Neutralización de TGFβ1 en las células epiteliales del epitelio pigmentario retinal (EPR)*

El mantenimiento del fenotipo epitelial es fundamental para la homeostasis de los tejidos. En la retina, la desdiferenciación del epitelio pigmentario retinal (RPE) produce disfunción y fibrosis retiniana, y TGFβ contribuye a la desdiferenciación retiniana mediante numerosos mecanismos, algunos de los cuales son dependientes de la activación de la ruta SMAD2. Los anticuerpos de la presente divulgación se evaluaron por su capacidad para contrarrestar la activación de las respuestas a TGFβ en células RPE, usando un ensayo pSMAD2.

25 Células del epitelio pigmentario retinal (RPE) (Lonza n.º 194987) se mantuvieron en medio de crecimiento para células del epitelio pigmentario retinal (Lonza.º 00195409). Las células se desprendieron con tripsina, la tripsina se neutralizó (solución de neutralización de tripsina, Lonza.º CC-5002), y las células se aglomeraron, se resuspendieron a 1e6 células/ml y se sembraron en placas a 100.000 - 200.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos. El día siguiente, las células se lavaron, y se añadió medio basal RPE (Lonza.º 00195406) para detener las células en la fase G0/G1. Al día siguiente, las células se trataron con 10 ng/ml de TGFβ1 (Peprotech n.º 100-21) preincubadas durante 5 minutos con o sin anticuerpos de TGFβ XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681, los anticuerpos de referencia BM-1 y BM-2, o un anticuerpo anti-KLH-G2 del control a 10 ug/ml. Despues de 30 minutos a 37 °C, las células se lisaron en tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) que contenía fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM (PMSF) recién agregado. Tras agitar por balanceo durante 5 minutos a 4 °C, las células se rasparon y se dispensaron en una placa de 96 pozos profundos para lisis sobre hielo durante 20 minutos. Los lisados se centrifugaron a 3K durante 5 minutos a 4 °C. Los lisados se diluyeron y se analizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para fosfo-SMAD2 (Cell Signaling n.º 7348) y detección con SMAD2 total (Cell Signaling n.º 7244).

40 Como se muestra en la Figura 22, el tratamiento con TGFβ1 produce un sólido aumento de pSMAD2 en células RPE, que se neutralizó significativamente mediante cada uno de los anticuerpos XPA.42.089, XPA.42.068 y XPA.42.681, y los anticuerpos de referencia. Estos datos sugieren que XPA.42.089, 068 y 681 pueden contrarrestar la señalización mediada por TGFβ en las células RPE e indica que los anticuerpos pueden ser de utilidad en el tratamiento de disfunciones retinianas.

45 *Vitrorretinopatía proliferativa*

La vitrorretinopatía proliferativa (PVR) es la causa más habitual de fracaso en la cirugía por desprendimiento de retina. La PVR se caracteriza por la formación de membranas fibrovasculares dentro de la cavidad del vítreo por encima y por debajo de la retina, produciendo el posterior desprendimiento de retina. Diversos factores contribuyen a la progresión de la PVR, y se cree que el TGFβ tiene un papel central. TGFβ es abundante en el vítreo de pacientes con PVR, y las funciones características del TGFβ, tales como la inducción de la transición epitelial a mesenquimal (EMT), la estimulación de la producción de matriz extracelular, contracción de la membrana celular e inducción de inflamación, son todos ellos factores negativos en la progresión de la PVR.

55 Para evaluar el efecto de los anticuerpos de la presente divulgación, se indujo PVR experimental en un modelo de conejo (Oshima *et al.*, 2002, Gene Ther. 9:1214-1220; Fastenberg *et al.*, Gene Ther. 2002, 9:1214-1220). Conejos adultos pigmentados se anestesiaron mediante una inyección intramuscular de isoflurano o ketamina y xilazina. Las pupilas se dilataron con una gota de clorhidrato de fenilefrina al 10 %, tropicamida al 1 % y sulfato de atropina al 1 %. Un ojo de cada conejo se inyectó con 5,0 X 10e5 células de fibroblastos de conjuntiva de conejo en 0,1 ml de solución de BSS en la cavidad vítreo a través de la pars plana. La vitrectomía de la pars plana inducirá al modelo de PVR. Inmediatamente después, una única inyección de BSS, anticuerpo dirigido contra TGFβ (por ejemplo, XPA.42.089, XPA.42.681, 5 mg) o anticuerpo del control (por ejemplo, anti-KLH-G2) se administró a grupos de 10 animales y, opcionalmente, se repitió semanalmente. Todos los ojos inyectados se exploraron con oftalmoscopio los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 28, y la PVR se clasificó en seis etapas usando los criterios clínicos descritos por Fastenberg *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 93:565-572, 1982).

65 *Quemadura con ácido en la córnea*

- El traumatismo ocular en forma de quemaduras con ácali de la córnea es un grave problema clínico y puede producir una alteración visual grave y permanente. La activación de las células de la córnea, es decir, queratocitos y células epiteliales, y la entrada de células inflamatorias tales como monocitos/macrófagos, están involucrados en la patogénesis de la lesión después del daño tisular con ácali en la córnea, y puede producir defectos epiteliales permanentes. Además, la rotura de la membrana basal mediante las metaloproteinasas de la matriz (MMP, gelatinasas) secretadas por estas células contribuye a la ulceración patogénica y a la perforación del estroma. La conjuntivalización de la superficie de la córnea sobre la pérdida de citoblastos limbales, junto con la opacificación y la neovascularización del estroma corneal, todos ellos alteran la visión del paciente en las fases finales de la cicatrización.
- 5 Numerosos factores de crecimiento y citocinas, incluido TGF- $\beta$ , se consideran involucradas en la destrucción de tejido y cicatrización posterior que se produce en la córnea después de la quemadura con ácali.
- 10

Para evaluar el efecto de los anticuerpos de la presente divulgación, se usó un modelo de quemadura con ácali en ratón (Saika *et al.*, Am. J. Pathol. 2005, 166:1405-18). En resumen, tres  $\mu$ l de hidróxido de sodio 1 N se aplicaron al ojo derecho de ratones C57BL/6 adultos ( $n = 72$ ) para producir una quemadura con ácali en la superficie ocular con anestesia tanto general como tópica. Los anticuerpos dirigidos contra TGF- $\beta$  (por ejemplo, XPA.42.089, XPA.42.681) o anticuerpo del control (por ejemplo, anti-KLH-G2) se administraron ( $n = 24$ /grupo) a las 2 horas y los días 5, 10 y 15 después de la exposición al ácali. Se usó la tinción con fluoresceína de la córnea para visualizar los defectos de la superficie (por ejemplo, el epitelio lesionado). Después de la exploración de la córnea con fluoresceína, el globo ocular se enucleó 2 horas después del marcado con bromodesoxiuridina y se procesaron para exploración histológica bien en parafina o como criosecciones los días 3, 5, 10 y 20.

#### *Fibrosis del cristalino*

- 25 Después de una lesión, las células epiteliales del cristalino experimentan EMT, que contribuye a la formación de tejido fibrótico en el cristalino lesionado. Se observa un fenómeno similar en la cápsula del cristalino humano después de la extracción de cataratas e implantación de un cristalino artificial intraocular. Dicha reacción fibrótica relacionada con EMT es clínicamente desfavorable ya que puede producir la opacificación y la contracción de la cápsula del cristalino anterior remanente, así como la opacificación de la cápsula posterior. El humor acuoso ocular contiene abundante TGF- $\beta$  y se ha sugerido un papel para TGF- $\beta$  en la EMT relacionada con lesiones en las células epiteliales del cristalino.
- 30

Para evaluar el efecto de los anticuerpos de la presente divulgación, se indujo fibrosis corneal experimental en un modelo de ratón (Saika, *et al.*, Am J Pathol. 2004, 164:651-663). Ratones adultos (4 a 6 semanas de edad) se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (70 mg/kg). Se realizó una pequeña incisión en la cápsula central anterior con la parte de la cuchilla de una aguja hipodérmica de calibre 26 a través de una incisión corneal en el ojo derecho después de aplicación tópica de midriáticos y un colirio de oxibuprocaína como anestésico. Inmediatamente después, los anticuerpos dirigidos contra TGF $\beta$  (por ejemplo, XPA.42.089, XPA.42.681) o anticuerpo del control (por ejemplo, anti-KLH-G2) ( $n = 24$ /grupo) se administraron a los ojos dos veces por semana en la duración del estudio. El ojo izquierdo sirve como control sin lesionar. La profundidad de la lesión es ~300  $\mu$ m, o aproximadamente un cuarto de la longitud de la parte de cuchilla de la aguja, que produce la formación de tejido fibrótico alrededor del cristalino lesionado. Tras la instilación de la pomada de ofloxacina, los animales se dejaron cicatrizar durante 6 horas hasta 8 semanas. Las células proliferativas se marcaron con una inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina, seguido por sacrificio de los animales 2 horas después y enucleación de cada ojo para el análisis.

#### *Cirugía de glaucoma postquirúrgico*

El determinante principal del resultado a largo plazo de la cirugía del glaucoma es la respuesta a la cicatrización de la herida. Una cicatrización excesiva después de la intervención en la conjuntiva y esclerostomisites se asocia con un mal control de la presión después de la cirugía. El uso de los agentes antiproliferativos 5-fluourouracilo (5-FU) y mitomicina C (MMC) en dicha cirugía también puede producir una muerte y apoptosis celular diseminada y puede dar como resultado erosiones en la córnea y vesículas avasculares tipo quiste.

- 55 Para evaluar el efecto de los anticuerpos de la presente divulgación sobre estas dolencias asociadas a la cirugía del glaucoma, se usó un modelo en conejo (Mead *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003, 44:3394-3401). La cirugía de filtración para glaucoma se llevó a cabo en los ojos izquierdos de conejos New Zealand White (12 y 14 semanas de edad) con anestesia general (ketamina y xilazina). Una sutura de tracción en la córnea con seda 8-0 de espesor parcial de colocó a las doce en punto, para aumentar la exposición a la conjuntiva superior. Se elevó un colgajo conjuntival en el fornix, y se llevó a cabo la disección roma del espacio subconjuntival hasta una distancia de 15 mm bajo el limbo.
- 60 Se usó una cuchilla MVR para practicar un túnel escleral de espesor parcial, desde 4 mm detrás del limbo y continuando hasta que la hoja sea visible en el estroma de la córnea anterior. A continuación se hizo pasar una cánula intravenosa calibre 22/25 mm a través del túnel escleral hasta que la aguja de la cánula sea visible en la córnea transparente. La aguja de la cánula entra en la cámara anterior, la cánula se hace avanzar en la zona mediopupilar y la aguja se retira. Por último, la cánula se recorta y bisela por su extremo escleral de forma que sobresalga 1 mm desde el punto de inserción, y se usó una sutura de nylon 10-0 para fijar el tubo a la superficie escleral. La incisión conjuntival se cerró con dos suturas interrumpidas y una sutura de nylon 10-0 de tipo colchón central sobre una aguja
- 65

para producir un cierre estanco. Una gota de sulfato de pomada de atropina al 1 % y fosfato de betametasona sódica al 0,1 %, sulfato de neomicina al 0,5 % se instiló al final de la cirugía. A continuación, los animales se distribuyeron aleatoriamente para recibir un ciclo de inyecciones subconjuntivales (100 µl) de anticuerpo dirigido contra TGFβ (por ejemplo, XPA.42.089, XPA.42.681) o anticuerpo del control (por ejemplo, anti-KLH-G2) (por ejemplo, 5 mg/ml; 16/grupo). Las inyecciones subconjuntivales se administraron los días 2, 3, 4, 7, 9, 11 y 14 tras la cirugía (día 0) con anestesia tópica (colirio de clorhidrato de proximetacaína al 0,5 %, 1 gota en cada ojo), usando una aguja de calibre 30. El anticuerpo se injectó 5 mm detrás del limbo en el margen nasal del músculo recto superior. 5-FU se administró 180° desde el sitio de la cirugía.

