



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019013986-9 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 3 9 8 6 A 2 *

(22) Data do Depósito: 19/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 03/03/2020

(54) Título: ANTICORPOS DE DIRECIONAMENTO ÓSSEO

(51) Int. Cl.: C07K 16/22; A61P 19/08; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 20/01/2017 US 62/448,763.

(71) Depositante(es): GENZYME CORPORATION.

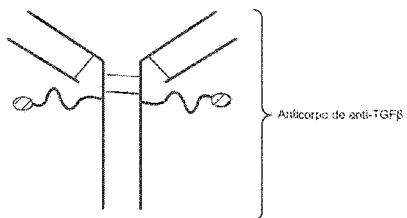
(72) Inventor(es): HUAWEI QIU; SUNGHAE PARK; JAMES STEFANO.

(86) Pedido PCT: PCT US2018014350 de 19/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/136698 de 26/07/2018

(85) Data da Fase Nacional: 05/07/2019

(57) Resumo: São providos anticorpos recombinantes quimicamente conjugados e fragmentos dos mesmos modificados com um ou mais (poli-D) peptídeos de poliaspartato (por exemplo, uma sequência D10) para melhorar a localização dos anticorpos ou fragmentos no osso. Métodos para sua produção e usos desses anticorpos e fragmentos também são revelados.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"ANTICORPOS DE DIRECIONAMENTO ÓSSEO".

Referência Cruzada a Pedido Relacionado

[0001] Este pedido reivindica a prioridade de Pedido Provisório U.S. 62/448.763, depositado em 20 de janeiro de 2017, cuja revelação é incorporada por referência em sua totalidade.

Listagem de Sequências

[0002] O presente pedido contém uma listagem de sequências que foi submetida eletronicamente no formato ASCII e é incorporada por referência em sua totalidade. A dita cópia de ASCII, criada em 11 de janeiro de 2018, é chamada 022548_WO12_SL.txt e tem 75.113 bytes.

Campo da Invenção

[0003] A invenção refere-se a anticorpos modificados com peptídeos de direcionamento ósseo e a métodos de seu uso para o tratamento de degeneração óssea patofisiológica.

Fundamentos da Invenção

[0004] Desenvolvimento e manutenção óssea adequada são fatores importantes para a saúde normal. No ser humano médio, desenvolvimento ósseo ocorre até a idade de cerca de 20 anos de idade, onde densidade óssea é tipicamente no seu máximo. Aqui em seguida, densidade óssea pode diminuir sem dieta e exercício físico adequado. Manutenção óssea normal, no entanto, exige mudança óssea homeostática, onde osso velho é removido e é trocado por osso novo.

[0005] Ainda, há numerosas doenças e condições que podem afetar são numerosas doenças e condições que podem afetar desenvolvimento e manutenção óssea. Por exemplo, desenvolvimento ósseo é afetado em doenças tal como osteogênese imperfeita, onde resistência óssea é comprometida, que leva a crianças com ósseos frágeis

que podem facilmente se quebrar. Além do mais, carência de mudança óssea homeoestática pode ocorrer de outra maneira em indivíduos saudáveis quando eles envelhecem, levando a osteoporose, onde densidade óssea é comprometida durante um tempo, e finalmente a ósseos frágeis e fraturas ósseas.

[0006] Ainda mais, há certas doenças em que a saúde óssea é afetada colateralmente à doença primária e está envolvida em outras sequelas comórbidas, tais como em doença de rim crônica (CKD). CKD é uma doença progressiva em que função de rim declina durante um tempo, frequentemente levando a doenças cardiovasculares ligadas a saúde óssea pobre e taxas de mudanças óssea alteradas. Foi mostrado que tratamento que aperfeiçoa saúde óssea concomitantemente alivia as doenças cardiovasculares associadas. Tais relatórios sugerem que taxas de mudanças óssea normais poderiam seriam ser influentes em, se não causadores de, outras doenças. Portanto, metodologias aperfeiçoadas para a regulação de desenvolvimento e/ou manutenção óssea poderia ter um efeito direto ou indireto generalizado no melhoramento da saúde dos indivíduos que sofrem de numerosas condições e doenças diferentes.

[0007] TGF β é um membro da transformação da superfamília de fator de crescimento beta (TGF β) e é importante na formação óssea durante o desenvolvimento de mamífero (*vide Chen e outros, Int. J. Biol. Sci. 8(2): 272–88 (2012)*). TGF β parece ser igualmente importante para manutenção óssea homeoestática. De modo interessante, TGF β foi mostrado como sendo expresso em níveis mais altos em indivíduos com CKD, sugerindo que é um alvo viável para a intervenção terapêutica. Tratamento sistêmico de um modelo de camundongo *jck* de CKD com anticorpos de anti-TGF β demonstravam uma redução nas altas taxas de mudança óssea (*Liu e outros, J. Osso Miner Res. 29(5): 1141-57 (2014)*). No entanto, este estudo não investigou o grau

ao qual localização dos anticorpos de anti-TGFbeta no osso pode melhorar a eficácia de tratamento. Dados que TGF β está envolvido em uma multidão de processos celulares incluindo resposta de dano de DNA, resposta imune alérgica, e epitelialização da ferida, só para citar alguns, uma abordagem mais direcionada para o controle de atividade de TGF β é desejável minimizar os efeitos colaterais potenciais. Portanto, uma abordagem mais parecida para a regulação da atividade de TGF β é necessária prover tratamentos melhorados para a regulação de desenvolvimento e/ou manutenção óssea.

Sumário da Invenção

[0008] Providos aqui são anticorpos, tais como anticorpos de anti-TGF β , que são eficazmente direcionados para o osso. Em um primeiro aspecto, a presente revelação provê um anticorpo, ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo uma cadeia pesada, uma cadeia leve, e um ou mais peptídeos de (poli-D) de poliaspartato. Em uma concretização particular, o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno compreende uma cadeia pesada, uma cadeia leve, e um ou mais peptídeos de (poli-D) de poliaspartato ligados à cadeia pesada e/ou ao C-terminal da cadeia leve.

[0009] Em uma concretização, o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno do mesmo exibe pelo menos um aumento duas vezes na localização para osso em comparação com um anticorpo com a mesma cadeia pesada e cadeia leve mas carecendo os um ou mais poli-D peptídeos.

[0010] Em uma concretização, os um ou mais poli-D peptídeos estão ligados ao anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno do mesmo por conjugação química. Em uma outra concretização, os um ou mais poli-D peptídeos estão ligados na região principal da cadeia pesada. Em uma outra concretização, os um ou mais poli-D peptídeos estão ligados ao N-terminus ou C-terminal da cadeia leve. Em ainda

uma outra concretização, os um ou mais poli-D peptídeos estão ligados a o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno do mesmo por um ou mais espaçadores/ligantes (por exemplo, espaçadores de polietileno glicol (PEG) e ligantes de peptídeo).

[0011] Em uma concretização, um ou mais poli-D peptídeos são integrais com uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada e/ou um ou mais poli-D peptídeos são integrais com uma sequência de aminoácidos da cadeia leve. Um polipoli-D peptídeo que é "integral" com uma sequência de aminoácidos está incluído na mesma cadeia de polipeptídeo. Por exemplo o poli-D peptídeo integral pode ser traduzido a partir da mesma cadeia de RNA como a sequência de cadeia pesada ou leve, que pode ser codificada de um plasmídeo de DNA recombinante. Em uma concretização, um ou mais poli-D peptídeos são integrais com o N-terminal e/ou um ou mais poli-D peptídeos são integrais com o C-terminal da cadeia pesada. Dois ou mais poli-D peptídeos podem ser ligados em tandem, separados por zero, um ou mais outros resíduos de aminoácidos (isto é, aminoácidos de não aspartato) ou um ligante de peptídeo ao N-terminal ou ao C-terminal da cadeia pesada. Em uma outra concretização, um ou mais poli-D peptídeos são integrais com o N-terminal e/ou um ou mais poli-D peptídeos são integrais com o C-terminal da cadeia leve. Por exemplo, dois ou mais poli-D peptídeos podem ser ligados em tandem sendo separados por zero, um ou mais outros resíduos de aminoácidos (isto é, aminoácidos de não aspartato) ou um ligante de peptídeo ao N-terminal ou ao C-terminal da cadeia leve. Em uma concretização, um polipoli-D peptídeo é integral com o C-terminal da cadeia pesada. Em uma outra concretização, um poli-D peptídeo é integral com o C-terminal da cadeia pesada e um poli-D peptídeo é integral com o N-terminal da cadeia pesada.

[0012] Em uma concretização, a cadeia leve não compreende um poli-D peptídeo. Em uma outra concretização, a cadeia pesada não

compreende um poli-D peptídeo.

[0013] Em uma concretização, os um ou mais poli-D peptídeos cada um independentemente compreendem de 2 - 30 resíduos de ácido aspártico. Por exemplo, um poli-D peptídeo podem incluir 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 7, ou 8, ou 9, ou 10, ou 11, ou 12, ou 13, ou 14, ou 15, ou 16, ou 17, ou 18, ou 19, ou 20, ou 21, ou 22, ou 23, ou 24, ou 25, ou 26, ou 27, ou 28, ou 29, ou 30 resíduos de ácido aspártico. Em uma outra concretização, os um ou mais poli-D peptídeos cada um independentemente compreendem de 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 resíduos de ácido aspártico. Em uma outra concretização, os um ou mais poli-D peptídeos cada um compreendem 10 resíduos de ácido aspártico; tais peptídeos são chamados "D10" (SEQ ID NO: 1) aqui. Em algumas concretizações, o anticorpo ou o fragmento pode incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou mais do que 12 poli-D peptídeos.

[0014] Em uma outra concretização, o anticorpo é qualquer um dos isótipos IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgM, IgE, ou IgD. Em uma outra concretização, o anticorpo é um isótipo de IgG₁ ou IgG₄. Em uma outra concretização, o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno do mesmo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3, tais como um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3 de ser humano.

[0015] Em uma concretização, um fragmento de anticorpo é contemplado tendo um ou mais peptídeos de (poli-D) de poliaspartato. É previsto que o fragmento de anticorpo exibiria pelo menos um aumento de duas vezes na localização para o osso em comparação com o mesmo fragmento de anticorpo, mas carecendo os um ou mais poli-D peptídeos. O fragmento de anticorpo pode, por exemplo, ser qualquer ou uma combinação da seguinte: Fab, F(ab')₂, Fab₂ monespecífico, Fab₂ biespecífico, Fab₃ triespecífico, IgG monovalente, scFv, diacorpo biespecífico, triacorpo triespecífico, scFv-sc, a minicorpo, IgNAR, V-

NAR, hIgG, ou VhH. Em uma concretização, o fragmento de anticorpo liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3, tais como um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3 de ser humano. O anticorpo ou fragmento de anticorpo aqui pode totalmente ser humano, humanizado ou quimérico.

[0016] Em um segundo aspecto, a presente revelação provê um método de produção de um anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo direcionado para o osso que inclui as etapas de provisão de uma cadeia pesada de anticorpo, provisão de uma cadeia leve de anticorpo, provisão de um ou mais poli-D peptídeos ligados à cadeia pesada e/ou um ou mais poli-D peptídeos ligados à cadeia leve, e combinação da cadeia pesada e da cadeia leve para produzir um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo direcionado para o osso.

[0017] Em uma concretização, os um ou mais poli-D peptídeos ligadas à cadeia pesada e/ou os um ou mais poli-D peptídeos ligadas à cadeia leve são ligados por conjugação química. Em uma outra concretização, os um ou mais poli-D peptídeos ligadas à cadeia pesada e/ou os um ou mais poli-D peptídeos ligadas à cadeia leve são ligados por recombinação.

[0018] Em um terceiro aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso que inclui uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 3 ,4, e 5 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 11, e 12, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não seja SEQ ID NO: 2 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 6.

[0019] Em um quarto aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso que inclui uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 20, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 15.

[0020] Em um quinto aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ de ser humano que inclui uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (por exemplo, mAb2 F6). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGFβ1, TGFβ2, e TGFβ3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGFβ1.

[0021] Em um sexto aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ ser humano que inclui uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (por exemplo, mAb2 F16). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGFβ1, TGFβ2, e TGFβ3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGFβ1.

[0022] Em um sétimo aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ de ser humano que inclui uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compre-

endendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (por exemplo, mAb2 F11). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGF β 1.

[0023] Em um oitavo aspecto, a presente revelação provê um antagonista de IgG₄ de ser humano que inclui uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (por exemplo, mAb2 F17). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGF β 1.

[0024] Em um nono aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ de ser humano que inclui uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (por exemplo, mAb2 F12). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGF β 1.

[0025] Em um décimo aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ de ser humano que inclui uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (por exemplo, mAb2 F7). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGF β 1.

[0026] Em um décimo primeiro aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ de ser humano que inclui uma cadeia pesada

compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (por exemplo, mAb2 F2). O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Em uma concretização, o anticorpo especificamente liga TGF β 1.

[0027] Em décimo segundo aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso incluindo uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 23, 24, 25, e 26 (com ou sem o códon para a lisina de C-terminal de cadeia pesada) e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos in indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 27, 28, 29, 30, 31, e 32, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é codificada pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 23 (com ou sem o códon para a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é codificada pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 27.

[0028] Em um décimo terceiro aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de IgG₄ de ser humano incluindo uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos codificada pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 25 (com ou sem o códon para a lisina de C-terminal de cadeia pesada) e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos codificada pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 27. O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3.

[0029] Em um décimo quarto aspecto, a presente revelação provê anticorpo de IgG₄ de ser humano incluindo uma cadeia pesada com-

preendendo uma sequência de aminoácidos codificada pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 26 (com ou sem o códon para a lisina de C-terminal de cadeia pesada) e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos codificada pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 27. O anticorpo especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3.

[0030] Em um décimo quinto aspecto, a presente revelação provê um método para o tratamento de um indivíduo para perda óssea incluindo administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo de anti-TGFbeta ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo direcionado para o osso e detecção de pelo menos uma de uma redução nos níveis de TGF β , uma redução na atividade de TGF β , uma redução em perda óssea, uma redução na taxa de perda óssea, um aumento na densidade óssea, um aumento na resistência óssea, e uma redução nos níveis de IL-11.

[0031] Em uma concretização, o indivíduo é um ser humano. Em uma outra concretização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo de anti-TGFbeta especificamente liga um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3. Em uma outra concretização, o anticorpo de anti-TGFbeta inclui uma cadeia pesada, uma cadeia leve, e um ou mais peptídeos de (poli-D) de poliaspartato. O anticorpo exibe pelo menos um aumento de duas vezes na localização para o osso em comparação com um anticorpo com a mesma cadeia pesada e cadeia leve mas carecendo os um ou mais poli-D peptídeos. Em uma concretização, o anticorpo é qualquer um dos isótipos IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgM, IgE, e IgD. Em uma outra concretização, o anticorpo é um isótipo de IgG₁ ou IgG₄. Em uma concretização, o indivíduo tem doença de rim crônica e/ou uma doença óssea, incluindo metástase de câncer para o osso. A doença óssea pode ser osteogênese imperfeita ou osteoporose. Em uma concretização, a quantidade eficaz do anticorpo ou fragmento de

anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso é administrado subcutaneamente, intravenosamente, ou intramuscularmente.

[0032] Em um décimo sexto aspecto, a presente revelação provê uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno da presente invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, o anticorpo pode incluir uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 3, 4, e 5 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 11, e 12, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 2 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 6. Em uma outra concretização, o anticorpo pode incluir uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada); e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 29, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 15.

[0033] Em um décimo sétimo aspecto, a presente revelação provê uma molécula de ácido nucleico isolada incluindo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a cadeia pesada, a cadeia leve, ou ambas de um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso, em que a cadeia pesada do anticorpo de anti-TGFbeta compreende uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada)

e a cadeia leve do anticorpo de anti-TGFbeta compreende uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 20, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 15.