La medición de la presión intraocular en ambos ojos se realizó con un tonómetro manual después de la instilación tópica del colirio con proximetacaína HCl al 0,5 %. El aspecto de la conjuntiva y la zona de drenaje se observaron. Todos los animales se examinaron por un observador enmascarado en horas establecidas después de la cirugía. La valoración de ambos ojos (ojo contralateral no tratado usado como control) se realizó diariamente desde los días 0 a 4 y posteriormente en períodos regulares, al menos dos veces por semana. Las características de la vesícula, incluida la longitud, anchura y altura, se midieron con calibres, y se registró la presión intraocular. Las características de vascularidad de la vesícula de drenaje se clasificaron dividiendo las áreas conjuntivales en cuadrantes, y puntuando el aspecto (0, avascular; +1, vascularidad normal; +2, hiperémica; y +3, muy hiperémica). Se realizó la exploración con lámpara de hendidura para identificar la actividad de la cámara anterior (0, tranquila; 1, células; 2, fibrina; y 3, hipopión) y profundidad de cámara anterior, que se registra como profundo (+2), somero (+1) o plano (0). Se realizó una valoración de la duración de la epiteliotipia corneal después de la instalación tópica de lignocaína fluoresceína en el ojo izquierdo y se puntuó de acuerdo con el área de la córnea afectada (0, nula; 1, <5 %; 2, <50 %; 3, <75 %; 4, <90 %; 5, hasta un 100 %). La supervivencia de la vesícula se tomó como el punto final primario de eficacia. El fallo de la vesícula se definió por la aparición de una vesícula plana vascularizada y cicatrizada en presencia de la cámara anterior profunda. El área y la altura de la vesícula, la profundidad de la cámara anterior y la actividad, y la vascularidad de la conjuntiva por cuadrante se analizaron. También se procesaron los tejidos para examen histológico (por ejemplo, deposición de colágeno en la subconjuntiva) procedente de algunos animales.

Se espera que los anticuerpos dirigidos contra TGFβ divulgados en el presente documento inhiban la actividad de TGFβ durante las incidencias fibróticas en el ojo, reduciendo de este modo la deposición fibrótica y mejorando los síntomas asociados con la fibrosis del ojo.

Se espera que a los expertos en la técnica se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones en la divulgación que se ha definido en los ejemplos ilustrativos anteriores. Por consiguiente, solo las limitaciones que aparecen en las reivindicaciones adjuntas deben imponerse sobre la divulgación.

### 35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bedlinger, et al.  
 40 <120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA TGF-BETA  
 <130> 27129/45863  
 <150> 61/493230  
 45 <151> 03/06/2011  
 <160> 30  
 <170> PatentIn versión 3,5  
 50 <210> 1  
 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Nucleótido sintético  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <223> Cadena pesada del clón XPA.42.068  
 <400> 1

	cagggttcagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg atcaacccta acactggtgg cacaactat	180
	gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accaggaca cgtccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtt attactgtgc gagatcattc	300
	ctgtggctgg ttccctctga tgctttgat atctggggcc aaggacaat ggtcaccgtc	360
	<b>tcttca</b>	<b>366</b>
	<210> 2	
	<211> 122	
5	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Péptido sintético	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> Cadena pesada del clon XPA.42.068	
15	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (26)..(33)	
	<223> H-CDR1	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (51)..(58)	
	<223> H-CDR2	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (97)..(111)	
	<223> H-CDR3	
30	<400> 2	

ES 2 894 398 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Nucleótido sintético

<220>

<221> misc\_feature

<223> Cadena ligera del clon XPA.42.068

15 <400> 3

tcttctgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggagagaa ggccaggatt	60
acctgtgggg ggaataacat tggacgtaaa agtgtacatt ggtaccagca gaggccaggc	120
caggccccctg ttgtggtcct ctactatgtat agagtcagac cctcagggat ccctgagcga	180
ttttctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaccaggtt cgaagccggg	240
gatgaggccg actatttttg tcaggtgtgg gataacacta gtgagcatgt ggtttcgcc	300
ggaggcaccc agctgaccgt cctaggc	327

20 <210> 4

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Péptido sintético

ES 2 894 398 T3

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Cadena ligera del clon XPA.42.068

5           <220>  
              <221> MISC\_FEATURE  
              <222> (26)..(31)  
              <223> L-CDR1

10          <220>  
              <221> MISC\_FEATURE  
              <222> (49)..(51)  
              <223> L-CDR2

15          <220>  
              <221> MISC\_FEATURE  
              <222> (88)..(97)  
              <223> L-CDR3

20          <400> 4

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

          Lys Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Arg Lys Ser Val  
          20                 25                         30

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

          Tyr Asp Arg Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
          50                 55                         60

          Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly  
          65                 70                         75                         80

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

          Val Val Phe Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly  
          100                 105

25          <210> 5  
              <211> 363  
              <212> ADN  
              <213> Secuencia Artificial

30          <220>  
              <223> Nucleótido sintético

          <220>  
          <221> misc\_feature  
          <223> Cadena pesada del clon XPA.42.089

<400> 5

	caggtgcagc tggcacatgc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggta agcaaactac	180
	gcacagaagt tccaggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggggacta	300
	tgggaggttc gggcccttcc gtccgtctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	360
	<b>tca</b>	363
	<210> 6	
5	<211> 121	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Péptido sintético	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> Cadena pesada del clon XPA.42.089	
15	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (26)..(33)	
	<223> H-CDR1	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (51)..(58)	
	<223> H-CDR2	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (97)..(110)	
	<223> H-CDR3	
30	<400> 6	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
	1 5 10 15	

## ES 2 894 398 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala 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 Arg Gly Leu Trp Glu Val Arg Ala Leu Pro Ser Val Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 7

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Nucleótido sintético

10 <220>

<221> misc\_feature

<223> Cadena ligera del clon XPA.42.089

15 <400> 7

tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg tccgtggccc cgggacagac ggccagaatt	60
acctgtgggg caaatgacat tggaagtaaa agtgtccact ggtaccagca gaaggcaggc	120
caggccccctg tactggtcgt ctctgaagat atcatccggc cctcagggat ccctgagcga	180
atctctggct ccaaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actattactg tcaagtttgg gataggata gtgatcaata tgtctttgga	300
actgggacca aggtcaccgt ccttaggc	327

<210> 8

<211> 109

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Cadena ligera del clon XPA.42.089

ES 2 894 398 T3

5           <220>  
          <221> MISC\_FEATURE  
          <222> (26)..(31)  
          <223> L-CDR1

10          <220>  
          <221> MISC\_FEATURE  
          <222> (49)..(51)  
          <223> L-CDR2

15          <220>  
          <221> MISC\_FEATURE  
          <222> (88)..(97)  
          <223> L-CDR3

<400> 8

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

      Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Ala Asn Asp Ile Gly Ser Lys Ser Val  
      20                  25                  30

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

      Glu Asp Ile Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser  
      50                  55                  60

      Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
      65                  70                  75                  80

      Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Asp Ser Asp Gln  
      85                  90                  95

      Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
      100                 105

20          <210> 9  
          <211> 366  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial

25          <220>  
          <223> Nucleótido sintético

30          <220>  
          <221> misc\_feature  
          <223> Cadena pesada del clon XPA.42.681

<400> 9

# ES 2 894 398 T3

	cagggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg atcaacccta acactggtgg cacaactat	180
	gcacagaagt ttcaggcag ggtcaccatg accaggaca cgtccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtt attactgtgc gagatcattc	300
	ctgtggctgg ttccctctga tgctttgat atctggggcc aaggacaat ggtcaccgtc	360
	tcttca	366
	<210> 10	
5	<211> 122	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Péptido sintético	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> Cadena pesada del clon XPA.42.681	
15	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (26)..(33)	
	<223> H-CDR1	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (51)..(58)	
	<223> H-CDR2	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (97)..(111)	
	<223> H-CDR3	
30	<400> 10	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
	1 5 10 15	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr	
	20 25 30	
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
	50 55 60	

ES 2 894 398 T3

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 11

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Nucleótido sintético

<220>

<221> misc\_feature

<223> Cadena ligera del clon XPA.42.681

15 <400> 11

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc cagggaaagac ggccaggatt	60
acctgtgggg gaaacaacat tggattttaga agtgtgcact ggtaccaaca gaagtcaggc	120
caggccccctg tcctggtcat ctatttgat cgcgccccggc cctcagggat ccctgagcga	180
ttctctgcct ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaggagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtgaca gtgatgatct agtcttcggc	300
ggaggcaccc agctgaccgt cctaggt	327

<210> 12

20 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Péptido sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Cadena ligera del clon XPA.42.681

30 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(31)

<223> L-CDR1

35 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (49)..(51)

<223> L-CDR2

40 <220>

<221> MISC\_FEATURE

ES 2 894 398 T3

<222> (88)..(98)  
<223> L-CDR3

<400> 12

5

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Phe Arg Ser Val  
20 25 30

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

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

Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp  
85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 13

<211> 8

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Clon XPA.42.068 - H-CDR1

20

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
1 5

<210> 14

<211> 8

25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Clon XPA.42.068 - H-CDR2

35

<400> 14

	Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr
	1                               5
	<210> 15
5	<211> 15
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
10	<223> Péptido sintético
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<223> Clon XPA.42.068 - H-CDR3
15	<400> 15
	Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile
	1                               5                           10                           15
	<210> 16
20	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
25	<223> Péptido sintético
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
30	<223> Clon XPA.42.068 - L-CDR1
	<400> 16
	Asn Ile Gly Arg Lys Ser
	1                               5
35	<210> 17
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
40	<220>
	<223> Péptido sintético
	<220>
45	<221> MISC_FEATURE
	<223> Clon XPA.42.068 - L-CDR2
	<400> 17
	Tyr Asp Arg
	1
50	<210> 18
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
55	<220>
	<223> Péptido sintético
	<220>
60	<221> MISC_FEATURE
	<223> Clon XPA.42.068 - L-CDR3

<400> 18

Gln	Val	Trp	Asp	Asn	Thr	Ser	Glu	His	Val
1					5				

10

5 <210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Clon XPA.42.089 - H-CDR1

<400> 19

Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala
1					5		

20 <210> 20  
<211> 8  
<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Clon XPA.42.089 - H-CDR2

<400> 20

Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala
1					5		

35 <210> 21  
<211> 14  
40 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Clon XPA.42.089 - H-CDR3

50 <400> 21

Ala	Arg	Gly	Leu	Trp	Glu	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr
1					5							10	

55 <210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

60 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<223> Clon XPA.42.089 - L-CDR1

5                   <400> 22

	Asp	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser
1					5	

10                  <210> 23  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15                  <220>  
<223> Péptido sintético

	Glu	Asp	Ile
1			

20                  <400> 23

25                  <210> 24  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30                  <220>  
<223> Péptido sintético

35                  <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Clon XPA.42.089 - L-CDR3

	Gln	Val	Trp	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Tyr
1					5				10	

40                  <210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45                  <220>  
<223> Péptido sintético

50                  <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Clon XPA.42-681 - H-CDR1

55                  <400> 25

	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr
1					5			

60                  <210> 26  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

60                  <220>

5                   <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Clon XPA.42-681 - H-CDR2  
 10                  <400> 26  
 Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr  
 1                    5  
 15                  <210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20                  <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Clon XPA.42-681 - H-CDR3  
 <400> 27  
 25                  Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile  
 1                    5                   10                   15  
 30                  <210> 28  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 35                  <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Clon XPA.42-681 - L-CDR1  
 <400> 28  
 40                  Asn Ile Gly Phe Arg Ser  
 1                    5  
 45                  <210> 29  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 50                  <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Clon XPA.42-681 - L-CDR2  
 55                  <400> 29  
 Phe Asp Arg  
 1  
 60                  <210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 894 398 T3