[0034] Em um décimo oitavo aspecto, a presente revelação provê um vetor de expressão incluindo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a cadeia pesada, a cadeia leve, ou ambas, de um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso, em que a cadeia pesada do anticorpo de anti-TGFbeta compreende uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada); e a cadeia leve do anticorpo de anti-TGFbeta compreende uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 20, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 15.

[0035] Em um décimo nono aspecto, a presente revelação provê uma célula hospedeira compreendendo um ou mais vetores de expressão incluindo sequências de ácidos nucleicos que codificam um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso, em que a cadeia pesada do anticorpo de anti-TGFbeta compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada); e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 20, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a

lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 15. Em uma concretização, a célula hospedeira é uma célula de mamífero ou uma célula procariótica. Em uma outra concretização, a célula hospedeira é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO) ou uma célula de *Escherichia coli* (*E. coli*).

[0036] Em um vigésimo aspecto, a presente revelação provê um método de produção de um anticorpo de anti-TGFbeta ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo que direciona o osso. O método inclui o desenvolvimento de uma célula hospedeira sob condições que permitem a produção do anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno do mesmo. A célula hospedeira compreende (i) uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada); e (ii) uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 29, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve is SEQ ID NO: 15. Em uma concretização, o método ainda inclui a formação do anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno do mesmo as uma composição farmacêutica compreendendo um veículo aceitável.

[0037] Em um vigésimo primeiro aspecto, a presente revelação provê uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso. O anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso inclui uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 3, 4, e 5 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pe-

sada) e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 11, e 12, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 2 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 6, ou o anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso inclui uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada); e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 29, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 (com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada) quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 15. Em uma concretização, a composição farmacêutica é formulada como um produto de fármaco líquido. Em uma outra concretização, a composição farmacêutica é formulada como um produto de fármaco liofilizado.

[0038] Em um vigésimo segundo aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso. A cadeia pesada do anticorpo compreende: uma região de determinação de complementaridade da cadeia pesada 1 (HCDR1) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, uma HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, e uma HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 35. A cadeia leve do anticorpo compreende: uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, e an LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. E, o anticorpo ainda compreende um poliD10-peptídeo em um de mais do

N terminal da cadeia pesada, do C-terminal da cadeia pesada, do N terminal da cadeia leve, e do C-terminal da cadeia leve.

[0039] Em um vigésimo terceiro aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende as regiões de determinação de complementaridade de cadeia pesada (CDR) 1-3 na SEQ ID NO: 39 e a cadeia leve CDR1-3 na SEQ ID NO: 40, em que o anticorpo ainda compreende um poliD10-peptídeo em um de mais do N terminal da cadeia pesada, do C-terminal da cadeia pesada, do N terminal da cadeia leve, e do C-terminal da cadeia leve. Em algumas concretizações, o anticorpo compreende um domínio variável de cadeia pesada (V_H ou HCVD) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 e um domínio variável de cadeia leve (V_L ou LCVD) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

[0040] Em um vigésimo quarto aspecto, a presente revelação provê uma sequência de polinucleotídeos que codifica: um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende uma HCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, uma HCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, e uma HCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, a cadeia leve do anticorpo compreende uma LCDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, uma LCDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, e uma LCDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, e o anticorpo ainda compreende um poliD10-peptídeo em um de mais do N terminal da cadeia pesada, do C-terminal da cadeia pesada, do N terminal da cadeia leve, e do C-terminal da cadeia leve; ou um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende as regiões de determinação de complementari-

dade de cadeia pesada (CDR) 1-3 na SEQ ID NO: 39 e a cadeia leve CDR1-3 na SEQ ID NO: 40, em que o anticorpo ainda compreende um poliD10-peptídeo em um de mais do N terminal da cadeia pesada, da C-terminal da cadeia pesada, da N terminal da cadeia leve, e da C-terminal da cadeia leve.

[0041] Em um vigésimo quinto aspecto, a presente revelação provê um anticorpo de direcionamento ósseo, tal como um anticorpo de anti-TGFbeta de direcionamento ósseo ou um fragmento de ligação de antígeno, da presente invenção para o uso em um método de tratamento descrito aqui.

[0042] Em um vigésimo sexto aspecto, a revelação provê o uso de um anticorpo de direcionamento ósseo, tal como um anticorpo de anti-TGFbeta de direcionamento ósseo ou fragmento de ligação de antígeno, da presente invenção, para a fabricação de um medicamento para um método de tratamento descrito aqui.

[0043] Concretizações particulares contempladas aqui são ainda descritos abaixo. As características e vantagens descritas acima e outras características e vantagens da presente invenção serão mais totalmente entendidas a partir da descrição detalhada da invenção tomada junta com as reivindicações anexas. É observado que o escopo das reivindicações é definido pelas recitações ali e não pela discussão específica de características e vantagens indicadas na presente descrição.

Breve Descrição dos Desenhos

[0044] A FIG. 1 mostra um D10-peptídeo quimicamente conjugado a um anticorpo de anti-TGF β (α -TGF β).

[0045] A FIG. 2 mostra o processo de conjugação química de um peptídeo que porta um ligante (ligante de peptídeo) e um grupo funcional de maleimida a dissulfetos de região principal reduzidos em um anticorpo de IgG1 de camundongo.

[0046] A FIG. 3A mostra a redução de gel de SDS-PAGE de conjugados químicos de um ligante de D10-peptídeo com uma IgG1 de camundongo de anti-TGF β , mAb1. A(s) tira(s) superior(es) representa(m) a cadeia pesada e a tira inferior da cadeia leve.

[0047] A FIG. 3B mostra valores de razão de peptídeo para anticorpo (PAR) vs. a razão de peptídeo-maleimida:mAb na reação de conjugação química do exemplo 1, que mostra um aumento linear na PAR com número crescente de peptídeos até 8 mol:mol PAR.

[0048] As FIGS. 4A-4G mostram cromatografia de exclusão por tamanho de misturas molares de 1:1 de TGF β 1 e conjugados químicos de um D10-peptídeo ou com trastuzumab (Herceptin®) ou o anticorpo de anti-TGFbeta mAb1. FIG. 4A mostra o perfil de SEC do conjugado químico de D10-peptídeo com mAb1. FIG. 4B mostra o perfil de SEC de uma mistura molar de 1:1 do conjugado químico de mAb1-D10 com TGF β 1. FIG. 4C mostra o perfil de SEC de mAb1 não modificado. FIG. 4D mostra o perfil de SEC de uma mistura molar de 1:1 de mAb1 com TGF β 1. FIG. 4E mostra o perfil de SEC de Herceptin®. FIG. 4F mostra o perfil de SEC de um conjugado químico de D10-peptídeo com Herceptin®. FIG. 4G mostra o perfil de SEC do conjugado químico de D10 com Herceptin® misturado em uma razão de 1:1 com TGF β 1.

[0049] A FIG. 5A mostra o traço de A_{280} oriundo de cromatografia de hidroxipatita de mAb1 e um conjugado de D10-mAb1 (eixo x = minutos, eixo y = absorbância (normalizada)).

[0050] A FIG. 5B mostra gel de SDS-PAGE de frações oriundas do material escoável (FT) e pico 4.

[0051] A FIG. 6A mostra cromatografia de hidroxipatita de conjugados químicas com números crescentes de peptídeos. A absorbância a 280 nm do eluato para cada conjugado é mostrado (eixo x = minutos, eixo y = absorbância (normalizada)).

[0052] A FIG. 6B mostra a fração de análico ligado (curva superior, círculos, escala esquerda) e o tempo de retenção (curva inferior, triângulos, escala direita) como uma função do número de peptídeos conjugados como determinados por SDS-PAGE.

[0053] A FIG. 7 mostra um ensaio de neutralização de TGF β *in vitro* realizado com células de A549 com um conjugado de controle (PAR=0) e conjugados com uma média de 4 ou 9 peptídeos em comparação com mAb1 não modificado.

[0054] A FIG. 8A mostra a distribuição dependente de tempo de mAb1 marcado com fluoroforo e um conjugado químico a 1 mg/kg (1 mpk) contendo cerca de 4,5 peptídeos. Os tempos em que os animais foram representados são indicados em cada painel. Por fotografia, o camundongo esquerdo recebeu mAb1, e o camundongo direito recebeu o conjugado químico. Intensidades de imagem foram ajustadas para revelar as diferenças na distribuição

[0055] A FIG. 8B mostra a razão de fluorescência ligada na região de interesse que corresponde ao fêmur distal e a região de interesse que corresponde ao coração nas imagens mostradas na FIG. 8A. Círculos correspondem ao anticorpo de mAb1 e quadrados correspondem ao D10-peptídeo conjugado com mAb1 (D10 mAb1).

[0056] A FIG. 9A diagramaticamente mostra possíveis localizações de D-10 peptídeos sobre um anticorpo de subtipo de IgG para criação de uma série de anticorpos de variante de fusão de mAb1 como sendo obtidos por ligação de D-10 peptídeos aos terminais de cadeia pesada e/ou leve usando métodos recombinantes. Os sítios de adição de D-10 peptídeos são indicados pelos círculos e o uso de sequências de ligante de peptídeo é indicado por linhas onduladas (a linha ondulada mais longa representa um ligante mais longo do que a linha ondulada mais curta).

[0057] A FIG. 9B mostra uma série de anticorpos de variante de

fusão (variantes de fusão) derivados por colocação dos peptídeos, como mostrados na FIG. 9A. Variantes de fusão recombinantes com várias combinações da posição de ligação e números de peptídeos foram gerados. Os números menores abaixo de cada diagrama mostram a identidade de cada variante de fusão recombinante como referido aqui por razões de clareza. Como referido aqui, variantes de fusão são designados ou com "fusão" ou "F" seguido pelo número de variante pretendido. Por exemplo, "Fusão 1" e "F1" ambos referem-se a um anticorpo tendo a configuração do anticorpo "1" sem um D10-peptídeo. A linha ondulada mais longa representa um ligante mais longo do que a linha ondulada mais curta.

[0058] A FIG. 10 mostra SDS-PAGE das variantes de fusão de mAb1 recombinantes purificadas indicadas sob condições de redução (gel superior) ou de não redução (gel inferior).

[0059] A FIG. 11 mostra termoestabilidade de variantes de fusão de mAb1 recombinantes como determinados por fluorimetria de varredura diferencial (DSF). A transição para uma forma parcialmente desnaturada a cada temperatura é detectada por um aumento na fluorescência de corante. A inclinação do aumento de fluorescência com temperatura ($-d(RFU)/dT$) foi calculada e é exibida versus a temperatura da amostra. A taxa da desnaturação é máxima na mínima das curvas que representam o ponto central das transações térmicas (Tm). Por referência, as estruturas de cada uma das variantes de fusão de mAb1 recombinantes são mostrados diagramaticamente.

[0060] As FIGS. 12A e 12B mostram a neutralização de TGF β na elicitação da produção de IL-11 por células de A549 *in vitro* por oito variantes de fusão de mAb1 recombinantes mostram diagramaticamente na FIG. 9B.

[0061] A FIG. 13 mostra a afinidade de variantes de fusão de mAb1 recombinantes e conjugados químicos de mAb1 a hidroxipatita

como avaliada por cromatografia de coluna em uma coluna de hidroxipatita de cerâmica.

[0062] A FIG. 14 mostra a distribuição de variantes de fusão de mAb1 recombinantes marcados com fluoroforo selecionado e conjugados químicos de mAb1 em camundongos CD-1 obtidos por formação de imagem ao vivo em vários tempos pós-administração.

[0063] A FIG. 15 mostra a quantidade de anticorpo marcado por corante fluorescente, variante de fusão de mAb1 recombinante e conjugado químico de mAb1 localizados na coluna vertebral depois da administração a camundongos CD-1. Fluorescência foi medida por um instrumento de IVIS durante um período de 3 semanas. O logaritmo da fluorescência máxima dentro de ROI é mostrado.

[0064] A FIG. 16 mostra imagens de fluorescência de coluna e fêmures ressecados de camundongos administrados com variantes de fusão de mAb1 recombinantes mAb1 F6, mAb1 F16, e conjugados químicos de mAb1 F17 e mAb1 ("Conj") no estudo descrito nos Exemplos 13 e FIG. 15 depois de 10 e 21 dias.

[0065] As FIGS. 17A e 17B mostram os níveis de fluorescência de mAb2 F1 e mAb2 F6 em 10 µL de soro, e porção lombar ressecada de espinha, fêmur distal (trabecular), rim e coração depois de 24 e 96 h como descritos no Exemplo 15.

[0066] A FIG. 18A mostra que direcionamento ósseo via mAb1-D10 (mAb1 F6) profundamente influencia soro PK após a administração de dose única. mAb1 F6 exibe de 13 a 14 vezes exposição de soro inferior (AUC), depuração de soro mais rápida, e semi-vida de soro mais curta ($t_{1/2}$) do que mAb1 quando medida por ELISA. Dados são expressos como média \pm DP: Significância estatística (* $p \leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1) foi observada quando medida por análise por variância (ANOVA), Teste de Comparação Múltipla de Dunnet. mAb1 é um anticorpo monoclonal de anti-TGFbeta inibitório muriniza-

do e mAb1 F6 é um anticorpo monoclonal de anti-TGFbeta inibitório murinizado recombinante com um polipeptídeo de aspartato D10 ligado ao C-terminal da cadeia pesada de mAb1. AUC para formação de imagem /Osso foi normalizado para 1,0. Doses foram de 5 mg/kg para cada mAb1 F6 e mAb1.

[0067] A FIG. 18B mostra que mAb1 F6 exibe uma exposição 22 vezes mais alta (AUC) no osso como medida por formação de imagem ótica em comparação com mAb1. Dados expressos como média \pm DP: Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1) foi observada quando medida por AVOVA, Teste de Comparação Múltipla de Dunnet. Doses foram de 1 mg/kg para cada mAb1 F6 e mAb1.

[0068] A FIG. 19 ilustra perfis de dose de pico-baixa de PK ("dose pico-trough PK profiles"). Direcionamento ósseo (via mAb1 F6) influencia profundamente o PK de soro de pico-baixa de múltipla dose. mAb1 F6 exibe concentrações de soro mais baixa do que mAb1 em ambas as 24 e 48 horas de pós-dose e após a primeira dose e a dose 23. Diferenças de vezes foram mais baixas para mAb1 F6 por 3 a 4,5 vezes a 24 horas e de 6 a 9 vezes a 48 horas. Acúmulo também apareceu menos com mAb1 F6 do que com mAb1. Dados expressos como média \pm DP: Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1) foi observada quando medida por teste t não emparelhado. Concentrações de soro foram medidas via espectrometria de massa.

[0069] A FIG. 20 mostra que direcionamento ósseo (mAb1 F6) e mAb1 aumentam BV/TV (%) em uma forma suscetível a dose em camundongos G610C (OI). Mudanças significativas sobre BV/TV (%) em comparação com camundongos G610C tratados com anticorpo de controle 13C4 (anticorpo de IgG1 de camundongo) foram observados em doses de 1 e 5 mg/kg, para ambos os tratamentos. Camundongos G610C tratados com 13C4 (13C4) exibiram diminuições significativas

em BV/TV em comparação com cepa de base de WT (WT 13C4). Dados expressos como média \pm DP: Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1; $^{\#}p\leq 0,05$ 13C4 em comparação com WT 13C4) foi observada quando medida por uma via ANOVA. BV/TV (%) media via formação de imagem de μ CT.

[0070] A FIG. 21 mostra que direcionamento ósseo (mAb1 F6) e mAb1 aumentam a força máxima para falha ("maximum force to failure") em uma forma suscetível a dose em camundongos G610C (OI). Mudanças significativas na força máxima para falha em comparação com camundongos G610C tratados com 13C4 foram observadas a 1 e 5 mg/kg para mAb1 F6 e 5 mg/kg, apenas, para mAb1. Camundongos G610C tratados com um controle de anticorpo (13C4) exibiram diminuições significativas na força máxima para falha em comparação com cepa de base de WT. Dados expressos como média \pm DP: Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1; $^{\#}p\leq 0,05$ 13C4 em comparação com WT 13C4) foi observada como medida por uma via ANOVA. Força máxima para falha foi medida via teste de compressão biomecânica.

[0071] A FIG. 22 mostra os efeitos de mAb1 e mAb1 F6 em BV/TV em camundongos G610C camundongos. Aos anticorpos foram administrados dosadamente em várias frequências (3 x semanalmente, 1 x semanalmente, 1 x a cada 2 semanas, ou 1 x a cada 4 semanas) a 5 mg/kg por 12 semanas. Anticorpo 13C4 foi usado como um controle. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1; $^{\#}p\leq 0,05$ 13C4 em comparação com WT 13C4) foi observada quando medida por uma via ANOVA. BV/TV foi medido via formação de imagem de μ CT.

[0072] A FIG. 23 mostra os efeitos de mAb1 e mAb1 F6 na formação máxima para falha em camundongos G610C. Aos anticorpos foram administrados dosadamente em várias frequências (3 x semanal-

mente, 1 x semanalmente, 1 x a cada 2 semanas, ou 1 x a cada 4 semanas) a 5 mg/kg por 12 semanas. Anticorpo 13C4 foi usado como um controle. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 ou mAb1 F6 em comparação com 13C4) foi observada quando medida por uma via ANOVA. Força máxima para falha foi medida via teste de compressão biomecânica.

[0073] A FIG. 24 mostra os efeitos de mAb1 e mAb1 F6 em BV/TV (%) e os níveis de soro médios dos anticorpos nos camundongos G610C. Aos anticorpos foram administrados dosadamente 1 x a cada 2 semanas ou 1 x semanalmente a 5 mg/kg por 12 semanas. Anticorpo 13C4 foi usado como um controle. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 ou mAb1 F6 em comparação com 13C4; # $p\leq 0,05$ 13C4 em comparação com WT 13C4) foi observada quando medida por uma via ANOVA. BV/TV (%) foi medido via formação de imagem de μ CT.

[0074] A FIG. 25 mostra os efeitos de mAb1 e mAb1 F16 on BV/TV (%) em camundongos G610C. Aos anticorpos foram administrados dosadamente 3 x semanalmente a 5 mg/kg por 8 semanas. Anticorpo 13C4 foi usado como um controle. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 ou mAb1 F16 em comparação com 13C4; # $p\leq 0,05$ 13C4 em comparação com WT 13C4) foi observada quando medida por uma via ANOVA. BV/TV (%) foi medido via formação de imagem de μ CT.

[0075] A FIG. 26 mostra os efeitos de mAb1 e mAb1 F11 em BV/TV (%) em camundongos de tipo selvagem. Aos anticorpos foram administrados dosadamente 3 x semanalmente a 5 mg/kg por 9 semanas. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 ou mAb1 F11 em comparação com 13C4) foi observada quando medida por uma via ANOVA. BV/TV (%) foi medido via formação de imagem de μ CT.

[0076] A FIG. 27 mostra a eficácia radiante total na lombar de camundongos de tipo selvagem depois que recebem uma dose única

intraperitoneal de veículo ou mAb1 ou mAb1 F6 fluorescentemente marcado. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 F6 em comparação com mAb1) foi observada quando medida por uma via ANOVA.

[0077] A FIG. 28 mostra a eficácia radiante total no coração de camundongos de tipo selvagem depois que recebem uma única dose intraperitoneal de veículo ou mAb1 ou mAb1 F6 fluorescentemente marcado. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 em comparação com mAb1 F6) foi observada quando medida por uma via ANOVA.

[0078] A FIG. 29 mostra a eficácia radiante total no fígado de camundongos de tipo selvagem depois que recebem uma única dose intraperitoneal de veículo ou mAb1 ou mAb1 F6 fluorescentemente marcado. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 em comparação com mAb1 F6) foi observada quando medida por uma via ANOVA.

[0079] A FIG. 30 mostra a eficácia radiante total no intestino de camundongos de tipo selvagem depois que recebem uma única dose intraperitoneal de veículo ou mAb1 ou mAb1 F6 fluorescentemente marcado.

[0080] A FIG. 31 mostra a eficácia radiante total nos tecidos indicados de camundongos de tipo selvagem a 24 hrs ou 96 hrs depois que recebem uma única dose intraperitoneal de mAb2 ou mAb2 D10 fluorescentemente marcado. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb1 em comparação com mAb1 F6) foi observada quando medida por teste t.

[0081] A FIG. 32 mostra as razões de eficácia radiante total lombar/soro em camundongos de tipo selvagem a 24 hrs ou 96 hrs depois que recebem uma única dose intraperitoneal de mAb2 ou mAb2 D10 fluorescentemente marcado.

[0082] A FIG. 33 mostra as razões de eficácia radiante de fêmur/soro em camundongos de tipo selvagem a 24 hrs ou 96 hrs depois que recebem uma única dose intraperitoneal de mAb2 ou mAb2 D10

fluorescentemente marcado. Significância estatística (* $p\leq 0,05$ mAb2 D10 em comparação com mAb2) foi observada quando medida por teste t.

Descrição Detalhada da Invenção

[0083] A presente invenção provê anticorpos e seus fragmentos de ligação de antígeno que estão ligados a um ou mais poli-D peptídeos de direcionamento ósseo tais que os anticorpos e fragmentos de preferência abrigam aos ossos em um paciente que necessita dos mesmos. A característica de direcionamento ósseo de tal um anticorpo ou fragmento permite que o anticorpo e fragmento direcione tecidos ósseos especialmente e reduz a exposição sistêmica do paciente ao anticorpo ou fragmento, desse modo melhorando a eficácia do fármaco enquanto minimizando os efeitos colaterais adversos.

[0084] Como usado aqui, o termo "poli-D peptídeo" refere-se a uma sequência de peptídeos tendo uma pluralidade de ácido aspártico ou aspartato ou "D" aminoácidos, tais como cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, ou mais aminoácidos de ácido aspártico (resíduos). Em uma concretização, um poli-D peptídeo pode incluir cerca de 2 a cerca de 30, ou cerca de 3 a cerca de 15, ou cerca de 4 a cerca de 12, ou cerca de 5 a cerca de 10, ou cerca de 6 a cerca de 8, ou cerca de 7 a cerca de 9, ou cerca de 8 a cerca de 10, ou cerca de 9 a cerca de 11, ou cerca de 12 a cerca de 14 resíduos de ácido aspártico. Em uma concretização, poli-D peptídeos incluem apenas resíduos de aspartato. Em uma outra concretização, poli-D peptídeos podem incluir um ou mais outros aminoácidos ou compostos similares. Como usado aqui, o termo "D10" refere-se a uma sequência contígua de dez aminoácidos de ácido aspártico, como visto na SEQ ID NO: 1. Em algumas concretizações, um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou mais do que 12 poli-D peptídeos.

[0085] O poli-D peptídeo pode ser ligado a um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de interesse via tecnologia recombinante ou conjugação química. Como usado aqui, o termo "variante de fusão" ou "variante" refere-se a um construto de anticorpo montado (*vide* FIG. 9B) que inclui pelo menos uma de uma cadeia pesada ou uma cadeia leve ou fragmento de anticorpo ou subparte que incorpora ou está de outra maneira associada a um poli-D peptídeo, tal como uma sequência de D10. Por exemplo, um poli-D peptídeo pode estar em contato com uma cadeia de anticorpo em uma variante de fusão por tecnologia recombinante (*por exemplo*, em que uma sequência de poli-D peptídeos é integral com a sequência de aminoácidos da cadeia pesada, cadeia leve, ou fragmento de anticorpo ou subparte), conjugação química, ou ambas.

[0086] Como usado aqui, o termo "conjugado químico" refere-se a um anticorpo montado que inclui pelo menos uma de uma cadeia pesada ou uma cadeia leve ou fragmento de anticorpo ou subparte à qual um ou mais poli-D peptídeos estão ligados por reação química com, por exemplo, os resíduos de cisteína presentes na sequência de aminoácidos da cadeia pesada, cadeia leve, fragmento de anticorpo, ou subparte. Resíduos de cisteína exemplares que podem ser usados para conjugação são aqueles na região principal de cadeia pesada. Resíduos de cisteína ou outros resíduos apropriados para a conjugação podem também ser introduzidos para a cadeia de anticorpo por mutagênese. Um espaçador/ligante tal como um ligante de peptídeo ou uma porção química (*por exemplo*, um grupo de função de maleimida e um polietileno glicol (PEG)) podem ser usados entre o peptídeo poli-D peptídeo e o componente de anticorpo na conjugação. Métodos para a conjugação química das porções desejadas a anticorpos são bem conhecidos na técnica. *Vide, por exemplo*, Behrens e Liu, mAbs 6:1, 46-53 (2014).

[0087] Como usado aqui, o termo "integral" refere-se à integração de um poli-D peptídeo com uma cadeia de anticorpo via tecnologia recombinante tal que o poli-D peptídeo é transcrito a partir do mesmo transcrito de RNA como a cadeia de anticorpo e resíduos na mesma sequência de polipeptídeos como a cadeia de anticorpo. Em tais casos, o poli-D peptídeo podem ser ligado à cadeia de anticorpo, com ou sem qualquer ligante de peptídeo ou espaçador de aminoácido, na cadeia de anticorpos, ou em ambos os terminais, ou integrados internamente à cadeia de anticorpo, sem afetar o dobramento adequado da cadeia de anticorpo, o conjunto de moléculas de anticorpos, ou a ligação do anticorpo a seu antígeno.

[0088] Formatos exemplares dos anticorpos de direcionamento ósseo da presente invenção são mostrados na FIG. 9B (formatos F2-F20). O peptídeo de direcionamento ósseo (representado pelos círculos) pode ser ligado ou fundido a (por exemplo, integral com) qualquer dos ou ambos os terminais da cadeia pesada e/ou cadeia leve do anticorpo. Em algumas concretizações, o peptídeo de direcionamento ósseo não está ligado à cadeia leve através do N-terminal da cadeia leve. A ligação ou fusão pode ser uma conexão direta (isto é, sem um espaçador ou um ligante), ou através de um espaçador ou um ligante (representado pelas linhas onduladas; por exemplo, um ligante de peptídeo). Exemplos específicos desses formados são mostrados nas tabelas de 1 e 7 abaixo.

[0089] Qualquer espaçador ou ligante adequado pode ser usado para ligar o peptídeo de direcionamento ósseo por, por exemplo, tecnologia recombinante ou conjugação química, a um anticorpo de interesse. Por exemplo, um ligante de peptídeo tendo um, dois, três, ou mais repetições do peptídeo de G4S (SEQ ID NO: 9) pode ser usado. Outros ligantes de peptídeo adequados podem também ser usados. *Vide, por exemplo, Chen e outros, Adv Drug Deliv Rev 65(10):1357-*

1369 (2013).

Anticorpos de direcionamento ósseo e seus fragmentos de ligação de antígenos exemplares

[0090] A presente invenção revela anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno tendo um ou mais poli-D peptídeos (poliaspartato ou poliasp) (*por exemplo*, uma sequência de D10) ligados aos mesmos. Esses anticorpos e fragmentos modificados melhoraram a localização do osso. Em uma concretização particular, estes anticorpos são anticorpos de anti-TGF β , como descritos aqui. Sem não querer estar ligado pela teoria, acredita-se que anticorpos de anti-TGF β de direcionamento eficaz para o osso com um ou mais poli-D peptídeos possam prover uma nova terapia para indivíduos com doenças caracterizadas por degeneração óssea patofisiológica associada ao TGF β .

[0091] No entanto, embora numerosas concretizações e exemplos aqui sejam expressos no contexto do uso de anticorpos de α -TGF β e sequências de D10, é contemplado que outros anticorpos ou proteínas adequados para o tratamento de uma condição óssea anormal ou uma doença óssea podem ser modificados com porções de direcionamento ósseas como descritas aqui. Por exemplo, anticorpos terapêuticos para o tratamento de perda óssea, estimulação de crescimento ósseo, ou direcionamento a células anormais (*por exemplo*, células de câncer) no osso podem ser ligados a um ou mais peptídeos de direcionamento ósseo como descrito aqui. Os anticorpos terapêuticos podem ligar-se a proteínas ou peptídeos envolvidos na manutenção ou formação óssea. Além disso, outros peptídeos de direcionamento ou localização óssea podem ser usados.

[0092] Como usado aqui, os termos "anticorpo de α -TGF β " e "anticorpo de anti-TGF β " podem ser usados intercambiavelmente e referem-se a um anticorpo, ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, isto é, específico para TGF β 1, TGF β 2, e/ou TGF β 3. Por

exemplo, pelo menos um sítio de ligação de antígeno (ou paratopo) de um anticorpo de α -TGF β , ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, se liga a um epitopo encontrado em TGF β 1, TGF β 2, e/ou TGF β 3 de ser humano.

[0093] Em uma concretização, um construto de D10 de anticorpo de α -TGF β contemplado pode ser criado por conjugação química. Por exemplo, conjugação química pode ser realizada por métodos conhecidos na técnica tais como aqueles revelados nas Patentes U.S. Nos. 7.763.712, 4.671.958, e 4.867.973, cada uma das quais é incorporada por referência. Em um outros exemplo, um peptídeo ou outro ligante pode ser usado para ligar um D10-peptídeo a um anticorpo (*vide FIGS. 1 e 2*). Em uma outra concretização, redução dos grupos tiol na região principal (*por exemplo*, resíduos de cisteína de região principal) do anticorpo permite conjugação química de poli-D peptídeos usando um espaçador de PEG. Similarmente, outros resíduos de cisteína de anticorpos e fragmentos de anticorpo contemplados, ou nativos aos anticorpos e fragmentos ou introduzidos por mutagênese, podem ser quimicamente conjugados com poli-D peptídeos. Um tal esquema de montagem contemplada de um anticorpo de α -TGF β quimicamente conjugado com um D10-peptídeo é ilustrado na FIG. 2.

[0094] Em uma outra concretização, um construto de D10 de anticorpo de α -TGF β contemplado pode ser criado por expressão recombinante, onde a sequência de D10 é adicionada à sequência de aminoácidos da cadeia pesada e/ou cadeia leve do anticorpo de α -TGF β . Por exemplo, as sequências de ácidos nucleicos que codificam a sequências de aminoácidos das cadeias pesada e/ou leve podem ser modificadas para codificar uma sequência de D10 que seria expressa no N-terminal, no C-terminal, ou tanto N-terminal quanto C-terminal das cadeias pesada e/ou leve do anticorpo de α -TGF β . Similarmente, um ou mais sequências de D10 poderiam ser adicionadas a uma se-

quência de aminoácidos de uma cadeia pesada de anticorpo na ou próxima a região principal e/ou dentro da sequência de aminoácidos de uma cadeia leve de anticorpo. Cada sequência de ácidos nucleicos para a cadeia pesada e/ou leve que abriga D10 pode ser incorporada em um vetor de expressão e subsequentemente transfetado em uma célula hospedeira capaz de expressão e tradução da sequência de ácidos nucleicos na sequência de aminoácidos correspondente. Além do mais, a célula hospedeira é capaz de montar as sequências de aminoácidos expressas na proteína funcional por combinação de cada da cadeia pesada e cadeia leve com sua sequência complementar para formar um construto D10 de anticorpo de α-TGFβ. Exemplos de variantes de fusão D10 de anticorpo de α-TGFβ recombinantes contemplados como ilustrados nas FIGS. 9A e 9B.