<220>  
<223> Péptido sintético

5       <220>  
          <221> MISC\_FEATURE  
          <223> Clon XPA.42-681 - L-CDR3

10      <400> 30

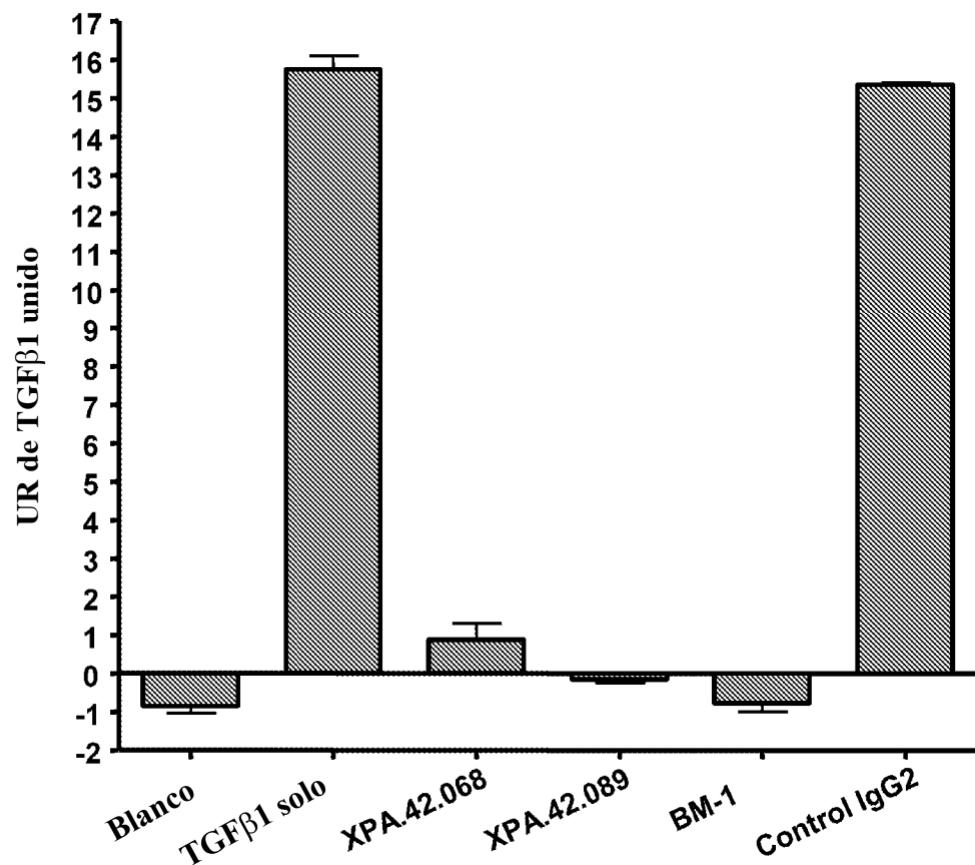
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Leu	Val
1					5					10

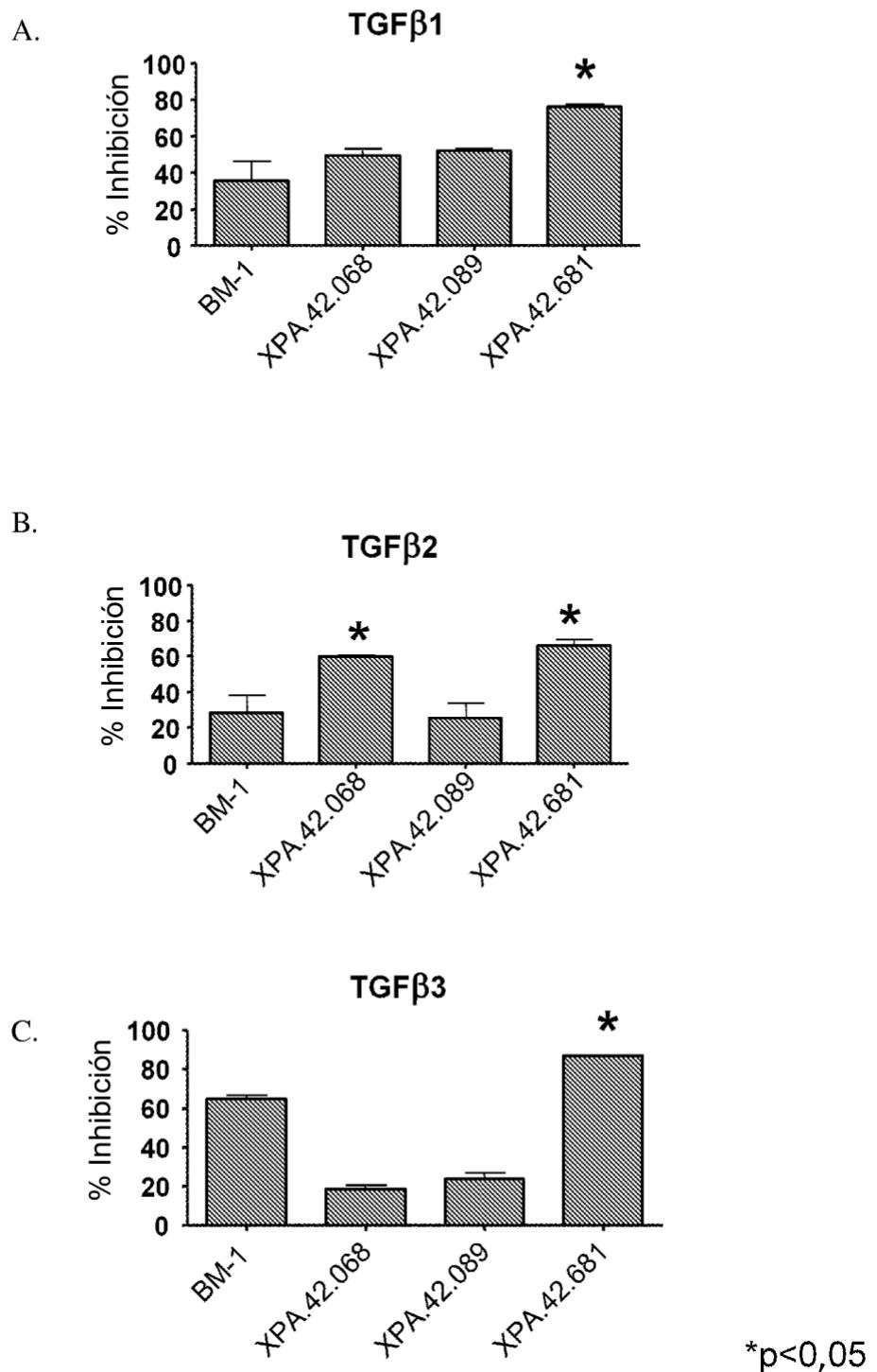
## REIVINDICACIONES

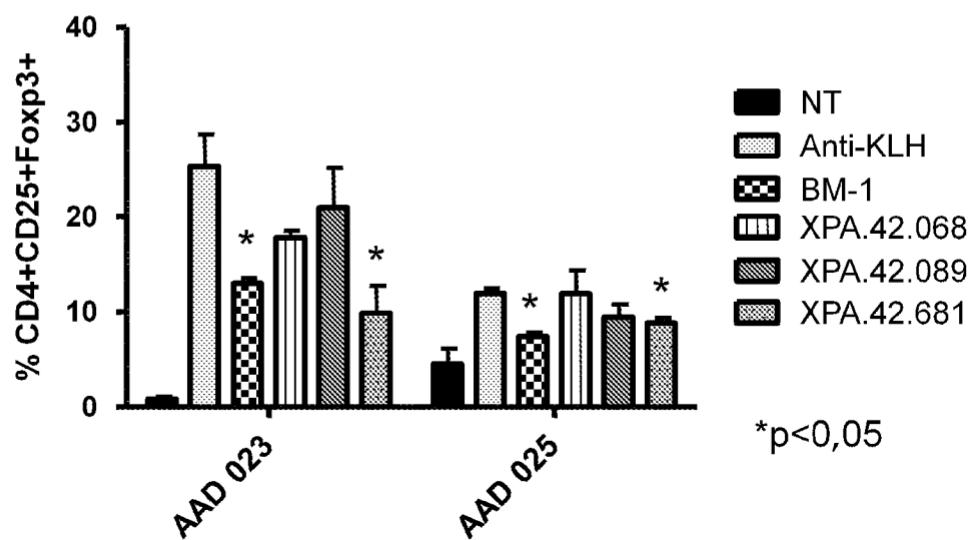
1. Un anticuerpo que se une al factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ )1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 que comprende:
  - 5 (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 19;
  - (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 20; y
  - (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada que se muestra en el SEQ ID NO: 21;
  - (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 22;
  - (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 23; y
  - 10 (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera que se muestra en el SEQ ID NO: 24; en donde el anticuerpo se une a TGF $\beta$ 1 y a TGF $\beta$ 2 con mayor afinidad que a TGF $\beta$ 3 y se une a TGF $\beta$ 1 y a TGF $\beta$ 2 con una Kd de afinidad de  $10^{-9}$  M o menor como se midió mediante resonancia de plasmón superficial o ensayo de exclusión cinética.
- 15 2. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una región constante de cadena pesada, en donde la región constante de cadena pesada es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, modificadas o sin modificar, un fragmento de las mismas o una combinación de las mismas.
- 20 3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se han sustituido uno o más aminoácidos marco de la cadena ligera con el o los correspondientes aminoácidos de otra secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano.
- 25 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 6 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 8.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una región constante de la cadena ligera humana unida a dicha región variable de la cadena ligera.
- 30 6. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo neutraliza la actividad de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 en mayor medida que TGF $\beta$ 3.
- 35 7. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo, en donde la misma molécula de ácido nucleico codifica la cadena pesada y la cadena ligera; o moléculas de ácido nucleico aislado que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo, en donde diferentes moléculas de ácido nucleico codifican la cadena pesada y la cadena ligera; en donde el anticuerpo es de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 8. Un vector de expresión o vectores de expresión que comprenden la molécula de ácido nucleico o las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera están, cada una de ellas, unidas operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 45 9. Una célula hospedadora que comprende el vector o los vectores de la reivindicación 8 o una molécula de ácido nucleico o moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 7.
- 50 10. La célula hospedadora de la reivindicación 9, que comprende una molécula de ácido nucleico o las moléculas de ácido nucleico que codifican una región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera, en donde los ácidos nucleicos de la cadena pesada y la cadena ligera se expresan mediante diferentes ácidos nucleicos o en el mismo ácido nucleico.
- 55 11. Un método para usar la célula hospedadora de las reivindicaciones 9 o 10 para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula hospedadora de las reivindicaciones 9 o 10 en condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo.
- 60 12. Una composición farmacéutica estéril que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12, para usar en un método para tratar el cáncer o la fibrosis, comprendiendo el método la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la composición farmacéutica.
- 65 14. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12, para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita.