[0095] Embora um poli-D peptídeo é discutido aqui, outros peptídeos similares possam também ser usados para permitir direcionamento de um anticorpo, uma outra proteína, ou um peptídeo para o osso. Por exemplo, sequências de repetição de ácido aspártico podem ter mais ou menos resíduos do que uma sequência D10, tais como cerca de 2, ou cerca de 4, ou cerca de 6, ou cerca de 8, ou cerca de 12, ou cerca de 14, ou cerca de 16, ou, cerca de 18, ou cerca de 20, ou cerca de 30, ou 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 resíduos, e semelhantes. Além disso, outros aminoácidos naturais com propriedades químicas similares, tais como glutamato, ou aminoácidos não naturais e/ou outros compostos quimicamente equivalentes podem ser usados como substitutos de ou usados em combinação com ácido aspártico, também.

[0096] Em uma concretização, é contemplado que um anticorpo com um ou mais poli-D peptídeos ligados ao mesmo exibira pelo menos cerca de um aumento de 2 vezes, ou cerca de a 3 vezes, ou cerca de 5 vezes, ou cerca de 10 vezes, ou cerca de 20 vezes na localização

para o osso em comparação com o mesmo anticorpo sem os um ou mais poli-D peptídeos.

[0097] Além do mais, embora um anticorpo de α-TGF β seja descrito aqui, qualquer anticorpo que liga outras proteínas envolvidas na formação óssea ou manutenção óssea pode ser similarmente modificada para direcionar o anticorpo para o osso, como desejado. Anticorpos ou seus fragmentos de ligação de antígeno contemplados aqui podem ser de quaisquer espécies ou representam anticorpos híbridos que combinam cadeias pesadas e cadeias leve de diferentes espécies, e podem ser específicas para qualquer epitopo desejado. Além disso, anticorpos que podem ser usados aqui não são limitados por isotopo, e podem ser qualquer uma de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgM, IgE ou IgD. Fragmentos de anticorpo podem também ser usados. Por exemplo, sequências D10 ou outros compostos de direcionamento ósseo podem ser ligados a fragmentos Fab e/ou Fc ou qualquer outro fragmento de anticorpo para conseguir um resultado desejado como descrito aqui. Além disso, sequências D10 podem ser ligadas aos fragmentos scFv e outros proteínas de fusão similar. Em uma outra concretização, sequências D10 podem ser ligadas a anticorpos tendo uma mutação principal de núcleo de S228P (numerado de acordo com a numeração de sistema de EU; ou alternativamente S241P de acordo com o sistema de Kabat; *vide Kabat e outros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Government Printing Office, 165–492 (1987); e Silva e outros Jour. Biol. Chem. 290:5462–5469 (2015)).*

[0098] Em uma outra concretização, anticorpos e/ou outros proteínas contempladas aqui podem ser conjugadas com moléculas adicionais. Por exemplo, anticorpos ou outras proteínas contempladas aqui podem ser conjugados com marcas químicas que permitem localização dos anticorpos/proteínas quando injetados ou de outra maneira

introduzidos para dentro de um indivíduo. Por exemplo, radiomarcadores, compostos fluorescentes, e semelhantes podem ser ligados aos anticorpos/proteínas para auxiliar sua localização *in vivo*. Além disso, anticorpos e/ou outros proteínas contemplados aqui podem também ser conjugados com compostos adicionais tem um efeito terapêutico, tais como moléculas pequenas, produtos farmacêuticos, agentes anti-neoplásicos, hormônios de crescimento, vitaminas, etc., tais que os anticorpos e/ou outras proteínas podem servir como um veículo para um ou mais de tais compostos.

[0099] Em algumas concretizações, o anticorpo de anti-TGFbeta de direcionamento ósseo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 3, 4, e 5, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 11, e 12, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 2 quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve é SEQ ID NO: 6. Anticorpos exemplares são mAb1 F3, mAb1 F4, mAb1 F5, mAb1 F6, mAb1 F8, mAb1 F9, mAb1 F10, mAb1 F11, mAb1 F13, mAb1 F14, mAb1 F15, mAb1 F16, mAb1 F18, mAb1 F19, e mAb1 F20 (Tabela 1).

[00100] Em outras concretizações, o anticorpo de anti-TGFbeta de direcionamento ósseo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 13, 14, 16, e 17, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos indicada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 15, 18, 19, 20, 21, e 22, com a condição de que a sequência de aminoácidos de cadeia pesada não é SEQ ID NO: 13 quando a sequência de aminoácidos de cadeia leve is SEQ ID NO: 15. Anticorpos exemplares são mAb2 F3, mAb2 F4, mAb2 F5, mAb2 F6, mAb2 F8, mAb2 F9, mAb2 F10, mAb2 F11, mAb2 F13, mAb2 F14, mAb2 F15,

mAb2 F16, mAb2 F18, mAb2 F19, e mAb2 F20 (Tabela 7).

[00101] Em algumas concretizações, os anticorpos da presente invenção, tais como os anticorpos de anti-TGFbeta, não têm a lisina C-terminal na cadeia pesada. A lisina C-terminal pode ser removida durante a fabricação ou por tecnologia recombinante (*isto é*, a sequência de codificação da cadeia pesada não inclui um códon para a lisina terminal C-terminal). Assim contemplado dentro da invenção também são anticorpos compreendendo a sequência de aminoácidos de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2 ou 13 sem a lisina C-terminal. Um poli-D peptídeo pode ser ligado ao C-terminal de uma cadeia pesada com ou sem a lisina C-terminal.

Métodos de tratamento

[00102] Em uma concretização particular, um método de tratamento de um indivíduo tal como um paciente humano para perda óssea associada ao TGF β inclui administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso para o indivíduo. O método pode ainda incluir uma etapa de medição ou detecção de uma redução em níveis ou atividade de TGF β , uma redução em perda óssea ou a taxa de perda óssea, um aumento na densidade óssea, e/ou um aumento na resistência óssea.

[00103] Uma "quantidade eficaz", como usado aqui, refere-se a uma quantidade de um agente terapêutico, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo de a-TGF β , que quando administrado a um indivíduo que necessita do mesmo melhora a saúde do indivíduo, tais como, por exemplo, por redução dos níveis ou atividade de TGF β associados ao osso, redução de perda óssea ou da taxa de perda óssea, aumento da densidade óssea, e/ou aumento da resistência óssea.

[00104] Como usado aqui, o termo "individual" refere-se a um animal. Exemplos de indivíduos incluem seres humanos, animais domesticados, animais domésticos, e outros animais sem limitação. Outros

exemplos de indivíduos incluem animais tendo uma doença óssea associada ao TGF β .

[00105] Em uma outra concretização, formulações ou composições de anticorpo farmacêuticas incluindo formulações de produto de fármaco líquidas aquosas e formulações de produto de fármaco liofilizadas contendo um ou mais anticorpos de anti-TGFbeta de direcionamento ósseo tais como conjugados químicos ou variantes de fusão recombinantes são contemplados. Composições farmacêuticas incluindo anticorpo de anti-TGFbeta de direcionamento ósseo e/ou fragmentos de anticorpo podem ser formulados como descritos na publicação de pedido de patente U.S. No. 2014/0286933 A9, que é incorporada aqui por referência, ou de outra maneira como é conhecida na técnica.

[00106] Em uma concretização particular, um método para o tratamento de doença óssea inclui administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso to um indivíduo com uma doença óssea, tal como uma doença óssea associada a doença de rim crônica, câncer metástase para o osso, ou condições metabólicas anormais. Em uma outra concretização particular, um método para o tratamento de osteogênese imperfeita inclui administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso para um indivíduo com osteogênese imperfeita. Em uma outra concretização, um método para o tratamento de osteoporose inclui administração de uma quantidade eficaz de um anticorpo de anti-TGFbeta direcionado para o osso to um indivíduo com osteoporose.

[00107] Em algumas concretizações, os pacientes são tratados com uma combinação de um anticorpo de direcionamento ósseo ou fragmento de anticorpo da presente invenção e um outro agente terapêutico, tal como um agente terapêutico para uma condição de perda óssea

(por exemplo, bisfosfonatos). O anticorpo ou fragmento de anticorpo e outro agente terapêutico podem ser administrados ao paciente simultaneamente ou sequencialmente.

[00108] Em algumas concretizações, os anticorpos de direcionamento ósseo e outros componentes usados nos métodos de tratamento da presente invenção podem ser providos em "kits" ou artigos de manufatura.

Métodos de formação de anticorpos

[00109] Os anticorpos ou os fragmentos da presente invenção podem ser feitos por métodos bem estabelecidos na técnica. Sequências de DNA que codifica as cadeias leve e pesada dos anticorpos podem ser inseridos para dentro dos vetores de expressão tais que os genes são operativamente ligados às sequências de controle de expressão necessárias tais como sequências de controle transcritivas e translacionais. Vetores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), vírus de planta tais como vírus de mosaico de couve-flor, vírus de mosaico de tabaco, cosmídeos, YACs, episomas derivadas de EBV, e semelhantes. A sequência de codificação de cadeia leve de anticorpo e a sequência de codificação de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridas para dentro dos vetores separados, e podem operativamente ligadas às mesmas ou diferentes sequências de controle de expressão (por exemplo, promotores). Em uma concretização, ambas as sequências de codificação são inseridas para dentro do mesmo vetor de expressão e podem ser operativamente ligadas às mesmas sequências de controle de expressão (por exemplo, um promotor comum), para separar sequências de controle de expressão idênticas (por exemplo, promotores), ou para diferenciar sequências de controle de expressão (por exemplo, promotores). As sequências de codificação de anticorpo podem ser inseridas para dentro do vetor de expressão por métodos padrão (por

exemplo, ligação de sítios de restrição complementares on o anticorpo gene fragmento e vetor, ou ligação final abrupta se nenhum sítio de restrição estiver presente).

[00110] Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes podem portar sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. Exemplos de sequências reguladoras para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que dirigem altos níveis de expressão de proteína em células de mamífero, tais como promotores e/ou melhoradores derivados de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tais como o promotor/melhorador de CMV), Vírus de Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/melhorador SV40), adenovírus, (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), poliomá e fortes promotores de mamífero tais como imunoglobulina nativa e promotores de actina.

[00111] Além dos genes de cadeia de anticorpo e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem portar sequências adicionais, tais como sequências que regulam replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. Por exemplo, o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, tal como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira para dentro do qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis podem incluir o gene de reductase de diidrofolato (DHFR) (para o uso nas células hospedeiras de dhf com seleção/ampliação de metotrexato), o gene neo (para seleção de G418), e o gene de sintetase de glutamato.

[00112] Os vetores de expressão que codificam os anticorpos da presente invenção são introduzidos para células hospedeiras para expressão. As células hospedeiras são cultivadas sob condições adequadas para expressão do anticorpo, que é então coletado e é isolado.

Células hospedeiras incluem célula hospedeira de mamífero, planta, bacteriana ou de levedura. Linhas de células de mamífero disponíveis como hospedeiros para a expressão bem conhecidos na técnica e incluem muitas linhas de células imortalizadas disponíveis da American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluem, *inter alia*, células de ovários de hamster chinês (CHO), células de NS0, células de SP2, células de HEK-293T, células de 293 Freestyle (Invitrogen), células de NIH-3T3, células de HeLa, células de rim de hamster bebê (BHK), células de rim de macaco verde Africano (COS), células de carcinoma hepatocelular de ser humano (por exemplo, Hep G2), células de A549, e numerosas de outras linhas de células. Linhas de células podem ser selecionadas com base em seus níveis de expressão. Outras linhas de células que podem ser usadas são linhas de células de inseto, tais como células de Sf9 ou de Sf21.

[00113] Além disso, expressão de anticorpos pode ser melhorada usando numerosas técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão de gene de sintetase de glutamina (o sistema de GS) é uma abordagem comum para o melhoramento de expressão sob certas condições.

[00114] Meio de cultura de tecido para as células hospedeiras pode incluir, ou estar livre de, componentes derivados de animal (ADC), tal como albumina de soro bovino. Em algumas concretizações, meio de culturas livre de ADC é preferido para segurança humana. Cultura de tecidos pode ser realizada usando o método de alimentação por batelada, um método de perfusão contínua, ou qualquer outro método apropriado para as células hospedeiras e o rendimento desejado.

Composições farmacêuticas

[00115] O anticorpo da invenção pode ser formulado para estabilidade de armazenagem adequada. Por exemplo, o anticorpo pode ser lyophilizado ou armazenado ou reconstituído para o uso usando excipientes.

tes farmaceuticamente aceitáveis. Para uma terapia de combinação, os dois ou mais agentes terapêuticos tais como anticorpos podem ser co-formulados, por exemplo, misturados e providos em uma composição simples.

[00116] O termo "excipiente" ou "veículo" é usado aqui para descrever qualquer ingrediente outro não que o(s) composto(s) da invenção. A escolha de excipiente(s) em uma grande extensão dependerá(ão) dos fatores tais como do modo particular modo de administração, do efeito do excipiente sobre a solubilidade e estabilidade, e da natureza da forma de dosagem. "Excipiente farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e a totalidade de solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de atraso de absorção e isotônicos, e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Some exemplos de excipientes farmaceuticamente aceitáveis são água, solução salina, solução salina tamponada por fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes, bem como suas combinações. Em alguns casos, agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoois tal como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio estará incluído na composição. Exemplos adicionais de substâncias farmaceuticamente aceitáveis são agentes de umectação ou quantidades menores de substâncias auxiliares tal como agente de umectação ou emulsificação, preservativos ou tampões, que melhoram a vida de prateleira ou eficácia do anticorpo.

[00117] Uma composição farmacêutica da invenção pode ser preparada, embalada ou vendida a granel, como uma única dose unitária, ou como uma pluralidade de únicas doses unitárias. Como usado aqui, uma "dose unitária" é uma quantidade discreta da composição farmacêutica compreendendo uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo. A quantidade do ingrediente ativo é em geral igual à dosagem do ingrediente ativo que seria administrada a um indivíduo ou uma fra-

ção conveniente de tal dosagem tal como, por exemplo, metade ou um terço de tal dosagem.

[00118] As composições farmacêuticas da invenção são tipicamente adequadas para a administração parenteral. Como usado aqui, "administração parenteral" de uma composição farmacêutica inclui qualquer rota de administração caracterizada por rompimento físico de um tecido de um indivíduo e administração da composição farmacêutica através do rompimento no tecido, assim em geral resultando na administração direta na corrente sanguínea, no músculo, ou em um órgão interno. Administração parenteral assim inclui, mas não é limitada a, administração de uma composição farmacêutica por injeção da composição, por aplicação da composição através de uma incisão cirúrgica, por aplicação da composição através de um ferimento não cirúrgico de penetração no tecido, e semelhantes. Em particular, administração parenteral é contemplada como incluindo, mas não se limitando a, injeção ou infusão subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intrasternal, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretal, intracranial, intratumoral, e intrassinovial; e técnicas de infusão dialítica de rim. Perfusion regional é também contemplada. Concretizações preferidas podem incluir as rotas intravenosa e subcutânea.

[00119] Formulações de uma composição farmacêutica para a administração parenteral tipicamente compreendem o ingrediente ativo combinado com um veículo farmaceuticamente aceitável, tal como água estéril ou solução salina isotônica estéril. Tais formulações podem ser preparadas, embaladas ou vendidas em uma forma adequada para administração bolus ou para administração contínua. Formulações injetáveis podem ser preparadas, embaladas ou vendidas em uma forma de dosagem unitária, tais como ampolas ou recipientes de múltiplas doses contendo um preservativo. Formulações para a administração parenteral incluem, mas não são limitadas a, suspensões,

soluções, emulsões em veículos aquosos ou oleosos, pastas, e semelhantes. Tais formulações podem ainda compreender um ou mais ingredientes adicionais incluindo, mas não se limitando a, agentes de suspensão, de estabilização ou de dispersão. Em uma concretização de uma formulação para a administração parenteral, o ingrediente ativo é provido em uma forma seca (isto é, pó ou granular) para reconstituição com um veículo adequado (por exemplo, água livre de pirogênico estéril) antes da administração parenteral da composição reconstituída. Formulações parenterais também incluem soluções aquosas que podem conter excipientes tais como sais, carboidratos e agentes de tamponamento (por exemplo, um pH de desde 3 a 9), mas, para algumas aplicações, elas podem ser mais adequadamente formuladas como uma solução não aquosa estéril ou como uma forma seca para ser usada em combinação com um veículo adequado tal como água livre de pirogênio, estéril. Formas de administração parenteral exemplar incluem soluções ou suspensões em soluções aquosas estéreis, por exemplo, solução de propileno glicol aquoso ou de dextrose. Tais formas de dosagem podem adequadamente ser tamponada, se desejado. Outras formulações parenteralmente administráveis que são úteis incluem aquelas que compreendem o ingrediente ativo na forma microcristalina, ou em uma preparação lipossomal. Formulações para a administração parenteral podem ser formuladas como tendo liberação imediata e/ou modificada. Formulações de liberação modificadas incluem liberação atrasada, sustentada, pulsada, controlada, direcionada e programada.

[00120] Em algumas concretizações, o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da presente invenção pode ser administrado a 40, 20, ou 15 mg/kg ou menos (tal como 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 mg/kg). Em algumas outras concretizações, as doses podem ser de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, ou 0,5

mg/kg. A frequência de administração dosada pode ser, por exemplo, diária, a cada dois, três, quatro ou cinco dias, semanalmente, bimensalmente, ou trissemanalmente, mensalmente, bimensalmente, a cada três meses, a cada seis meses, ou a cada doze meses, ou quando necessário. O anticorpo pode ser administrado por rota intravenosa (por exemplo, infusão intravenosa no período de 0,5-8 horas), subcutaneamente, intramuscularmente, ou qualquer outra rota de administração que é apropriada para a condição e a formulação de fármaco.

Concretizações Exemplares

[00121] Outras concretizações particulares da presente invenção são descritas como se segue.

1. Um anticorpo, ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo uma cadeia pesada, uma cadeia leve, e um ou mais peptídeos de (poli-D) de poliaspartato ligado(s) à (i) cadeia pesada, (ii) o C-terminal da cadeia leve, ou (iii) ambas (i) e (ii).

2. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 1, em que os um ou mais poli-D peptídeos estão ligados a o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno por conjugação química.

3. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 2, em que os um ou mais poli-D peptídeos são conjugados à cadeia pesada na região de dobradiça ("hinge região").

4. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 2 ou 3, em que os um ou mais poli-D peptídeos são conjugados ao anticorpo ou ao fragmento de ligação de antígeno por um espaçador de polietileno glicol (PEG).

5. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 1, compreendendo um poli-D peptídeo integral com uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada ou a cadeia leve.

6. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da

concretização 5, compreendendo um poli-D peptídeo integral com o N-terminal da cadeia pesada.

7. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 5, compreendendo um poli-D peptídeo integral com o C-terminal da cadeia pesada.

8. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 5, compreendendo um primeiro poli-D peptídeo integral com o N-terminal da cadeia pesada e um segundo poli-D peptídeo integral com o C-terminal da cadeia pesada.

9. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 5-8, compreendendo um poli-D peptídeo integral com o C-terminal da cadeia leve.

10. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 5-9, em que o(s) poli-D peptídeos são fundidos à cadeia pesada ou à cadeia leve via um ligante de peptídeo.

11. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 10, em que o ligante de peptídeo compreende de 1-3 repetições da sequência de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO: 9).

12. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações precedentes, em que os um ou mais poli-D peptídeos cada um independentemente compreendem de 2 - 30 resíduos de ácido aspártico.

13. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 12, em que os um ou mais poli-D peptídeos cada um compreendem 10 resíduos de ácido aspártico (SEQ ID NO: 1).

14. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações precedentes, em que o anticorpo é uma IgG.

15. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da

concretização 15, em que o anticorpo é uma IgG₁ ou IgG₄.

16. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações precedentes, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno especificamente se liga a um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3.

17. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 16, em que o anticorpo compreende as regiões determinantes de complementaridade (CDR) de cadeia pesada de 1-3 na SEQ ID NO: 13 e de cadeia leve CDR1-3 na SEQ ID NO: 15.

18. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 17, em que o anticorpo compreende um domínio variável de cadeia pesada (V_H) sequência de aminoácidos que corresponde a resíduos 1-120 de SED ID NO: 13 e um domínio variável de cadeia leve (V_L) sequência de aminoácidos que corresponde a resíduos 1-108 de SEQ ID NO: 15.

19. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 17 ou 18, em que o anticorpo compreende uma região constante de IgG₄ de ser humano tendo uma prolina na posição 228 (numeração EU).

20. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 19, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada, e a cadeia leve do anticorpo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

21. O anticorpo da concretização 17, em que a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada, SEQ ID NO: 14 com ou sem a lisina imediatamente precedente a sequência de D10 C-terminal, SEQ ID NO: 16 com ou sem a lisina de C-terminal de cadeia pesada, ou SEQ ID NO: 17 com ou sem a lisina imediatamente prece-

dente a sequência de D10 C-terminal, e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 19, 21, ou 22.

22. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno da concretização 16, em que o anticorpo é um anticorpo de camundongo 1D11 tendo as sequências de aminoácidos de cadeia pesada e de cadeia leve SEQ ID NO: 2 com ou sem a lisina C-terminal e SEQ ID NO: 6, respectivamente.

23. Um anticorpo de IgG4 que liga TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3 de ser humano, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (com ou sem a lisina imediatamente precedente da sequência de D10 C-terminal), e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

24. Um anticorpo de IgG4 que liga TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3 de ser humano, em que a cadeia pesada do anticorpo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (com ou sem a lisina imediatamente precedente da sequência de D10 C-terminal), e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

25. O anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações precedentes, em que o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno exibe pelo menos um aumento de duas vezes na localização para o osso em comparação com um anticorpo com a mesma cadeia pesada e cadeia leve mas carecendo o(s) poli-D peptídeos.

26. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações precedentes e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

27. Um método para o tratamento de um indivíduo com

uma a condição óssea que se beneficia da TGF β , compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo de anti-TGFbeta ou fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das reivindicações de 16-25.

28. O método da concretização 27, ainda compreendendo detecção de pelo uma de (1) uma redução em níveis de TGF β , (2) uma redução em atividade de TGF β , (3) uma redução em perda óssea, (4) uma redução em taxa de perda óssea, (5) um aumento na densidade óssea, (6) um aumento na resistência óssea, e (7) uma redução em níveis de IL-11.

29. Um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 16-25 para o uso no tratamento de um indivíduo com uma a condição óssea que se beneficia da TGF β .

30. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 16-25 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo com uma a condição óssea que se beneficia da TGF β .

31. O método da concretização 27, o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno para o uso da concretização 29, ou o uso da concretização 30, em que o indivíduo é um ser humano.

32. O método, anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno para o uso, ou uso da concretização 31, em que o ser humano tem osteogênese imperfeita.

33. O método, anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno para o uso, ou uso da concretização 31, em que o ser humano tem perda óssea ou osteoporose.

34. O método, anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno para o uso, ou uso da concretização 31, em que o ser humano tem uma doença de rim crônica.

35. O método, anticorpo ou fragmento de ligação de anti-

geno para o uso, ou uso da concretização 31, em que o ser humano é um paciente com câncer com metástase óssea.

36. Uma molécula de ácido nucleico isolada, compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a cadeia pesada, a cadeia leve, ou ambas, do anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 1-25.

37. Um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada da concretização 36.

38. Uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão da concretização 37.

39. A célula hospedeira da concretização 38, em que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

40. Um método de produção de um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 1-25, o método compreendendo:

prover uma célula hospedeira compreendendo uma primeira e uma segunda sequência de nucleotídeos que codificam a cadeia pesada e cadeia leve, respectivamente, do anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno,

desenvolver a célula hospedeira sob condições que permitem a produção do anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno, e

recuperar o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno.

41. O método da concretização 40, em que a primeira sequência de nucleotídeos compreende SEQ ID NO: 23, 24, 25, ou 26 (com ou sem o códon para a lisina de C-terminal de cadeia pesada), e a segunda sequência de nucleotídeos compreende SEQ ID NO: 27, 29, 31, ou 32.

42. Um método de produção de um anticorpo de direcionamento ósseo ou fragmento de ligação de antígeno, compreendendo:

prover um anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo e um ou mais poli-D peptídeos, e

ligar os poli-D peptídeos ao anticorpo através de uma ligação covalente por conjugação química.

43. O método de qualquer uma das concretizações de 40-42, ainda compreendendo formulação do anticorpo ou do fragmento de ligação de antígeno como uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável.

44. Um método de produção de uma composição farmacêutica de direcionamento ósseo, compreendendo:

prover um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de qualquer uma das concretizações de 1-25, e

misturar o anticorpo ou do fragmento de ligação de antígeno com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00122] A invenção será ainda descrita nos seguintes exemplos, que não limitam o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

EXEMPLOS

[00123] Os Exemplos que seguem são ilustrativos das concretizações específicas da invenção, e vários seus usos. Eles são indicados para as finalidades explanatórias apenas e não devem ser tomadas como limitantes da invenção.

Anticorpo de TGF β

[00124] Um primeiro anticorpo de anti-TGF β , chamado aqui de mAb1, é um anticorpo monoclonal de IgG1 de camundongo específico para TGF- β 1, TGF- β 2, e TGF- β 3 de ser humano ("pan-específico") e está disponível de R&D Systems (Clone# 1D11, Minneapolis, MN). O anticorpo mAb1 serviu como um modelo nos exemplos.

[00125] Um segundo anticorpo de anti-TGF β , chamado aqui de mAb2, usado nos exemplos é um anticorpo de anti-TGF β IgG4 com uma mutação de dobradiça ("hinge mutation") S228P (numeração EU).

O anticorpo mAb2 é similar a anticorpos revelados na patente U.S. No. 9.090.685, que é incorporado por referência. Anticorpo mAb2 tem um peso molecular estimado de 144 KD quando não glicosilado. Suas sequências de aminoácidos de cadeia pesada e cadeia leve são SEQ ID NOS: 13 e 15, respectivamente. Estas duas sequências são mostradas abaixo. Domínios variáveis são em itálicos, e são designados aqui o domínio variável de cadeia pesada (HCVD, SEQ ID NO: 39) e domínio variável de cadeia leve (LCVD, SEQ ID NO: 40). CDRs são mostrados em caixas e são designados região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1, SEQ ID NO: 33); HCDR2 (SEQ ID NO: 34); e HCDR3 (SEQ ID NO: 35), e região de determinação de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1, SEQ ID NO: 36); LCDR2 (SEQ ID NO: 37); e LCDR3 (SEQ ID NO: 38). O sítio de glicosilação no domínio constante da cadeia pesada está em negrito (N297).

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYTFS	SNVIS WVRQA
PGQGLEWMGG	VIPIVDIANY		
AQRFKGRVTI	TADESTSTTY	MELSSLRSED	TAVYYCASTL
GLVLDAMDY	W GQGTLTVSS		
ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS
WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS		
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES
KYGPPCPCCP	APEFLGGPSV		
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVVDVSQED	PEVQFNWYVD
GVEVHN	AKTK PREEQFNSTY		
RVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK
GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK		
NQVSLTCLVK	GFYP PSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPPVLDs
DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG		

NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 13)

ETVL TQSPGT LSLSPGERAT LSC RASQSLG SSYLA WYQQK
 PGQAPRLLIY GASSRAP GIP
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG
 QGTRLE/KRT VAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS
 QESVTEQDSK DSTYSLSSL
 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGE C (SEQ ID NO:
 15)

[00126] Como descrito aqui, outros anticorpos, fragmentos de anticorpo, proteínas, ou peptídeos que ligam proteínas envolvidas na formação óssea ou na manutenção óssea podem ser usadas.

Exemplo 1: Preparação de conjugados químicos de D10 peptídeo com anticorpo de mAb1 α-TGFβ

[00127] Conjugados químicos de D10 peptídeo do anticorpo de α-TGFβ mAb1 foram preparados do modo mostrado na FIG. 2. mAb1 (2,0 mg) foi trocado em tampão de borato desgaseificado (cloreto de sódio a 25 mM, DTPA a 1 mM, borato de sódio a 20 mM pH 8,0) por três rodadas de ultrafiltração sobre filtros centrífugos Amicon® Ultra 50 kDa MWCO (EMD Millipore). Os dissulfetos de região de dobradiça foram então reduzidos com 12 mol:mol ditiotreitol (DTT) per mAb por 2 h a 37°C. O produto foi dessalinizado sobre um filtro de 4 mL Amicon® Ultra com tampão de borato desgaseificado. Alíquotas (1 nmol, 150 µg) foram reagidas a 25°C com quantidades crescentes (de 1-15 mol:mol) de D10-maleimida peptídeo (Ac-D10-C2-PEG12-C6-maleimida, onde PEG12 consiste de um PEG de comprimento definido contendo 12 grupos de óxido de etileno). Depois de 1,5 h, grupos de tiol não reagidos restantes foram bloqueados pela adição de 12 equi-

valentes de N-etilmaleimida seguido por incubação por 1,5 h. Os produtos foram dessalinizados por ultrafiltração. A FIG. 3A mostra SDS-PAGE de 0,5 µg de cada produto em um gel de 4-12% de NuPAGE manchado com SimplyBlue® (Thermo Scientific) e formado imagem por um scanner IV próximo Odyssey® (LiCor). Os perfis de fluorescência de raia foram integrados usando software AlphaView (ProteinSimple Corp.) e a razão de peptídeo para anticorpo (PAR) determinada. Deslocamento pequeno na mobilidade em cada cadeia pesada ou cadeia leve foi admitida a representar a adição de um único D10 peptídeo que é consistente com o máximo de 5 tiras identificáveis para a cadeia pesada e 1 para a cadeia leve e emparelha o número de cisteínas de região de dobradiça para cada. O número médio de peptídeos na cadeia pesada e cadeia leve foi separadamente calculado a partir da soma do produto da abundância relativa de cada tira menor vezes seu número de peptídeo designado. PAR foi calculada a partir da soma daqueles números oriundos das cadeias leve e pesada duas vezes como cada cadeia seja representada duas vezes na IgG inteira. O valor de PAR vs. a razão de peptídeo-maleimida:mAb na reação de conjugação química é mostrada na FIG. 3B que mostra um aumento linear na PAR com número crescente de peptídeos conjugados até 8 moles/mol.

Exemplo 2: Ligação de conjugados químicos mAb1-D10 a TGF-β1 [00128] Neste exemplo, um conjunto de conjugados químicos de variação de PAR foi preparado na mesma forma como descrito no Exemplo 1 exceto que a razão de DTT foi variada de 8-10 mol/mol e a maleimida-peptídeo:mAb ou foi 3 ou 15 mol/mol. Como um controle, um conjugado químico de IgG1 de ser humano (Herceptin®) foi preparado por redução de seus dissulfetos de dobradiça ("hinge") por 3 mol/mol tris(2-carboxietilfosfina) (TCEP) por 2 h 37°C sob argônio seguido por reação com 15 mol/mol maleimida-peptídeo de um dia para o outro a 25°C e foi purificado por dessalinização usando ultrafiltração.