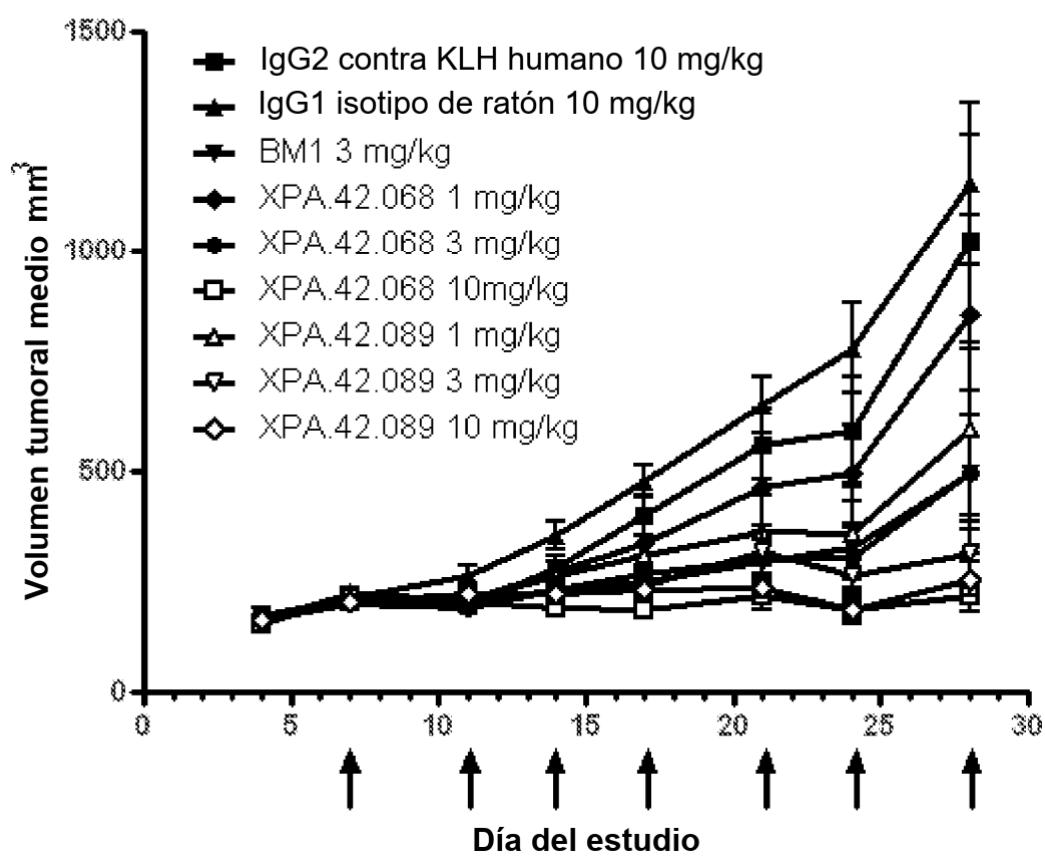
15. El anticuerpo o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o la composición aumentan el número de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un tumor y/o mejoran la actividad citolítica de los linfocitos NK.
- 5 16. El anticuerpo o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o la composición disminuyen el número de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhiben la función de los linfocitos T reguladores.
- 10 17. El anticuerpo o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o la composición aumentan el número de linfocitos T citotóxicos (CTL) en un tumor y/o potencian la función de los CTL.
- 15 18. El anticuerpo o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo reduce el número de células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) en un tumor y/o inhibe la función de las MDSC.
19. El anticuerpo o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo reduce el número de células dendríticas (DC) en un tumor y/o inhibe la función tolerogénica de las células dendríticas.
- 20 20. El anticuerpo o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma y melanoma.
- 25 21. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12, para usar en un método de tratamiento de la fibrosis en un sujeto que lo necesite.