[00129] Para avaliar sua capacidade de ligar TGF- β 1, os conjugados químicos foram misturados com TGF- β 1 em uma razão molar de 1:1 seguido por cromatografia de exclusão por tamanho em Superdex 200 (G.E. Healthcare) na solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH 7,2. O conjugado químico mAb1-D10 sozinho forneceu a pico um tanto heterogêneo eluindo-se mais cedo do que mAb1 não modificado como mostrado na FIG. 4A, que é provável devido a efeitos de carga produzidos pelos conjugados de peptídeos. Adição de TGF- β 1 ao conjugado produziu um pico de eluição mais cedo do que ou mAb1 ou o conjugado químico mAb1-D10, indicando formação de um complexo de peso molecular mais alto (FIG. 4B). Similarmente, adição de TGF- β 1 a anticorpo mAb1 não modificado produziu um deslocamento para um tempo de retenção anterior (FIGS. 4C, 4D). Em contraste com isso, embora conjugação química de D10 a Herceptin® causou um deslocamento no tempo de retenção do anticorpo sozinho como com o conjugado mAb1 (FIGS. 4E, 4F), adição de TGF- β 1 (1 mol:mol) ao conjugado de Herceptin®-D10 não conseguiu produzir qualquer mudança em seu tempo de eluição ou MW (FIGS. 4F, 4G) indicando ligação ao conjugado não ocorreu como uma consequência da conjugação.

Exemplo 3: Ligação dependente de peptídeo de um conjugado químico mAb1-D10 a hidroxipatita

[00130] Neste exemplo, um conjugado químico de D10 com mAb1, tal como mostrado na FIG. 2, foi produzido por redução de os dissulfetos de região de dobradiça com 12 eq DTT em NaCl a 25 mM, DTPA a 1 mM, borato de sódio a 20 mM pH 8 por 2 h a 37°C seguido por reação com de 2 moles/mol de 2,2'-dipiridil dissulfeto (Sigma) para converter uma porção dos tiois livres de volta para dissulfetos. Isso foi seguido por reação com D10-maleimida peptídeo descrito no Exemplo 1. O produto final foi purificado por ultrafiltração. Uma porção (25 μ g)

foi trocada em fosfato de sódio a 5 mM pH 7,4 sobre uma coluna de rotação e foi cromatografada sobre uma coluna de 100 µL de hidroxipatita de cerâmica (CHT) tipo II (BioRad) e foi eluída com um gradiente de fosfato de sódio a 5-500 mM pH 7,4 a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. mAb1 não modificado foi usado como um controle. O perfil de coluna A₂₈₀ é mostrado na FIG. 5A. mAb1 mostrou apenas traço que se liga à coluna enquanto que cerca da metade do conjugado é ligado e é eluído em volta do fosfato a 0,2 M. Frações foram concentradas e foram analisadas por SDS-PAGE (FIG. 5B). A fração não ligada (material escoável de ou "FT") mostrou a maior parte de mAb não modificado enquanto que o conjugado continha o pico 4 de dobradiça ("hinge") com uma PAR estimada de 6 por SDS-PAGE.

Exemplo 4: Efeito de uma faixa de carregamento de peptídeo na ligação à hidroxipatita

[00131] Neste exemplo, uma série de conjugados químicos D10 peptídeo com números variáveis de peptídeos descritos no Exemplo 1 foi cromatografado em uma coluna de tipo II de CHT como descrito no Exemplo 3. Os perfis de A₂₈₀ e um diagrama da fração de conjugado ligada e os tempos de retenção de pico são mostrados na FIG. 6A. Como visto na FIG. 6B, a quantidade de conjugado ligado à coluna aumentou até PAR 3.8, é nivelado, e começou a diminuir com um número maior de peptídeos. Em contraste com isso, o tempo de retenção do conjugado (indicando a resistência da interação) com a resina aumentada com número crescente de peptídeos até 9.

Exemplo 5: Efeito de conjugação química D10 peptídeo a mAb1 em sua potência na neutralização de TGF-β1 *in vitro*

[00132] Neste exemplo, um conjunto de três conjugados mAb1-D10, tal como mostrado na FIG. 2, foi preparado como descrito no Exemplo 1. Um conjugado de controle foi preparado por omissão do D10-maleimida peptídeo durante a conjugação. Por análise de SDS-

PAGE, tal como mostrado na FIG. 3, o carregamento de peptídeo (PAR) foi determinado como sendo 0, 5 ou 9 para esses três conjugados. A capacidade desses conjugados para inativar TGF- β 1 foi então determinada por co-incubação com TGF- β 1 por 1 h. Diluições em série no meio de crescimento foram então aplicadas a células de A549 de ser humano que expressam ao receptor de TGF- β 1 de ser humano seguido por incubação de um dia para o outro. A resposta celular a TGF- β 1 ativo foi então determinada por liberação de IL-11 no meio de crescimento, que foi detectado por um ensaio de ELISA específico para IL-11. A resposta de IL-11 para os três conjugados e um controle mAb1 é mostrado na FIG. 7. Em todos os casos, a metade de inibição máxima de liberação de IL-11 (EC_{50}) ocorreu em volta do anticorpo de 0,1 nM. Tanto conjugados (PAR=5 e PAR=9) quanto o conjugado de imitação que carecem de peptídeo (PAR=0) mostravam inibição levemente melhor do que mAb1. O número de conjugados de peptídeos não tinha nenhum efeito na EC_{50} .

Exemplo 6: Efeito de D10 peptídeo conjugado na distribuição de mAb1 administrado a camundongos

[00133] Um conjugado químico D10-mAb1 foi preparado em uma forma similar como descrito no Exemplo 1, tal como mostrado na FIG. 2. mAb1 (19,6 mg) foi trocado em tampão de borato desgaseificado, foi reagido com 10,6 eq (1,06 μ moles) de DTT por 1,5 h a 37°C seguido por reação sem troca de tampão com 6 eq D10 peptídeo (Ac-D10-C2-PEG12-C6-maleimida) sob argônio por 1,5 h a 25°C. Tios livres não conjugados foram bloqueados por adição de 12 eq de N-etylmaleimida seguido por incubação por 30 min a 25°C. O produto final foi purificado por ultrafiltração. A razão de peptídeo para anticorpo foi determinada usando SDS-PAGE (PAR~4.8). A cadeia leve mostrou quantidades em traço de uma tira que corresponde à adição de um único peptídeo a um resíduo de cisteína de cadeia leve.

[00134] O conjugado e controle de anticorpo mAb1 foram separadamente marcados com AlexaFluor® 750 (Thermo Fisher) usando condições como descrito pelo fabricante. Os artigos de teste fluorescentes foram administrados a camundongos sem pelo SKH-1 que foram registrados em imagem com um instrumento IVIS (Perkin Elmer) imediatamente após a administração (de 0,3-1 h), e depois de 4 h, e 1, 2, 3, 4, 7, 8, e 9 dias. As imagens de camundongos injetados com 1 mg/kg de mAb1 marcado e conjugado são mostrados na FIG. 8A. A fluorescência de mAb1 marcado foi uniformemente distribuída através de todo o corpo, e este padrão foi mantido mas diminuído na intensidade no período de 9 dias. Em contraste com isso, depois de 1 dia o conjugado mAb1-D10 foi concentrado a ou próxima a linha média dorsal, membros e rabo, consistente com a localização do osso mas estava em níveis quase indeetectáveis em outro lugar no corpo. Consistente com as imagens da FIG. 8A, razões de fluorescência de fêmur distal em comparação com fluorescência do coração medidas nas faixas da FIG. 8A eram significativamente elevadas ($P < 0,05$) para o conjugado mAb1-D10 em comparação com o controle por 24 h e permaneciam significativamente elevadas através de 168 h (vide FIG. 8B). Esta distribuição foi mantida no período de 9 dias com apenas uma mudança menor na intensidade.

Exemplo 7: Preparação de variantes de fusão de anticorpo de anti-TGF β -D10 de camundongo recombinante

[00135] Um conjunto de variantes de fusão de anti-TGF β -D10 recombinante como mostrado nas FIGS. 9A e 9B foi preparado como descrito abaixo.

Construtos de vetor de expressão de cadeia leve e pesada

[00136] Um painel de plasmídeos para a expressão de níveis de cadeia pesada e leve de mAb1 com D-10 peptídeos a várias posições foi gerado. Além disso, dois plasmídeos foram também gerados para

cadeia leve e pesada de mAb1 de tipo selvagem sem D10 peptídeos. Todas as sequências otimizadas com códon foram geradas sinteticamente (GeneArt), foram flanqueadas com sítios de enzima de restrição apropriados projetados em quadro para a finalidade de clonagem. Três fragmentos de genes, que codificam regiões constantes de IgG1 de camundongo com ou sem D-10 peptídeos C-terminais e cadeia leve completa de tipo selvagem de mAb1, foram克隆ados em um vetor de expressão de mamífero episomal vazio pFF, um análogo do vetor pTT descrito por Durocher e outros, (2002, *Nucl. Ácidos Res.* 30(2): E9) para criar "mlgG1_CH123_pFF", "mlgG1_CH123D10_pFF," e "mAb1_VLCL_pFF" usando enzimas de restrição ApaLI/HindIII e ligação subsequente. Fragmentos de genes que codificam regiões variáveis com ou sem D10 peptídeo N-terminal foram克隆ados nos vetores usando ApaLI/EagI para as cadeias pesada e ApaLI/Mfcl para a cadeia leve. Fragmentos de genes que codificam a região constante da cadeia leve de Ig kappa de camundongo com D10 C-terminal e diferentes comprimentos de espaçador de G4S (SEQ ID NO: 9) foram克隆ados em "mAb1_VLCL_pFF," usando Mfcl/HindIII para substituir a região constante de tipo selvagem. Sequência de DNA correta esperada de cada construto foi confirmada por sequenciação de DNA (ACGT, Inc.).

Expressão e montagem de variante de fusão

[00137] As variantes de fusão foram produzidas por seleção de cada um dos vetores de cadeia pesada e cadeia leve para cotransfecção a fim de fornecer as variantes de fusão e um controle de não peptídeo como descrito na Tabela 1. "PAR" (razão de peptídeo para anticorpo) reflete o número total de peptídeos esperado como sendo anexos para o anticorpo final expresso tanto nas cadeias pesada quanto leve. Variante de fusão ID "mAb1 F1" representa um construto de "tipo selvagem" ("wt") que é substancialmente idêntico à sequência de mAb1

sem modificação. "HC" indica a cadeia pesada de mAb1, "LC" indica a cadeia leve de mAb1, "D10" indica o D10 peptídeo (SEQ ID NO: 1), e "G4S" indica uma sequência espaçadora que consiste de gly-gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 9) incorporado em alguns construtos.

Tabela 1 Variantes de fusão recombinantes de mAb1 com D10

Variante ID	Construto de cadeia pesada	SEQ ID NO:	Construto de cadeia leve	SEQ ID NO:	PAR
mAb1 F1	HC	2	LC	6	0
mAb1 F2	HC	2	D10-LC	7	2
mAb1 F3	HC	2	LC-D10	8	2
mAb1 F4	HC	2	LC-(G4S)-D10	11	2
mAb1 F5	HC	2	LC-(G4S) ₂ -D10	12	2
mAb1 F6	HC-D10	3	LC	6	2
mAb1 F7	HC-D10	3	D10-LC	7	4
mAb1 F8	HC-D10	3	LC-D10	8	4
mAb1 F9	HC-D10	3	LC-(G4S)-D10	11	4
mAb1 F10	HC-D10	3	LC-(G4S) ₂ -D10	12	4
mAb1 F11	D10-HC	4	LC	6	2
mAb1 F12	D10-HC	4	D10-LC	7	4
mAb1 F13	D10-HC	4	LC-D10	8	4
mAb1 F14	D10-HC	4	LC-(G4S)-D10	11	4
mAb1 F15	D10-HC	4	LC-(G4S) ₂ -D10	12	4
mAb1 F16	D10-HC-D10	5	LC	6	4
mAb1 F17	D10-HC-D10	5	D10-LC	7	6
mAb1 F18	D10-HC-D10	5	LC-D10	8	6
mAb1 F19	D10-HC-D10	5	LC-(G4S)-D10	11	6
mAb1 F20	D10-HC-D10	5	LC-(G4S) ₂ -D10	12	6

[00138] Para avaliar a capacidade das variantes de fusão recombinantes desejadas de ser expressa, dezesseis variantes oriundas da Tabela 1 foram avaliadas por cotransfecção em células de Expi293F^R (Life Technologies) usando condições como descrito pelo fabricante. Depois de 4 dias, expressão foi determinada por SDS-PAGE de meio

condicionado. Todas as variantes foram expressas a níveis estimados como estando entre 10 - 30 µg/mL. Níveis levemente mais altos foram observados depois de 5 e 7 dias mas níveis de expressão eram dependentes da variante. TS (mAb1 F1), HC-D10:LC-D10 (mAb1 F8), e HC-D10: LC-G4S-D10 (mAb1 F9) mostravam particularmente alta expressão, enquanto D10-HC:D10-LC (mAb1 F12) expressos pobremente.

Expressão em escala maior

[00139] Todas as vinte variantes de fusão mAb1-D10 recombinantes foram expressas em células de Expi293-F em escala de 30 mL. Meios condicionados (CM) foram coletados no dia 6 e níveis de expressão foram avaliados por não redução de SDS-PAGE. Níveis um pouco mais altos de expressão (de 30-150 µg/ml) foram observados em comparação com a avaliação inicial, mas os níveis de expressão relativos eram consistentes com as transfecções de escala menor.

Exemplo 8: Caracterização de variante de fusão mAb1-D10 Recombinante

Nível de expressão e ligação de TGF- β 1

[00140] Quantificação do nível de expressão e a capacidade de variantes de fusão mAb1-D10 recombinante para ligar TGF- β 1 foram avaliadas usando um Octet® QK384. Biossensores Octet® para IgG de camundongo foram mergulhados em meio condicionado diluído a 1:10 no diluente de amostra (PBS, pH 7,4 contendo 0,01% de BSA e 0,02% de Tween 20) ou 2 vezes diluições em série de um padrão de mAb1 purificado sobre a faixa de 1,25 a 100 µg/mL. Dados de ligação foram coletados por 2 min embora agitando as amostras a 500 rpm. Títulos foram calculados usando um ajuste de 4 parâmetros das taxas de ligação iniciais e comparação com aqueles obtidos a partir dos padrões. Os biossensores foram então lavados com diluente por 1 min para remover qualquer meio e reestabelecer uma linha de base e en-

tão foram mergulhados em cavidades contendo TGF- β 1 a 40 nM por 3 min a 1000 rpm para seguir ligação. Isto foi seguido por uma etapa de dissociação por transferência dos sensores para diluir por 3 min a 1000 rpm. Como visto na Tabela 2, as concentrações para as variantes de fusão nos meios variavam de 11 a 178 μ g/mL ("Octet Conc.") e em geral tendências combinadas observadas por SDS-PAGE ("Nível de expressão"). Além disso, todas as variantes de fusão foram capazes de ligar TGF- β 1, sugerindo a presença de D10 peptídeo em qualquer uma das posições indicada não seriamente afetou ligação de antígeno.

Ligação de FcRn de camundongo

[00141] Ligação de FcRn de camundongo pelas variantes de fusão mAb1-D10 recombinantes foi avaliada usando um Octet QK384. Todas as etapas foram realizadas a 1000 rpm. Meio condicionado diluído para conseguir uma concentração de anticorpo de 10 μ g/mL foi contatado por biossensores de IgG Fv de anti-camundongo por 5 minutos. Os biossensores foram então mergulhados em PBSP pH 6,0 (fosfato de sódio a 50 mM pH 6,0, cloreto de sódio a 150 mM, 0,005% de tensioativo P20) para estabelecer uma linha de base. Os sensores foram então transferidos para cavidades contendo FcRn de camundongo solúvel diluído a 1 μ M em PBSP pH 6,0 por 3 min seguido por 3 min de dissociação em cavidades contendo PBSP pH 6,0. Como indicado na Tabela 2, todas as variantes ligaram FcRn de camundongo.

Ligação de proteína G

[00142] Ligação pelas variantes de fusão mAb1-D10 recombinante a proteína G foi avaliada usando um Octet QK384. Biossensores de proteína G foram mergulhados nas cavidades contendo meio condicionado diluído a 10 μ g/mL de anticorpo no diluente de amostra e sinal seguido por 3 min a 1000 rpm. Como indicado na Tabela 2, todas as variantes ligavam proteína G.

Tabela 2 Caracterização de variantes de fusão mAb1-D10

Variante ID	Cadeia pesada	Cadeia leve	PA R	Conc. de Octet®, (µg/mL)	Nível de expressão	Ligaçao de TGF-β1	Ligaçao de FcRn de camundongo	Ligaçao de proteína G
mAb1 F1	wt-HC	wt-LC	0	85	++	+	+	+++
mAb1 F2	wt-HC	D10-LC	2	53	++	+	+	++
mAb1 F3	wt-HC	LC-D10	2	50	++	+	+	+
mAb1 F4	wt-HC	LC-(G4S)-D10	2	52	++	+	+	+
mAb1 F5	wt-HC	LC-(G4S) ₂ -D10	2	34	+	+	+	+
mAb1 F6	HC-D10	wt-LC	2	178	++++	+	+	++
mAb1 F7	HC-D10	D10-LC	4	46	+	+	+	++
mAb1 F8	HC-D10	LC-D10	4	117	+++	+	+	+
mAb1 F9	HC-D10	LC-(G4S)-D10	4	156	++++	+	+	+
mAb1 F10	HC-D10	LC-(G4S) ₂ -D10	4	100	+++	+	+	+
mAb1 F11	D10-HC	wt-LC	2	36	+	+	+	++
mAb1 F12	D10-HC	D10-LC	4	11	+	+	+	++
mAb1 F13	D10-HC	LC-D10	4	36	+	+	+	+
mAb1 F14	D10-HC	LC-(G4S)-D10	4	34	+	+	+	+
mAb1 F15	D10-HC	LC-(G4S) ₂ -D10	4	27	+	+	+	+
mAb1 F16	D10-HC-D10	wt-LC	4	36	+	+	+	++
mAb1 F17	D10-HC-D10	D10-LC	6	23	+	+	+	++
mAb1 F18	D10-HC-D10	LC-D10	6	31	+	+	+	+
mAb1 F19	D10-HC-D10	LC-(G4S)-D10	6	40	+	+	+	+
mAb1 F20	D10-HC-D10	LC-(G4S) ₂ -D10	6	28	+	+	+	+

SDS-PAGE

[00143] Construto de TP purificado e variantes de fusão recombinantes mAb1 F2, mAb1 F6, mAb1 F7, mAb1 F11, mAb1 F12, mAb1 F16, e mAb1 F17 foram analisados nos géis de 4-20% de Tris-Glicina SDS-PAGE (Novex, Life Sciences) sob condições de redução e de não

redução e foram manchados com Coomassie Azul. Uma imagem clara visível coletada por um formador de imagem de ProteinSimple® é mostrado na FIG. 10. Uma pequena redução na mobilidade da cadeia pesada e/ou cadeia leve foi observada que foi emparelhada a presença esperada e número de D-10 peptídeos em cada. Impurezas e agregados covalentes não eram detectáveis.

Estabilidade térmica por fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

[00144] Estabilidades térmicas de várias variantes de fusão mAb1-D10 recombinante que representam todas as possíveis combinações de D-10 peptídeos nos terminais nas cadeias leve e pesada foram determinadas por fluorimetria de varredura diferencial usando SYPRO® Orange (Thermo Scientific) como um corante repórter. É em geral aceito que a estabilidade de proteínas a temperatura mais alta é pre-vista de sua estabilidade sob condições de armazenagem típicas e assim pode ser usada para avaliar sua adequabilidade para a fabricação e uso como produtos terapêuticos. Estabilidade térmica pode ser avaliada com corantes que exibem um aumento na fluorescência na ligação de regiões hidrofóbicas exposta por desdobramento da estrutura de proteína nos instrumentos de PCR em tempo real (Lo e outros, 2004, *Anal. Biochem.* 332(1): 153-9). A fluorescência de amostras (10 µL a 0,5 mg/ml de proteína) contendo uma diluição de 1:1000 de SYPRO® Orange foi seguido enquanto se elevando a temperatura em um sistema de detecção de PCR de tempo real de CFX96. Dados foram analisados usando CFX Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories). A FIG. 11 mostra a taxa de mudança da fluorescência com temperatura para várias variantes. A taxa de mudança é tipicamente usada ao invés de fluorescência absoluta a fim de separar a ligação de corante a porções da estrutura de proteína que são não afetadas por transições estruturais. Um deslocamento negativo reflete um aumento na taxa de mudança de fluorescência e um mínimo representa o ponto central da

transição para um estado não dobrado ("Tm"). Várias das variantes testadas (mAb1 F6, mAb1 F11, mAb1 F16) mostravam perfis de Tm indistinguíveis do controle de anticorpo não modificado ("WT" = mAb1 F1). Dois outros (mAb1 F2 e mAb1 F7) mostravam uma diminuição significativa na Tm para a transição principal. Duas variantes (mAb1 F12 e mAb1 F17) mostravam os menores valores de Tm. Notavelmente, todas as quatro variantes de fusão mAb1-D10 recombinantes contendo um D10-peptídeo no N-terminal da cadeia leve mostraram uma diminuição significativa em Tm que sugere colocação do peptídeo nesta posição no anticorpo mAb1 desestabiliza sua estrutura. De modo inverso, colocação do D10 peptídeo em qualquer terminal da cadeia pesada não se correlacionou com qualquer mudança em Tm. Os valores de Tm das transições predominantes para várias variantes de fusão observadas como mostrados na FIG. 11 são tabulados na Tabela 3.

Tabela 3 Fluorimetria de varredura diferencial de variantes de fusão recombinantes expressas

Variante ID ^A	(5'- HC-3'): (5'-LC-3')	PAR	Tm
mAb1 F1 ^B	WT	0	72,5
mAb1 F2	WT-HC:D10-LC	2	64,0
mAb1 F6	HC-D10:WT-LC	2	72,3
mAb1 F7	HC-D10:D10-LC	4	64,0
mAb1 F11	D10-HC: WT-LC	2	72,0
mAb1 F12	D10-HC: D10-LC	4	62,7
mAb1 F16	D10-HC-D10: WT-LC	4	72,0
mAb1 F17	D10-HC-D10: D10-LC	6	62,5

^A vide Tabela 2; ^B mAb1 F1 é uma versão recombinante de mAb1.

Exemplo 9: Potência de variantes de fusão mAb1-D10 recombinante na neutralização de TGF-β1 *in vitro*

[00145] A potência de variantes de fusão mAb1-D10 recombinante na neutralização de atividade de TGF-β1 foi determinada por inibição da secreção de IL-11 por células de tumor de A549 *in vitro* em resposta a TGF-β1 adicionado ao meio. O procedimento foi realizado como

descrito no Exemplo 3. Várias variantes de fusão representativas oriundas do Exemplo 7 foram selecionadas com base em sua afinidade para proteína G (como um indicador de sua facilidade de purificação). Os perfis de inibição de TGF- β 1 para oito variantes (mAb1 F1, mAb1 F2, mAb1 F6, mAb1 F7, mAb1 F11, mAb1 F12, mAb1 F16, e mAb1 F17) são mostrados nas FIGS. 12A e 12B. Todas as proteínas de fusão mostravam uma EC₅₀ similar como o controle mAb1.

Exemplo 10: Ligação de TGF- β 1 por variantes de fusão recombinantes

[00146] Variantes de fusão mAb1-D10 recombinantes do exemplo 7 foram também quantitativamente avaliadas quanto à ligação de TGF- β 1 usando ressonância de plasmônio de superfície (SPR) como detetada por Biacore®. Amostras contendo variantes purificadas foram passadas sobre um chip de sensor com TGF- β 1 acoplado a amina para determinar o equilíbrio constante, K_D. Um nível de imobilização alvo de menos do que 100 unidades de resposta (RU) de TGF- β 1 foi escolhido para minimizar o potencial para efeitos de avidez que surgem da ligação de moléculas de TGF- β 1 adjacente no chip. O nível de imobilização foi determinado pela mudança nas unidades de resposta depois da ativação de NHS/EDC da superfície de chip, mas antes do tratamento com quenching com etanolamina. As variantes de fusão, variante de fusão F1 de WT, e controle de mAb1 foram diluídos a 30, 10, 3, 1 e 0,37 nM em tampão de HBS-EP e passaram sobre o chip de TGF- β 1 a 30 μ L/min por 3 min, seguido por dissociação de 5 min no mesmo tampão. Entre runs, a superfície de chip foi regenerada para remover qualquer anticorpo ligado por passagem de duas injeções por 30 seg de HCl a 40 mM sobre o chip a uma taxa de fluxo de 75 μ L/min. Como mostrado na Tabela 4, as constantes de equilíbrio (K_D) para todas as variantes de fusão e o construto de WT (F1) estavam dentro de 2,4 vezes do controle de mAb1. Inesperadamente, o sinal máximo (RU)

eliciado pelas variantes de fusão diminuíram com número crescente de peptídeos, com variante F17 (D10-HC-D10/D10-LC, PAR=6) que mostra o sinal mais baixo. Isso é em contraste com o ensaio de potência de célula de A549 como descrito no Exemplo 9 que mostrou todas as variantes de fusão testadas como sendo comparáveis com ou mais potentes do que ou mAb1 ou o construto de WT na neutralização de TGF- β 1. Uma explicação possível deste declínio pode refletir repulsão eletroestática entre a matriz de chip (carboximetil dextrano) e os D10 peptídeos negativamente carregados.

Tabela 4 Constantes de equilíbrio para variantes de fusão mAb1-D10 que se ligam a TGF- β 1 por análise de Biacore

Variante ID ^A	Amostra	PAR	Faixa de conc. de ajuste cinético	$K_a(x10^5 M^{-1}s^{-1})$	$K_d(x10^{-3}s^{-1})$	TGF β 1 K _D (nM)
mAb1	mAb não modificado	0	90-3 nM	1,67	1,00	6,00
mAb1 F1	WT-HC: WT-LC	0	30-3 nM	3,38	0,85	2,51
mAb1 F2	WT-HC: D10-LC	2	90-3 nM	1,66	1,00	6,01
mAb1 F6	HC-D10: WT-LC	2	90-3 nM	1,82	0,84	4,58
mAb1 F7	HC-D10: D10-LC	4	90-3 nM	1,72	0,94	5,43
mAb1 F11	D10-HC: WT-LC	2	90-3 nM	1,64	0,92	5,62
mAb1 F12	D10-HC: D10-LC	4	90-3 nM	1,71	0,93	5,41
mAb1 F16	D10-HC-D10: WT-LC	4	90-3 nM	1,59	1,10	6,88
mAb1 F17	D10-HC-D10: D10-LC	6	90-3 nM	1,91	0,79	4,15

^A vide Tabela 2

Exemplo 11: Ligação de variantes de fusão mAb1-D10 recombinante à hidroxipatita

[00147] Variantes de fusão mAb1-D10 recombinante oriundas do Exemplo 7 foram também testados quanto a ligação de colunas de hidroxipatita de cerâmica (CHT) como descrito no Exemplo 3 para avali-

ar seu potencial para que se liguem à estrutura mineral de osso. Variantes de fusão mAb1-D10 recombinante (25 µg cada em fosfato de Na a 5 mM pH 7,4) foram aplicadas a uma coluna de 100 µL de hidroxiapatita (CHT tipo II, BioRad) e foram eluídas usando um gradiente de fosfato de Na⁺ a 0,005 a 0,5 M pH 7,4. Proteína na fase móvel eluindo-se a partir da coluna foi seguida por A₂₆₀. Um padrão (usualmente um conjugado mAb1-D10) foi realizado no início e no fim de cada conjunto de experiências para garantir consistência no desempenho de coluna. A FIG. 13 mostra os perfis A₂₆₀ para cada experiência. O tempo de retenção (TR) e a fração ligada são mostrados na Tabela 5 abaixo. Todas a não ser uma das variantes de fusão recombinantes foram ligadas quase quantitativamente mas mostraram diferenças de afinidade como refletido em seus tempos de retenção. A ordem de classificação de tempos de retenção não tinha boa correlação com o PAR, sugerindo um efeito significativo da localização de peptídeo sobre a ligação. Em particular, a ligação mais forte (TR mais alta) foi observada com a variante F7 (PAR4) ao passo que a variante F17 (PAR6) mostrou uma ligação levemente mais fraca. Uma variante (F6, PAR2) mostrou ligação mais fraca do que a maioria das variantes PAR4 mas significativamente melhor do que outras variantes PAR2 (F2 e F11). Uma variante (F2) com o peptídeo unicamente no N-terminal da cadeia leve mostrou ligação apenas fraca como refletido em seu TR e fração ligada (23%). O conjugado químico mAb1-D10 ("CC"; PAR~4) forneceu dois picos, com 84% eluindo-se a um TR mais cedo do que todas as variantes de fusão PAR4.

Tabela 5 Ligação de hidroxiapatita por variantes de fusão recombinantes mAb1-D10 e conjugados químicos

Variante ID ^A	Descrição	PAR	TR (min)
mAb1	MAb não modificado	0	Nd*
F7	HC-D10 / D10-LC	4	7,58
F16	D10-HC-D10 / wt LC	4	7,53

F17	D10-HC-D10 / D10-LC	6	7,44
F6	HC-D10 / wt-LC	2	7,07
CC ^B	<u>NA</u> ^C	4.8	6,57 (84% [†])
F12	D10-HC / D10-LC	4	6,27
F11	D10-HC / wt LC	2	5,39
F2	wt HC / D10-LC	2	5,17 (23%)

*nenhum detectado, [†]fração ligada (se < 100%); ^A vide Tabela 2;

^B conjugado químico mAb1-D10 (conjugado sobre cisteínas de região de dobradiça e cisteínas de cadeia leve C-terminais, vide FIG. 3A); ^C não aplicável.

Exemplo 12: Biodistribuição de variantes de fusão recombinantes em camundongos

[00148] As biodistribuições de um subconjunto selecionado das variantes de fusão mAb1-D10 recombinantes (F6, F16 e F17) e do conjugado químico mAb1-D10 produzidas como descrito no Exemplo 6 foram determinadas após injeção em veia da cauda em camundongos CD-1. As variantes recombinantes foram selecionadas à base de diversos fatores incluindo rendimento de purificação e expressão, afinidade de ligação de TGF-β1, potência baseada na célula, e que se ligam a hidroxipatita. Essas variantes incluíam exemplos contendo dois, quatro, ou seis D-10 peptídeos para avaliar se recapitula o direcionamento que se liga a hidroxipatita ou se ele é uma função do número do peptídeo. As proteínas foram expressas em células HEK293 e purificadas sobre proteína A. Essas variantes de fusão de mAb1 recombinantes foram caracterizadas em detalhes *in vitro* e *in vivo*. Nessas, D-10 peptídeos foram recombinantemente adicionados ou apenas ao C-terminal da cadeia pesada (mAb1 F6), tanto aos N- e C-terminais da cadeia pesada (mAb1 F16), ou aos N- e C-terminais da cadeia pesada e C-terminal da cadeia leve (mAb1 F17). As variantes recombinantes mAb1 F6, F16 e F17 têm razões de peptídeo para anticorpo (PAR) de 2, 4, e 6, respectivamente. O conjugado químico de mAb1-D10 peptídeo (~4.8 PAR), que mostrou direcionamento ao osso no es-

tudo no Exemplo 6, foi escolhido como um controle positivo.