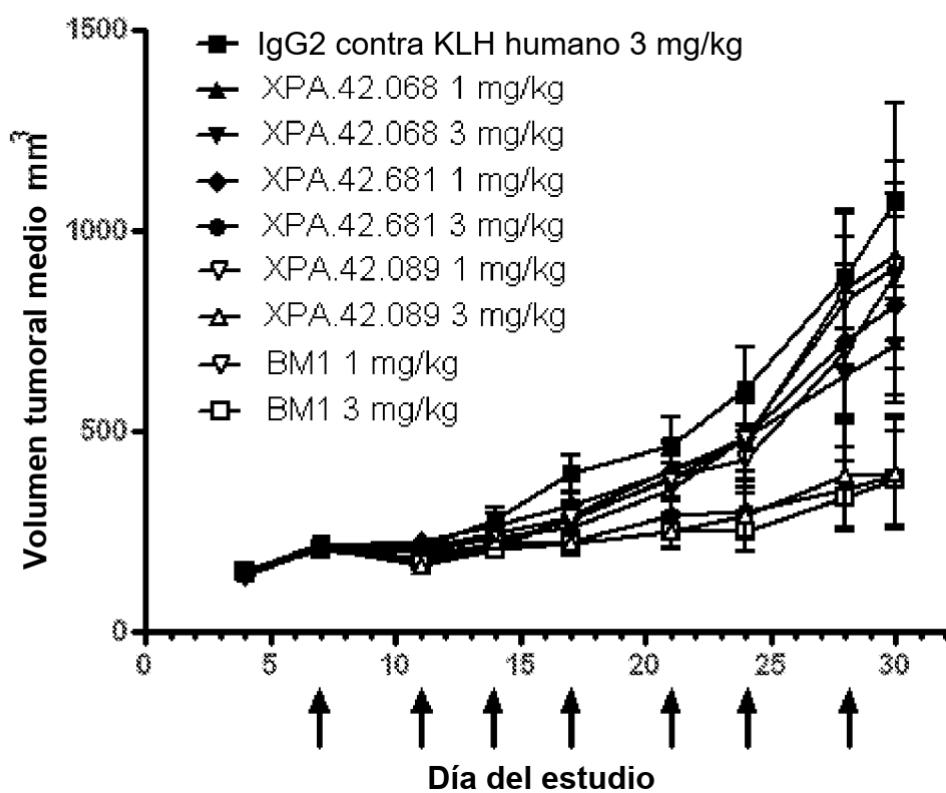
**Figura 1**

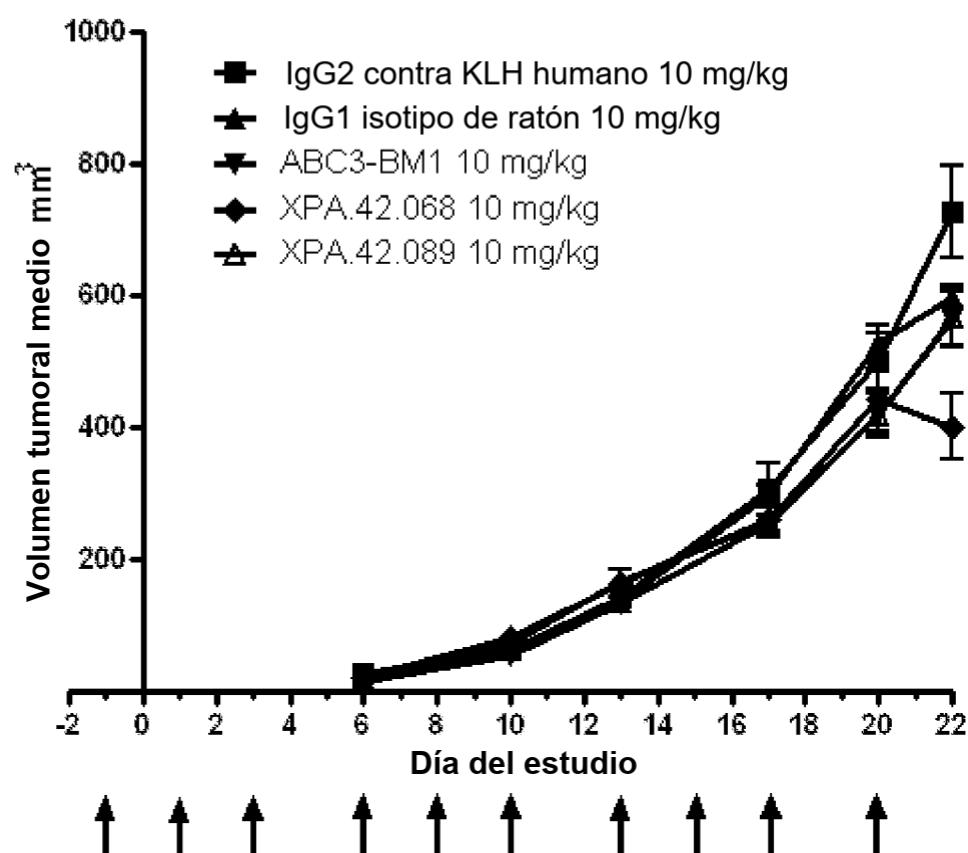


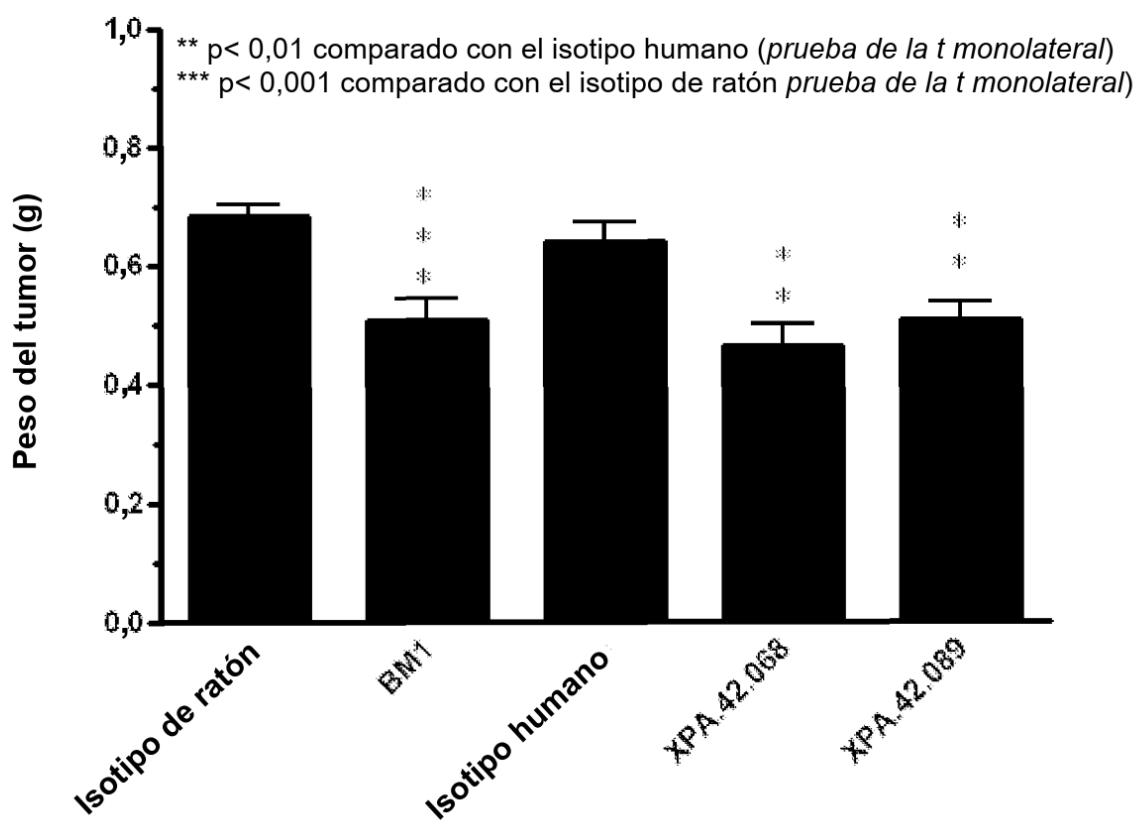
**Figura 2**

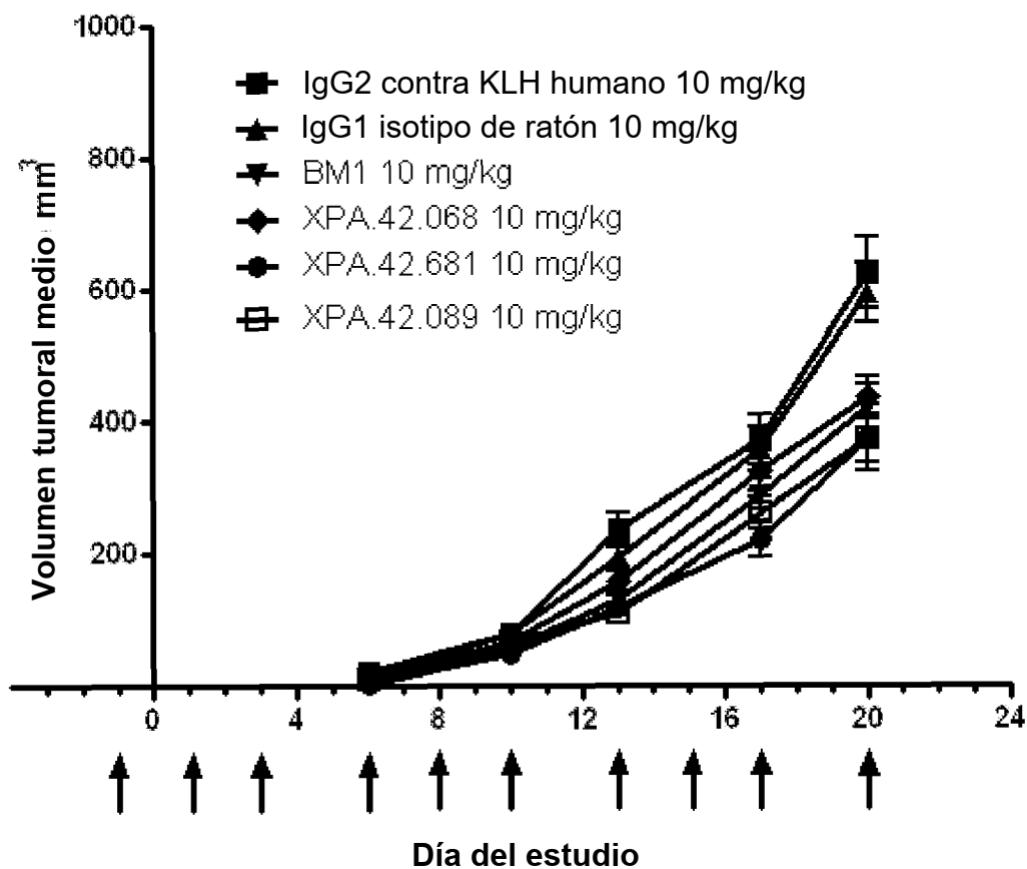
**Figura 3**

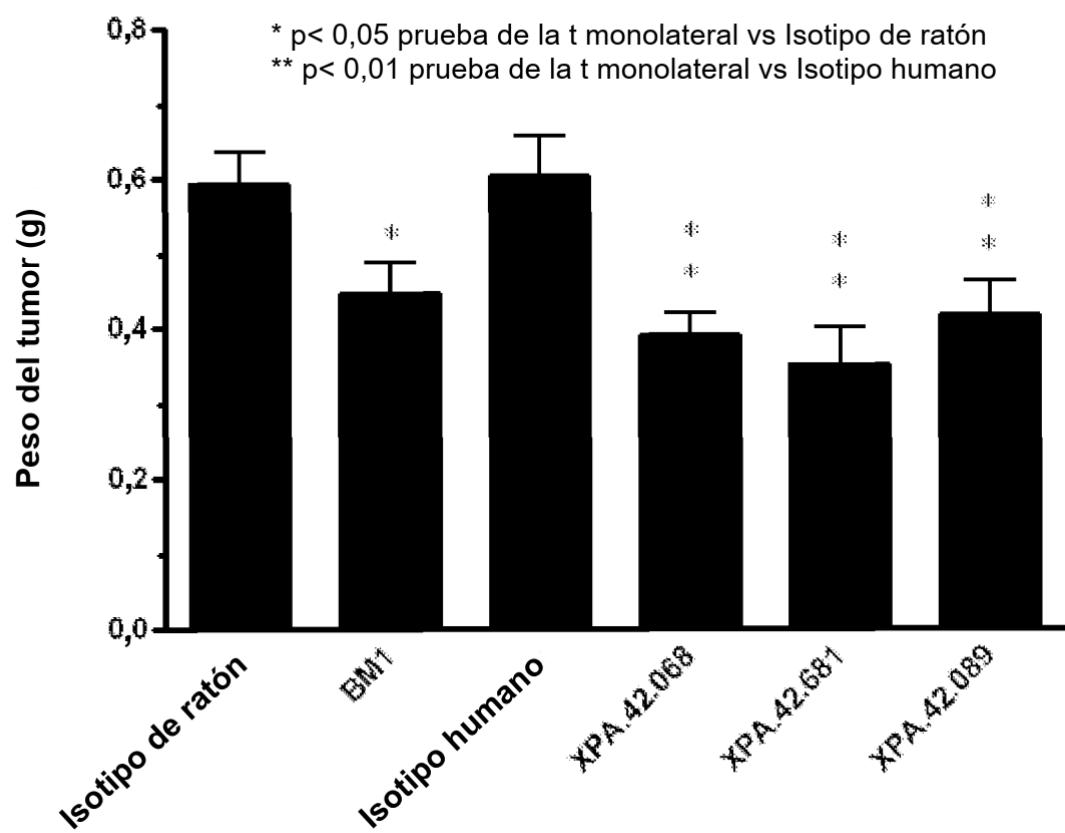
**Figura 4**

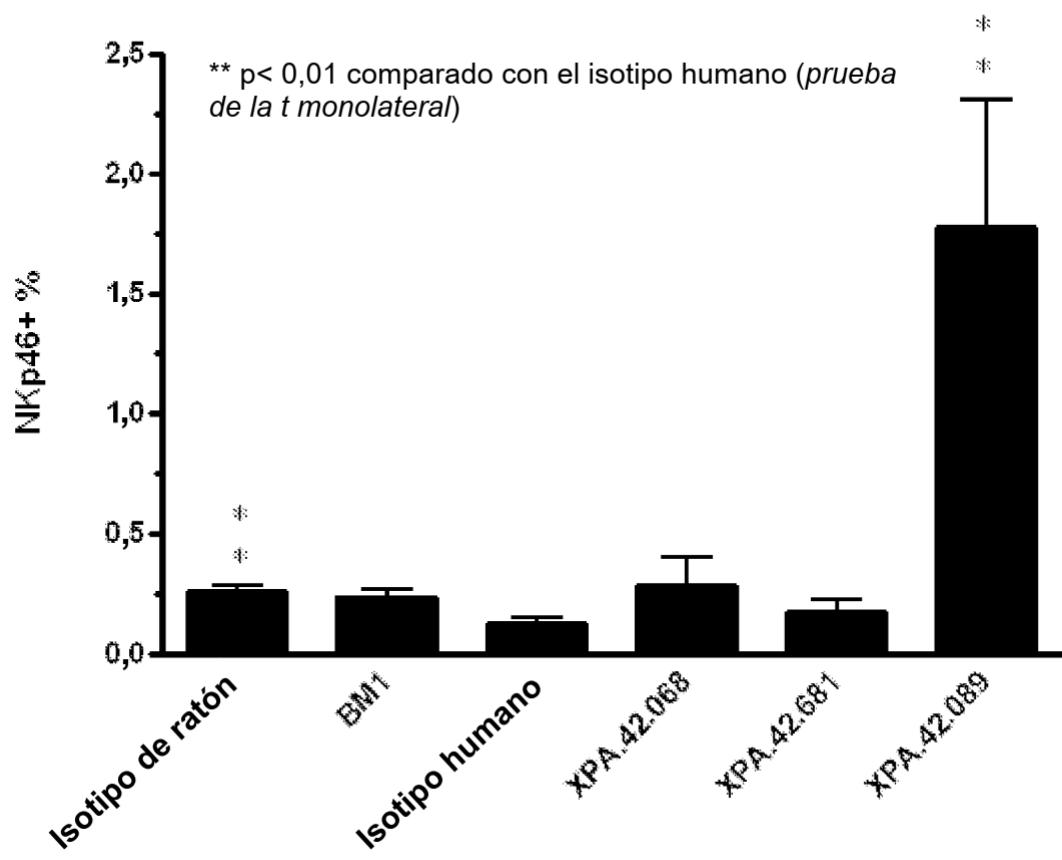
**Figura 5**

**Figura 6**

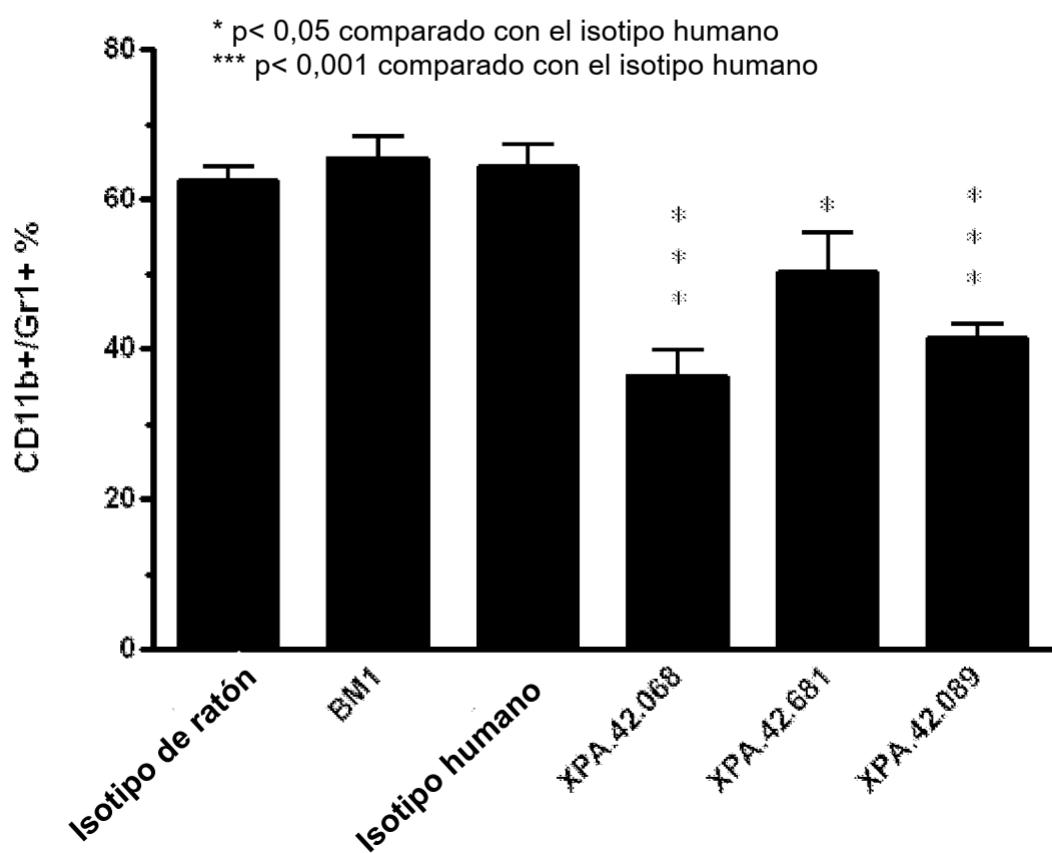
**Figura 7**

**Figura 8**

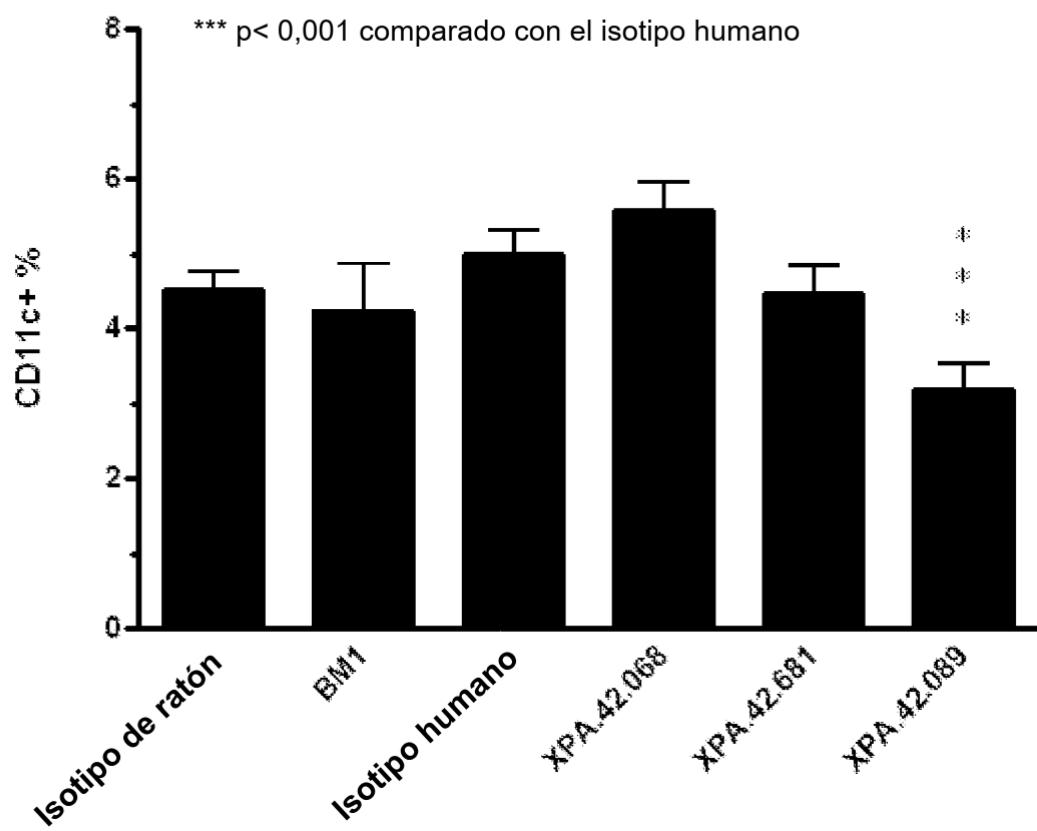
**Figura 9**

**Figura 10**

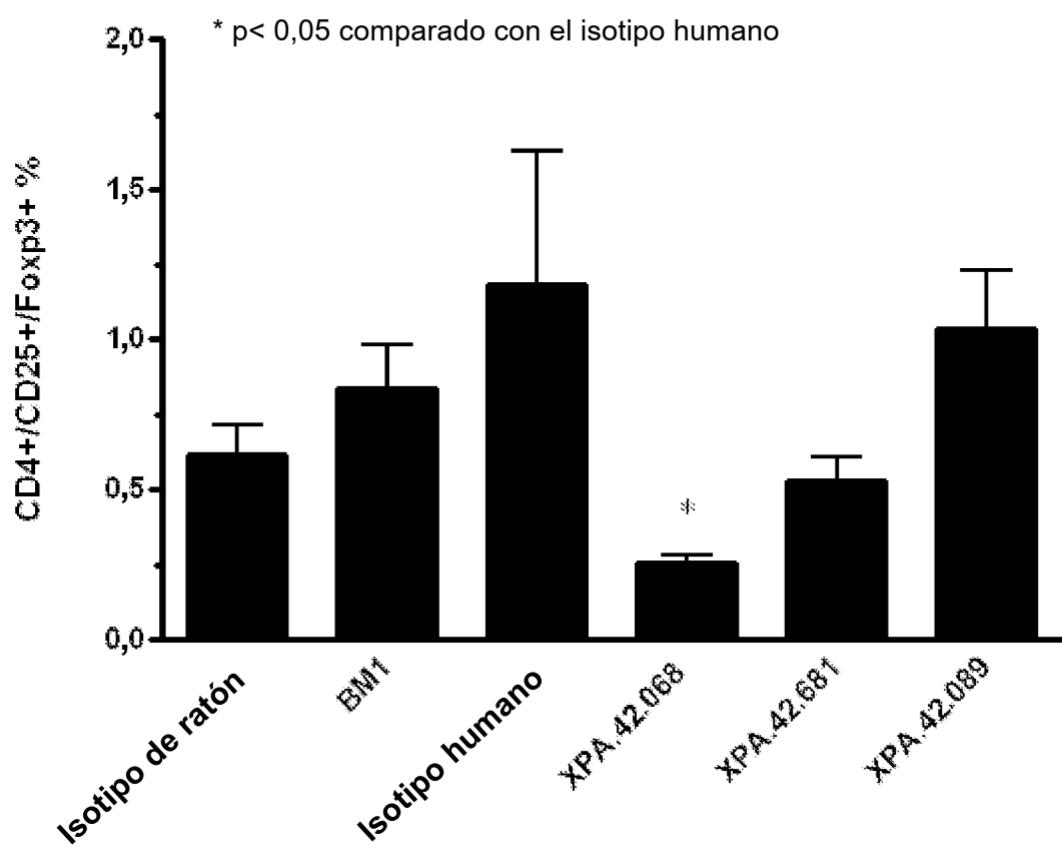
**Figura 11**



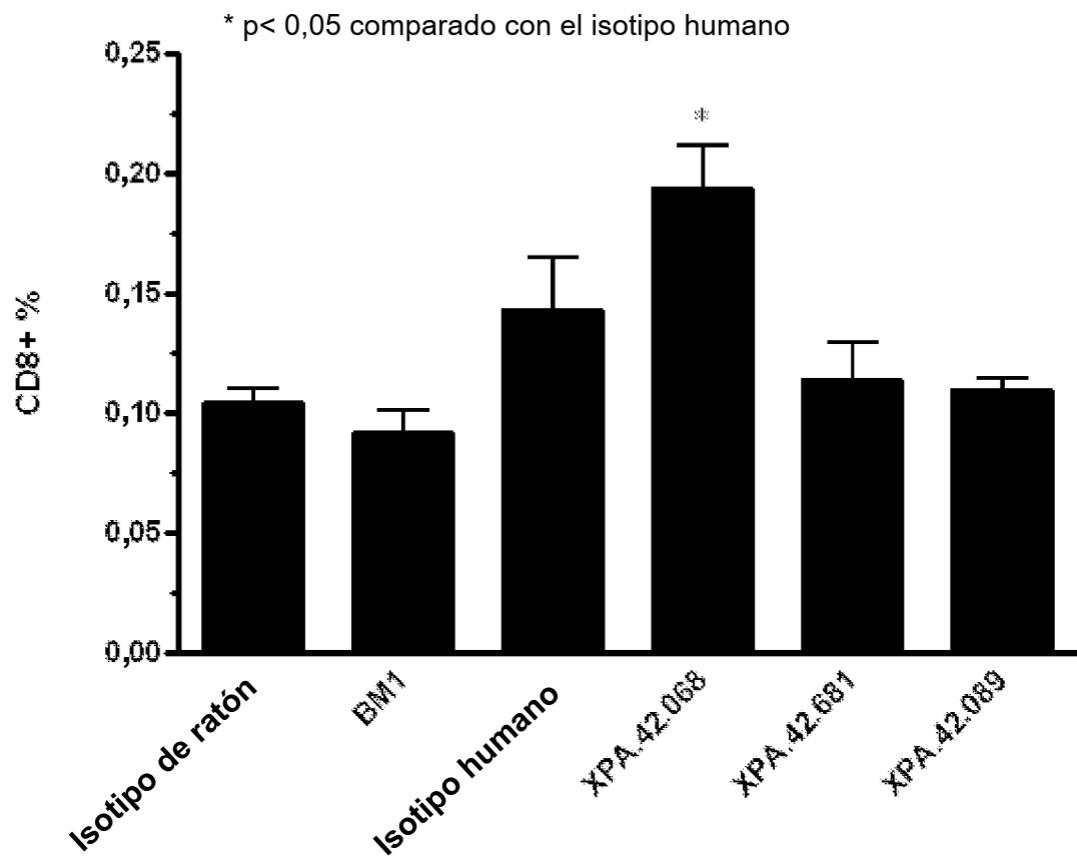
**Figura 12**

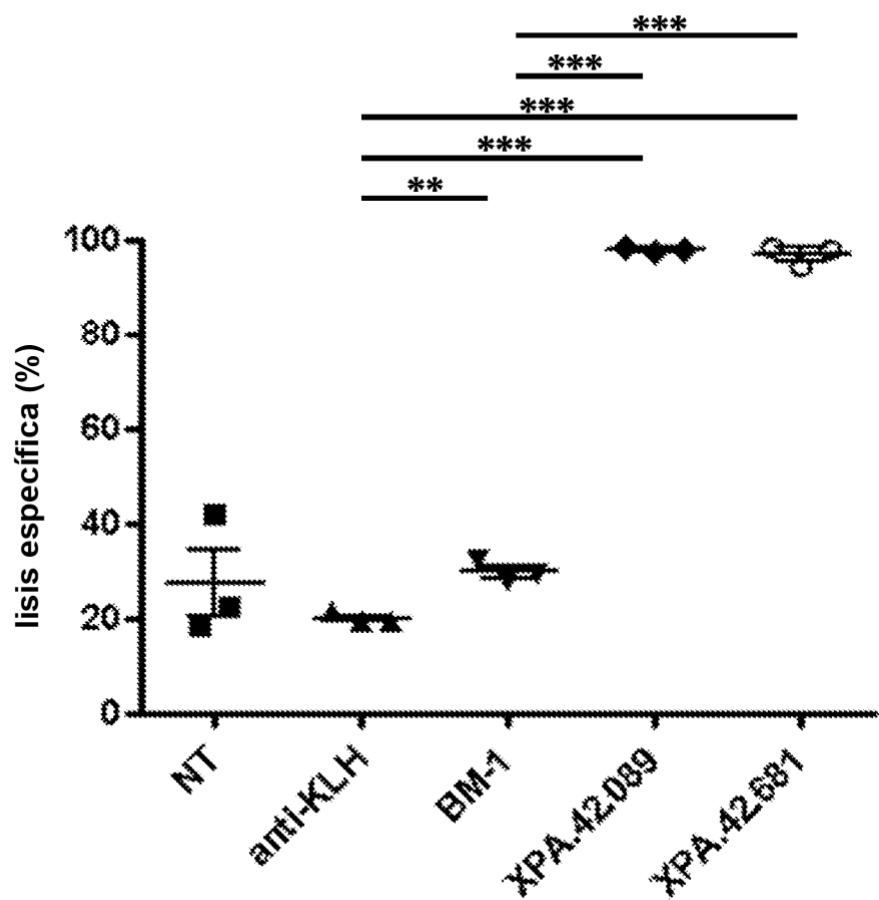


**Figura 13**

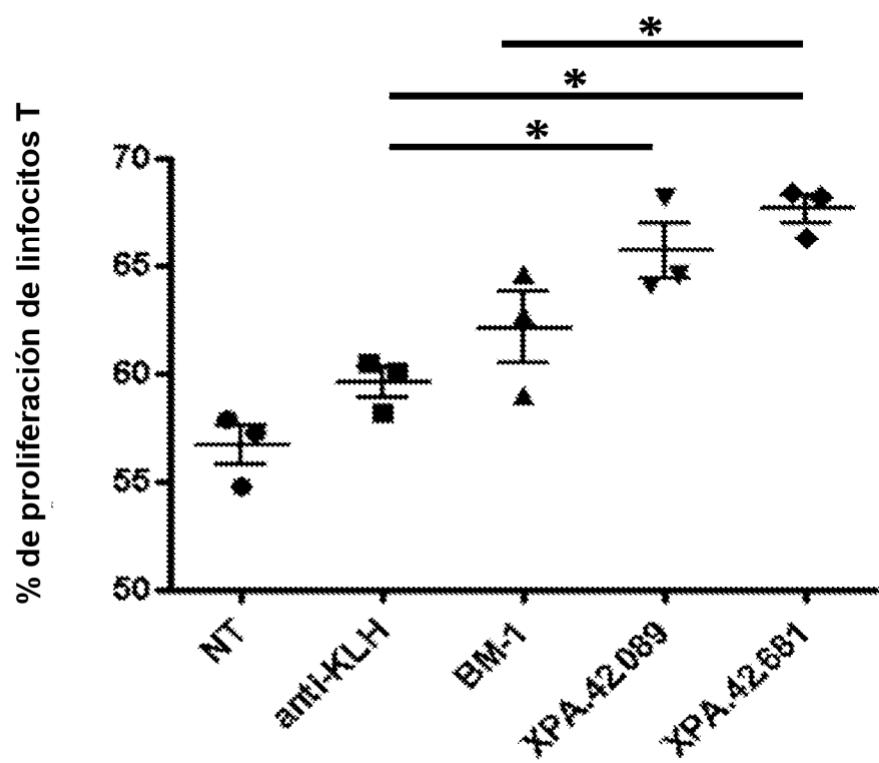


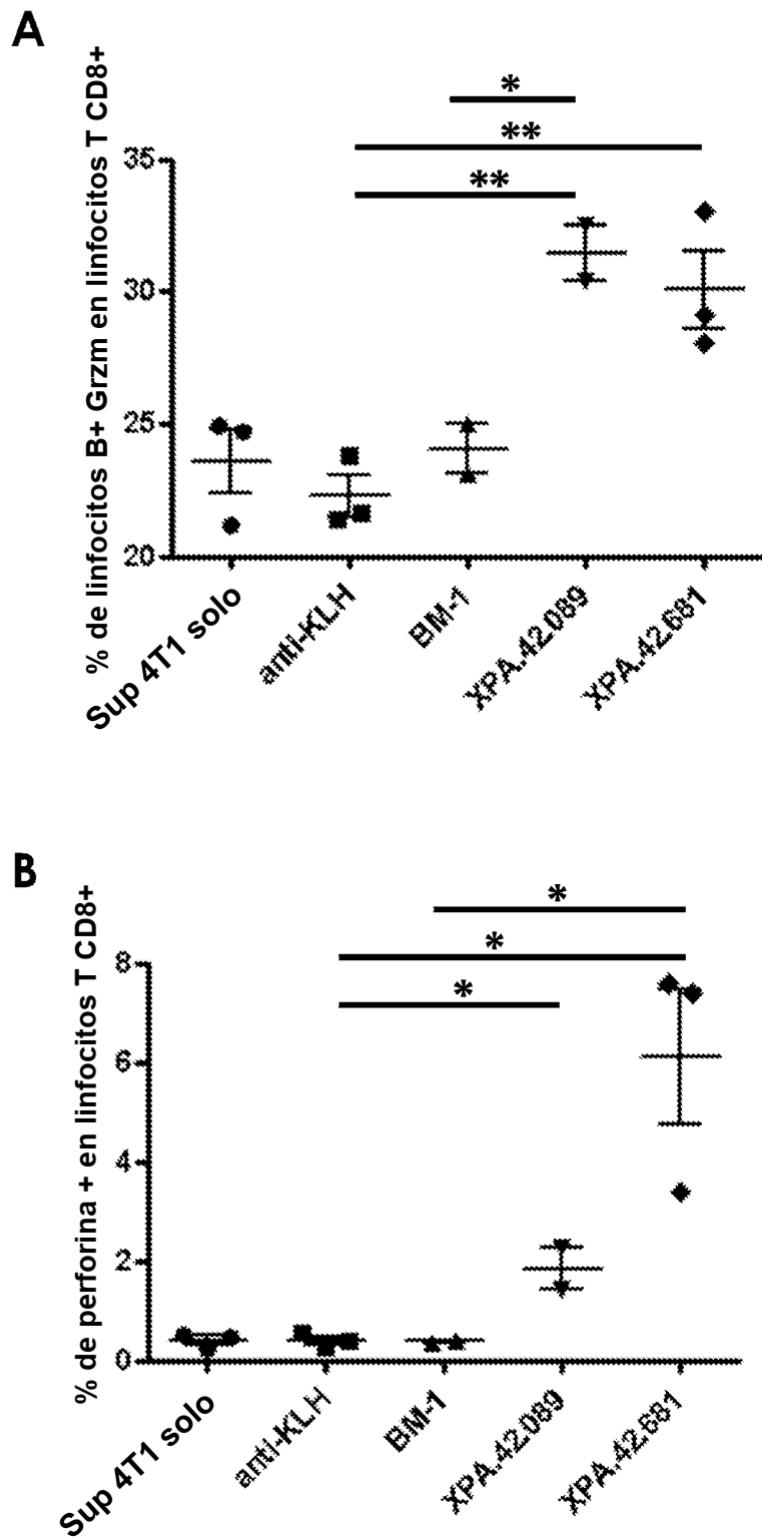
**Figura 14**

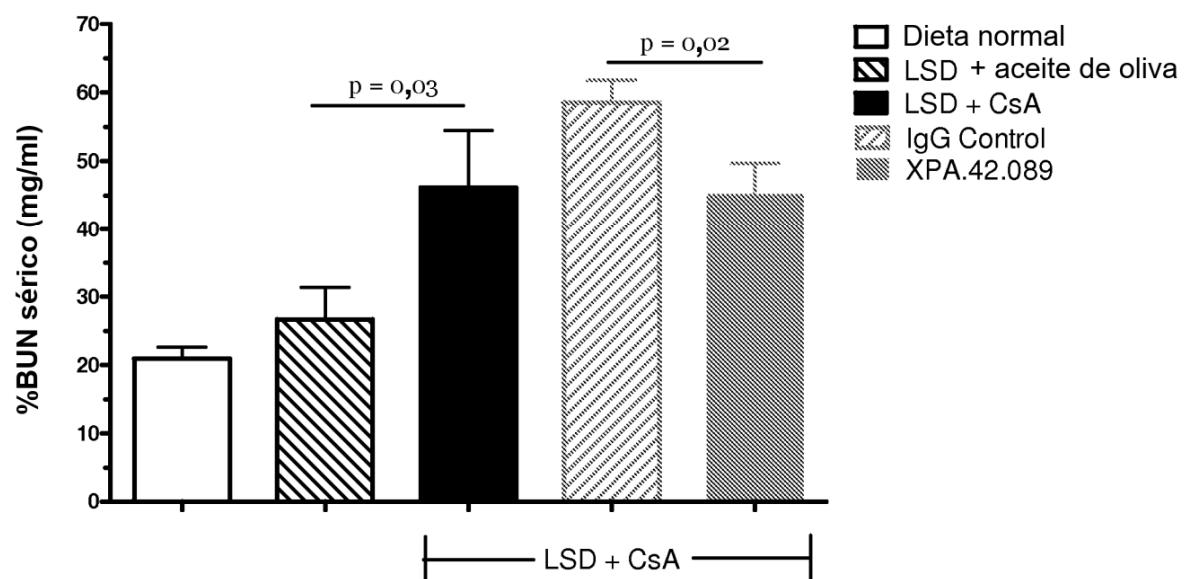


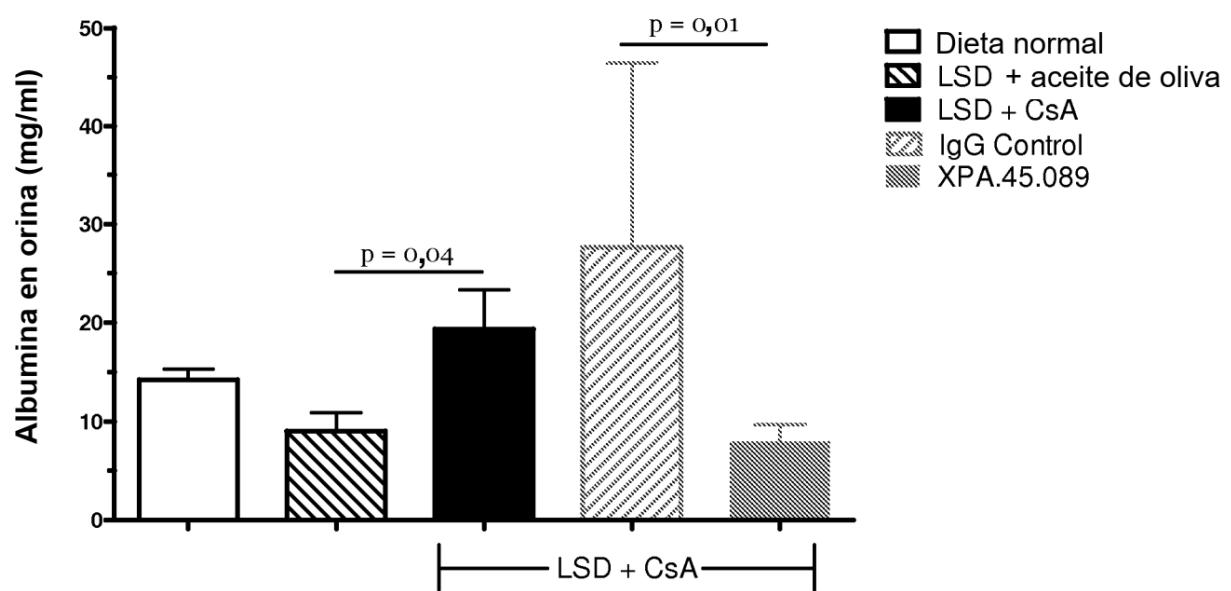
**Figura 15**

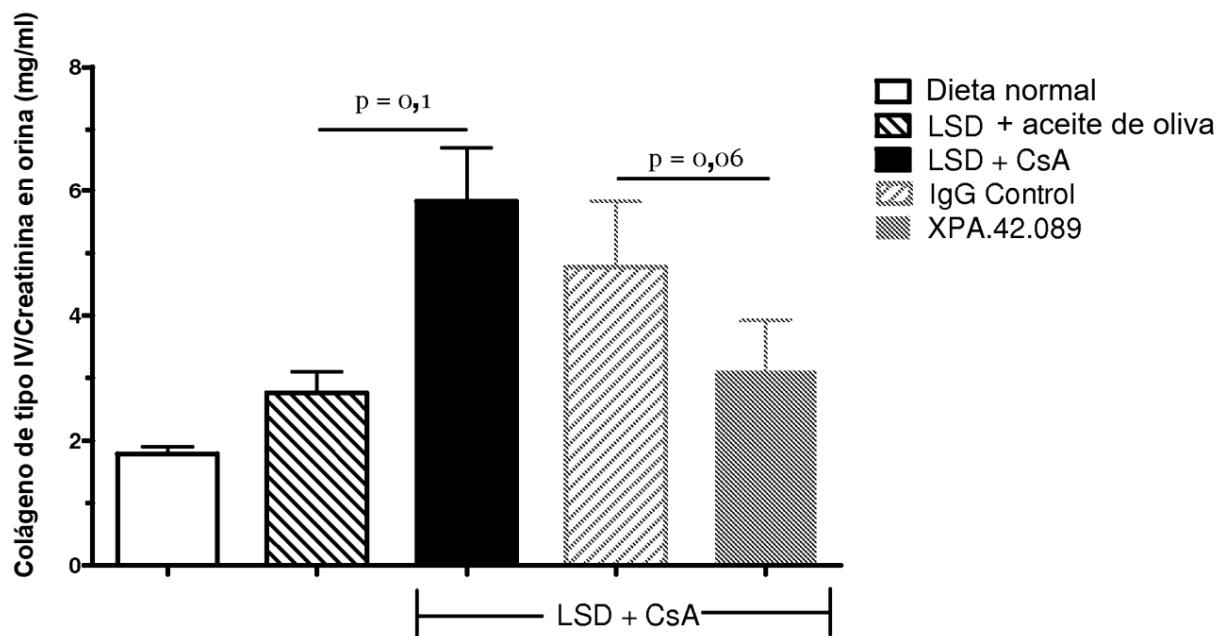
**Figura 16**

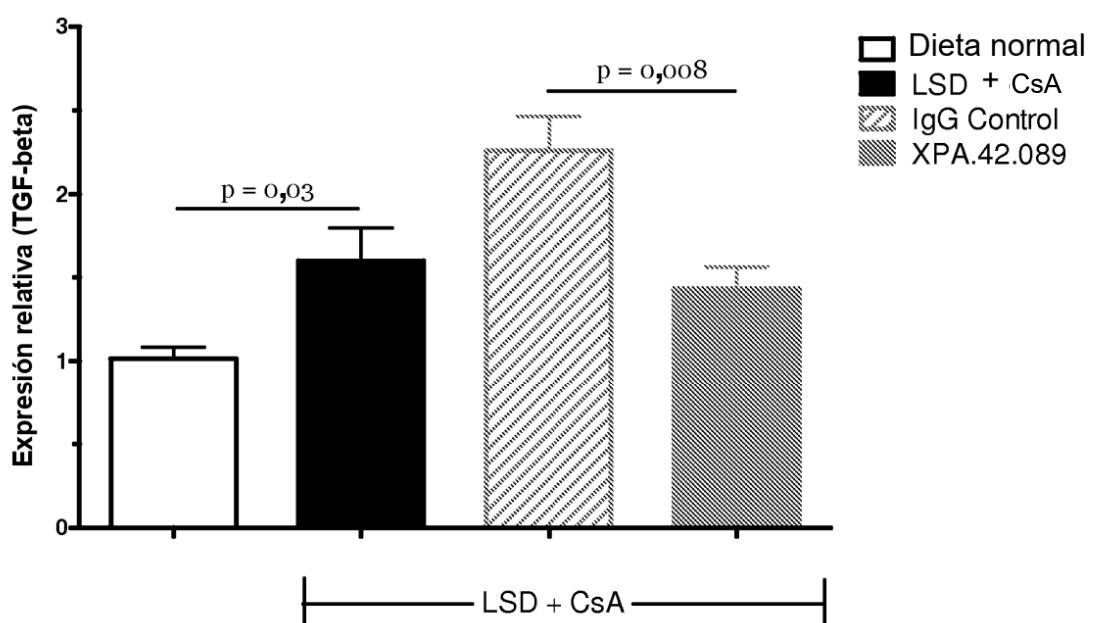
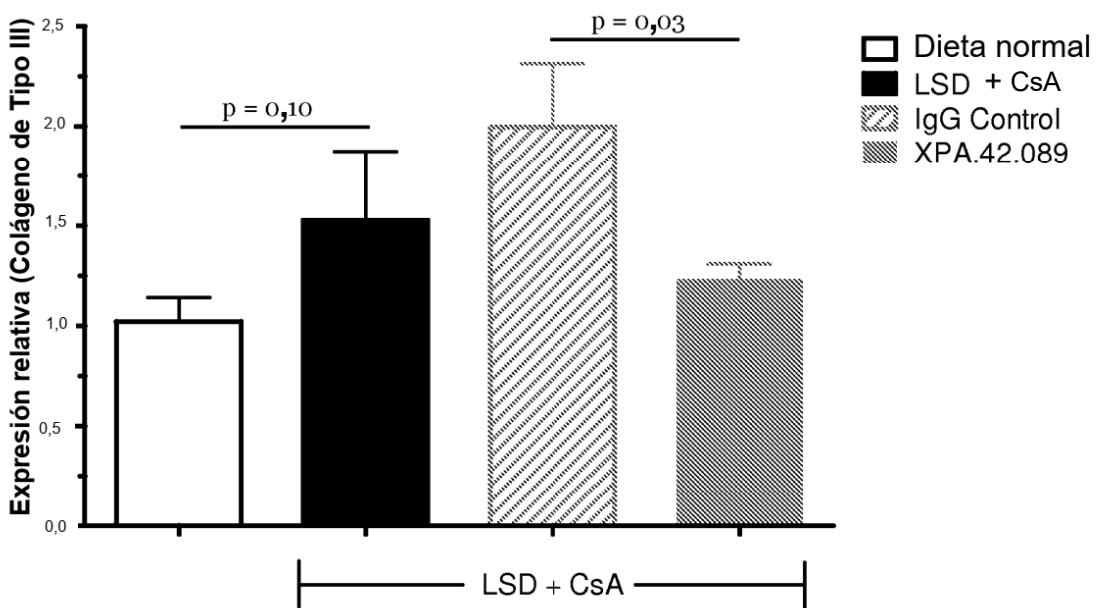


**Figura 17**

**Figura 18**

**Figura 19**

**Figura 20**

**Figura 21****A****B****Figura 22**

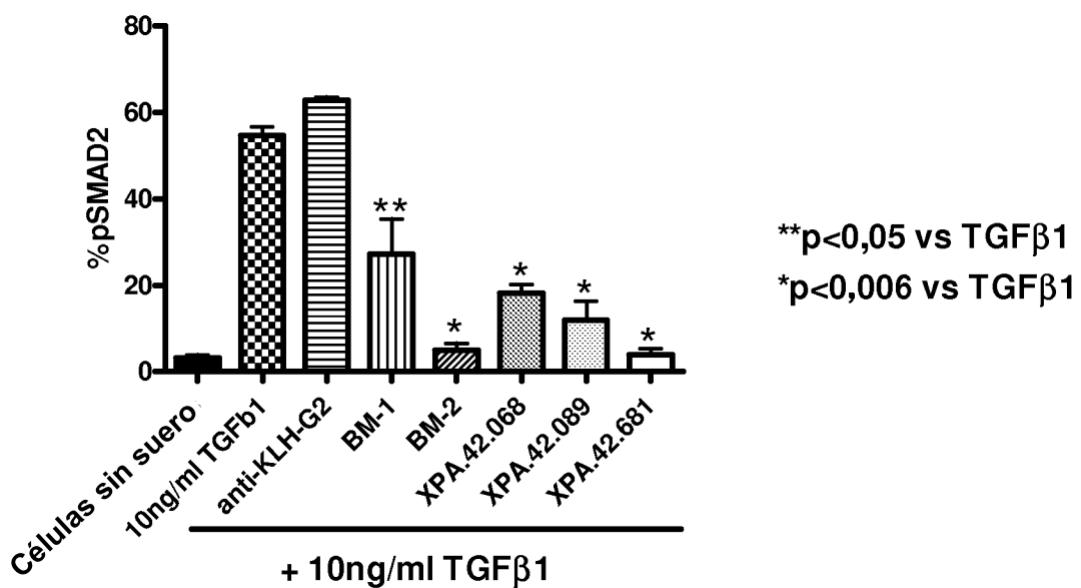


Tabla 1

SEQ ID NO	Clon	Secuencia
1	Secuencia de ADN de la cadena pesada de XPA.42.068	caggttcaagg tggtcagtc tggttcagg tccttgcagg cttctggata cacccttccac ggctactata tgcaactggg gtcacttgat atcaacccta acactggat gatggatgg accggccatcg accaggacat cttccatcg cttccatcg atctgtgc acggccgtt attactgtgc gagatcattc ctgtggctgg ttcccctctg tgcttttgtat atctggggcc aaggacaat ggtcacccgtc tctttca
2	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de XPA.42.068	QYQLVQSGAE VKKPGASVKV SKASGYFTT GYTMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNNTGGTNY 60 AQRFQGRVTM TRDTISSTAY MELSLRSDD TAVYY <b>CARSF</b> <b>IWLVPSDAFD</b> <b>I</b> WGQGTIVTV 120 SS 122
3	Secuencia de ADN de la cadena ligera de XPA.42.068	tctttctggc tgactcagcc accctcagtq tccgtggccc caggagaa ggccaggatt 60 acctgtgggg ggaataaacat tgacgtaaa agtgtacatt ggtaccagca gaggccaggc tttttctggc ttgtgtccct ctaatgtat agagtcaagac cttcaggat ccctgtggca tttttctggc ccaactctgg gacacggcc accctgtacca tcaccaggat cgaaggcccc gatggggcc actattttg tcaatgtgg gataaacata gtgaggcatgt ggcttctggc 300 gggggccacc agctgaccgt cttaggc 327
4	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de XPA.42.068	SSELTQPPSV SVAPGEKARI TCGNN <b>NIGRK</b> SYHWYQQRPG QAPVVLYD <b>R</b> VPRSGIPER 60 ESGNSGNITA TLITIRVEAG DEADYFC <b>QWV</b> DNTSEH <b>VFG</b> GGTQLTVLG 109
5	Secuencia de ADN de la cadena pesada de XPA.42.089	cagggtcagg tggtcagtc tggttcagg tccttgcagg cacccttccgc agctatgcg tcacgtggg 60 cttctggagg ggcttggatgq gatggggggg atcatcccta tctttgttac agcaaaactac gtcacggat accgcggacg aatccacgat aatccacgat acggccgtgt attactgtgc gaggggacta caccgtctcc tggggggccatc tgccgtctac tggggccagg gaaccctgtt 360 tca 363
6	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de XPA.42.089	QYQLVQSGAE VKKPGSSVKV SKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGG <b>LIPIFGTANY</b> 60 AQRFQGRVTI TADESTSTAY MELSLRSDD TAVYY <b>CARGL</b> <b>WEVRALPSVY</b> WGQGTIVTV 120 S 121
7	Secuencia de ADN de la cadena ligera de XPA.42.089	tccctatgagg tgacacagcc accctcagtq tccgtggccc cggacacac ggccaggat 60 accctgtgggg caaatgacat tgqaagtaaa agtgtccact ggtaccagca gaaggccaggc caqgccccctg tacttgtcg atcttgtcg atcatccggc cttcaggat ccctgtggca 180 atcttgtcg ccaactctgg gacacggcc accctgtacca tcacggat cgaaggcccc 240 gatggggcc actatactg tcaatgtgg gataggata gtgtatcaata tgcttttggg 300 actggggacca aggtcacctg cttaggc 327
8	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de XPA.42.089	SYELTQPPSV SVAPGQTARI TCGAND <b>IGSK</b> SYHWYQQRPG QAPVLVVS <b>D</b> <b>I</b> IRPSGIPER 60 IGSNSGNITA TLITIRVEAG DEADYFC <b>QWV</b> DRDS <b>DQYV</b> TGTKVTVL 109

Tabla 1

9	Secuencia de ADN de la cadena pesada de XPA.42.681	caggttcagc tggtcagtc tgggtcaggat cacccttacc ggctactata tgcactgggt ggcacaggcc tccttgcaagg ctctctggata caccatata atcaaaacctta acactgggtg cacaactat gcacagaatgtt ttcaggggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcg cacagctac atggagtcga gcaggctgag atctgacgc acggcgcgtt attactgtgc gagataattc ctgtggctgg ttcccctctga tgcttttgtat atctggggcc aaggacaaat ggtcacccgc tcttca	60 120 180 240 300 360 366
10	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de XPA.42.681	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS <u>GYTFT</u> GYMMHWVRQA PGQGLEWMGW <b>INPNTGFTNY</b> SS AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRLRSDD TAVYYC <u>ARSF</u> <b>IWLVP SDAFD</b> <b>IWGQGMVTV</b>	60 120 122
11	Secuencia de ADN de la cadena ligera de XPA.42.681	tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggcc cagaaagac ggccaggatt acctgtggg gaaacaacat tggatttaga agtgtcact ggtaccaaaca gaagtcaagg caggccccccgt tcctgggtcat ctatttgtat cgcgcggc cctcaggat ccctgagcga ttctctgct ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaaggagggt cgaagcggg 240 gatgaggcgc actattactg tcaggtgtgg gatagtgaca gtatgtatct agtcttcggc 300 ggaggcacc agtgcaccgt octaggt 327	60 120 180 240 300 327
12	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de XPA.42.681	SYVLTIQPPSV SVAPGKTIARI TCGGN <u>NITGFR</u> SVHWWQQKSG QADPVLV <b>YFD</b> RARPSSGIPER FSASNSENTA TLTIIRRVEAG DEADYYC <u>QWV</u> DSDSD <u>DLVFG</u> GGTQLTVIG	60 109
13	XPA.42.068 – H-CDR1	GYTFGTYY	60
14	XPA.42.068 – H-CDR2	INPNTGGT	109
15	XPA.42.068 – H-CDR3	ARSFLWLVP <u>S</u> DAFDI	
16	XPA.42.068 – L-CDR1	NIGRKS	
17	XPA.42.068 – L-CDR2	YDR	
18	XPA.42.068 – L-CDR3	QWWDNTSEHV	
19	XPA.42.089 – H-CDR1	GGTFSYYA	
20	XPA.42.089 – H-CDR2	IIPIFGTA	
21	XPA.42.089 – H-CDR3	ARGLWEVRAL PSVY	
22	XPA.42.089 – L-CDR1	DIGSKS	
23	XPA.42.089 – L-CDR2	EDI	
24	XPA.42.089 – L-CDR3	QWWRDSDQY	
25	XPA.42.681 – H-CDR1	GYTFGTYY	
26	XPA.42.681 – H-CDR2	INPNTGGT	
27	XPA.42.681 – H-CDR3	ARSFLWLVP <u>S</u> DAFDI	
28	XPA.42.681 – L-CDR1	NIGFRS	
29	XPA.42.681 – L-CDR2	FDR	
30	XPA.42.681 – L-CDR3	QWWDSDSDL V	