[00149] As variantes de fusão recombinantes e conjugado químico foram etiquetadas por reação com Dylight® 800-4x éster de PEG NHS (Thermo Scientific) em 50 mM borato de sódio pH 8,65 e uma razão molar de corante:proteína de cerca de 5:1. O grau de etiquetagem (DOL) foi mantido dentro de 20% (~1,2 mol:mol) por ajuste da razão de corante:proteína. As proteínas etiquetadas foram então administradas a 1 mg/kg a camundongos por injeção em veia da cauda. Animais anestesiados foram subsequentemente submetidos a teste de imagem em um gerador de imagem de infravermelho próximo IVIS de animal pequeno (Perkin Elmer) em 24, 48, 168, e 504 horas (3 semanas) após a administração. Fêmures e espinha foram recuperados de um animal de cada grupo em 240 e 504 h para verificação do fornecimento a osso.

[00150] Como mostrado nas imagens de vista dorsal na FIG. 14, todas as variantes de fusão mAb1-D10 e conjugado químico foram concentradas na linha central próxima à coluna vertebral e ali permaneceram por 3 semanas (504 horas) embora diferenças significativas tenham sido observadas entre a intensidade de sinal para os artigos de teste. Uma região de interesse (ROI) foi usada para quantificação que incluía a porção da coluna espinhal entre os ombros e a pelve, como mostrado na FIG. 14. A máxima eficiência radiante dentro da ROI normalizada para a DOL foi calculada e plotada como mostrado na FIG. 15. A variante de fusão recombinante F6, que tem um D10-peptídeo em cada um dos C-terminais da cadeia pesada, mostrou o nível mais alto na coluna espinhal de todos os construtos sobre todo o curso do estudo (3 semanas). Depois de 48 horas, a ordem de classificação de intensidade de sinal dentro da ROI foi variante F6 > variante F16 > variante F17 ≈ conjugado químico, e essa ordem foi mantida através de todo o curso do estudo (FIG. 15). A área sob a curva (AUC)

para as máximas eficiências radiantes dentro da ROI durante um tempo menor a autofluorescência de base (de apenas animais de controle de veículo) calculada usando-se o software Phoenix® WinNonlin® (Pharsight) está mostrada na Tabela 6. Houve um aumento de 8 a 22 vezes na exposição de osso (AUC) em comparação com o controle de mAb1 e modestas diferenças (de até 2,5 vezes) entre os construtos contendo D10. A variante F6 mostrou o aumento mais alto em comparação com mAb1 (21,8 vezes, $p<0,05$). A meia vida de tecido como calculado usando-se WinNonlin® similarmente mostrou um aumento >10 vezes na meia vida para o osso para a variante F6 em comparação com mAb1 ($p<0,05$).

[00151] Espinhas e fêmures de animais representativos em cada coorte foram isolados depois de 240 e 504 h, separados de tecido circundante e submetidos a geração de imagem (FIG. 16). As intensidades de fluorescência relativa dessas amostras eram consistentes com os sinais de imagem dorsal observadas em animais vivos indicando que elas refletem a presença das variantes de fusão recombinantes e conjugado químico no osso.

Tabela 6 Exposições vertebrais a partir de dados de AUC de fluorescência

Variante ID	AUC _{inf} (norm) ^A	Tecido t _{1/2} (d) ^A
mAb1	(1,0)	2,3 ± 0,1
F6	21,8 ± 9,1*	25,4 ± 9,9*
F16	10,0 ± 1,6	14,2 ± 2,4
F17	9,5 ± 3,1	19,0 ± 3,7
CC ^B	7,7 ± 1,0	17,9 ± 3,4

^A Média ± SEM, ajustada para DOL e normalizada para mAb1;

^B conjugado químico mAb1-D10

* $P<0,05$ em comparação com mAb1

Exemplo 13: Preparação de uma variante de fusão de anticorpo anti-TGF β -D10 recombinante humano

[00152] Um vetor de expressão para preparação de mAb2 (um anticorpo de anti-TGF β IgG4 humano com uma mutação de dobradiça ["hinge mutation"] S228P) portando uma sequência de D10 C-terminal sobre a cadeia pesada (*isto é*, mAb2 HC-D10 / mAb2 wt LC (SEQ ID NO: 14/SEQ ID NO: 15), que tem correspondente configuração como na variante F6 (*vide* FIG. 9B), e aqui a seguir chamado de mAb2 F6; *vide* Tabela 7) foi gerado na mesma maneira que descrita no Exemplo 7. Células de Expi293F foram transfetadas com miniprep DNA e depois de 6 dias, meio condicionado (60 mL) foi coletado, e a proteína produzida foi purificada sobre proteína A HiTrap (G.E. Healthcare).

Tabela 7 Variantes de fusão recombinantes de mAb2 com D10

Variante ID	Construto de cadeia pesada	SEQ ID NO:	Construto de cadeia leve	SEQ ID NO:
mAb2 F1	HC	13	LC	15
mAb2 F2	HC	13	D10-LC	18
mAb2 F3	HC	13	LC-D10	19
mAb2 F4	HC	13	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F5	HC	13	LC-(G4S) ₂ -D10	22
mAb2 F6	HC-D10	14	LC	15
mAb2 F7	HC-D10	14	D10-LC	18
mAb2 F8	HC-D10	14	LC-D10	19
mAb2 F9	HC-D10	14	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F10	HC-D10	14	LC-(G4S) ₂ -D10	22
mAb2 F11	D10-HC	16	LC	15
mAb2 F12	D10-HC	16	D10-LC	18
mAb2 F13	D10-HC	16	LC-D10	19
mAb2 F14	D10-HC	16	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F15	D10-HC	16	LC-(G4S) ₂ -D10	22
mAb2 F16	D10-HC-D10	17	LC	15

mAb2 F17	D10-HC-D10	17	D10-LC	18
mAb2 F18	D10-HC-D10	17	LC-D10	19
mAb2 F19	D10-HC-D10	17	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F20	D10-HC-D10	17	LC-(G4S) ₂ -D10	22

Exemplo 14: Biodistribuição de proteína de fusão de anticorpo anti-TGFβ-D10 humana em camundongos

[00153] A variante recombinante F6 de mAb2 (mAb2 F6) e anticorpos de controle de mAb2 foram etiquetados com AlexaFluor® 647 (Thermo Scientific) e administrados intraperitonealmente a camundongos C57BL/6 a uma dose de 1 mg/kg. Depois de 24 e 96 horas, alguns camundongos foram sacrificados e espinhas e fêmures foram ressecados e expostos para formação de imagem em um instrumento IVIS. A amostra de soro (10 µL) obtida no sacrifício foi exposta para formação de imagem em paralelo. A eficiência radiante total média para o fêmur distal (trabecular) ROI e espinha lombar está mostrada nas FIGS. 17A e 17B. As intensidades relativas estão tabuladas na Tabela 8. Esses resultados mostram um grande aumento na quantidade de anticorpo na espinha lombar e no fêmur com significativamente menos no soro depois de 96 horas como resultado de adição recombinante de D10 a mAb2.

Tabela 8 Exposição óssea relativa em camundongos para proteínas de fusão de anti-TGFβ-D10 de ser humano em C57BL/6

Razão de Sinal de osso/soro*			
	Osso	24 h	96 h
mAb2 F1	Lombar	(1,00)	1,2
	Fêmur D.	0,82	0,70
mAb2 F6	Lombar	12,6	189
	Fêmur D.	19,0	147

*normalizada para mAb2 lombar em 24 h

Exemplo 15: Soro de dose única e farmacocinética óssea de proteína de fusão de anticorpo de anti-TGFβ-D10 de camundongo em camundongos

[00154] Neste exemplo, a farmacocinética de proteínas de fusão de anticorpo de anti-TGF β -D10 de camundongo foi medida em camundongos.

[00155] Uma dose única de mAb1 ou mAb1 F6 recombinante (*vide* Tabela 2) foi administrada intraperitonealmente a camundongos G610C (um modelo de animal com osteogênese imperfeita; n=12 por ponto de tempo) e amostras de sangue foram coletadas a 4 h ou 2, 7, 15, 22, e 43 dias pós-dose. Uma ELISA otimizada para a detecção de e quantificação de concentrações de soro de anticorpos relevantes foi utilizada.

[00156] Para a formação de imagem óssea, uma dose única de mAb1 marcado com fluoroforo, mAb1 F6 recombinante ou vários outros D10 alternativos foi administrado intravenosamente aos camundongos CD-1 nu (n=3 por ponto de tempo) e formação de imagem ótica *in vivo* a 4 h ou 1, 2, 4, 7, 10, e 21 dias pós-dose. Imagens fluorescentes de coluna espinhal de camundongo foram geradas quer permitiram comparações de artigo de teste relativo entre mAb1 e mAb1 F6 no osso (não mostrado).

[00157] Perfis farmacocinéticas no soro e osso, respectivamente, podem ser visto nas FIGS. 18A e 18B e parâmetros farmacocinéticos resultantes na Tabela 9 abaixo.

[00158] Os resultados demonstravam contraste fundamental na farmacocinética entre mAb1 e mAb1 F6 no soro e osso após uma dose única. mAb1 F6 exibia 13 vezes menos AUC (exposição) no soro e exposição 22 vezes mais alta no osso em comparação com mAb1. Adicionalmente, mAb1 F6 exibiu $t_{1/2}$ 14 vezes mais curtas no soro do que mAb1 e comensuradamente depuração 13 vezes mais rápida. E finalmente para osso, mAb1 F6 exibia uma $t_{1/2}$ 11 vezes mais longa do que mAb1 e comensuradamente depuração 17 vezes mais lenta. Estes atributos podem ser vantajosos para uma forma de ser humano de

mAb1-D10 no domínio clínico onde inibição periférica (soro) de TGF β pode não ser desejado a partir de um ponto de vista, enquanto exposição maior no osso pode melhorar eficácia.

Tabela 9 Parâmetros de PK de dose única

Artigo de teste	Método/Análito	AUC	t _{1/2} (dia)	Depuração
mAb1	ELISA/Soro	740 ± 91,6	12,6 ± 2,51	0,14 ± 0,034
mAb1 F6		56,3 ± 13,1*	0,91 ± 0,21*	1,78 ± 0,27*
mAb1	Formação de imagem/Osso	(1,0) [#]	2,3 ± 0,1	1,82 ± 0,08
mAb1 F6		21,8 ± 9,1*	25,4 ± 9,9*	0,11 ± 0,03*

*p<0,05 em comparação com mAb1; [#]AUC normalizado a 1,0 para mAb1

Exemplo 16: Farmacocinética de soro mínima - máxima de doses múltiplas de proteína de fusão de anticorpo de anti-TGF β -D10 de camundongo em camundongos

[00159] Neste exemplo, a estudo de farmacocinética de pico - mínimo de múltiplas doses foi realizado em um modelo de animal de osteogênese imperfeita.

[00160] mAb1 e mAb1 F6 (vide Tabela 2) foram administrados dosesadamente intraperitonealmente a uma concentração de 0,3 mg/kg e 1 mg/kg, 3 x semanalmente por 8 semanas (24 total doses) a camundongos G610C (n=10) e amostras de sangue foram coletadas a 24 e 48 h pós-dose após a dose de 1 e 23 (no início e no fim do estudo). Resultados são mostrados apenas para a dose de 1 mg/kg (vide FIG. 19). Um ensaio de espec. de massa, otimizado para detecção de e quantificação de concentrações de soro de anticorpos relevantes, foi utilizada.

[00161] Resultados são quantificados na Tabela 10 abaixo. Os resultados demonstravam contrastes fundamentais na farmacocinética entre mAb1 e mAb1 F6 no soro ambas ambas as doses 1 e 23. Concentrações significativamente menores de soro foram observados para mAb1 F6 em comparação com mAb1 tanto a 24 quanto 48 h pós dose

em ambas as doses 1 e 23. Adicionalmente, a inclinação entre 24 e 48 h pós-dose para mAb1 F6 era mais íngreme em comparação com mAb1 em ambas as doses 1 e 23, sugerindo que mAb1 F6 está deixando o soro (circulação sistêmica) a uma taxa mais rápida do que mAb1, provavelmente devido a sua alta capacidade para osso (hidroxipatita). Finalmente, tanto mAb1 F6 quanto mAb1 parecem estar acumulando no soro da dose de 1 a 23, mas mAb1 F6 parece acumular em uma concentração diminuída em comparação com mAb1 (mAb1 F6: acúmulo de 2,5 a 3,5 vezes e mAb1: acúmulo de 4 a 5,5 vezes da dose de 1 a 23). Estes atributos podem ser vantajosos para uma forma humana de mAb1 F6 no domínio clínico onde a inibição periférica (soro) de TGF β pode não ser desejada de um ponto de vista de segurança.

Tabela 10 Resultados de estudo de dosagem de mAb1

<i>Grupos de dose (1 mg/kg)</i>	<i>Soro médio (μg/mL)</i>	
	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
<i>mAb1 F6 Dose 1</i>	$3,24 \pm 1,25^*$	$1,60 \pm 0,68^*$
<i>mAb1 Dose 1</i>	$9,60 \pm 1,72$	$9,03 \pm 1,51$
<i>mAb1 F6 Dose 23</i>	$8,52 \pm 2,61^*$	$4,86 \pm 1,85^*$
<i>mAb1 Dose 23</i>	$40,07 \pm 5,43$	$44,95 \pm 7,58$

* $p \leq 0,05$ em comparação com mAb1

Exemplo 17: Estudo de eficácia de múltiplas doses no osso lombar com mAb1 e mAb1 F6

[00162] Neste exemplo, um estudo de eficácia de múltiplas doses foi realizado em um modelo de animal de osteogênese imperfeita para determinar eficácia de osso direcionado (mAb1 F6) versus mAb1 não direcionado na densidade e resistência óssea.

[00163] mAb1 e mAb1 F6 foram administrados dosadamente intra-peritonealmente 3 x semanalmente a 0,3, 1, e 5 mg/kg por 8 semanas a camundongos G610C. Após a dose final, camundongos foram necropsiados e no sexto osso lombar foi formado em imagem via μ CT

para determinar volume ósseo sobre o volume total (BV/TV) e foi submetido à testagem bioquímica para determinar força máxima para falha (resistência óssea).

[00164] Resultados são mostrados nas FIGS. 20 e 21. Mudanças significativas de BV/TV (%) em comparação com camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados a 1 e 5 mg/kg para ambos os tratamentos. Mudanças significativas de força máxima para falha em comparação com camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados a 1 e 5 mg/kg para mAb1 F6 e 1 mg/kg apenas para mAb1. Camundongos G610C tratados com um controle de anticorpo (13C4) exibiam diminuições significativas tanto no BV/TV quanto força máxima para falha em comparação com cepa de base de WT. Estes resultados demonstram que ambos os tratamentos induzem mudanças relacionadas com doses similares em BV/TV e força máxima para falha no camundongo G610C neste regime de administração dosada 3 x semanalmente. Tendências existiam para eficácia melhorada para mAb1 F6 na resistência óssea, quando metade da coorte de camundongos a 5 mg/kg exibia força máxima substancialmente mais alta para valores de falha (40 Newtons ou mais alto) do que camundongos tratados com mAb1 a 1 mg/kg ou 5 mg/kg.

Exemplo 18: Estudo de frequência de dosagem no osso lombar com mAb1 e mAb1 F6

[00165] Neste exemplo, um estudo de frequência de administração dosada foi realizado em um modelo de animal de osteogênese imperfeita para determinar a frequência apropriada da administração dosada para mAb1 F6 para conseguir sua ótima eficácia de osso direcionado anticorpos.

[00166] mAb1 e mAb1 F6 foram administrados dosadamente intra-peritonealmente em várias frequências (3 x semanalmente, 1 x semanalmente, 1 x a cada 2 semanas, ou 1 x a cada 4 semanas) a 5 mg/kg

por 12 semanas to Camundongos G610C. Amostras de soro farmacocinética (PK) foram tiradas no início e no fim do estudo para determinar Valores de pico e mínimo tanto para mAb1 quanto mAb1 F6. Após a dose final, camundongos foram necropsiados e no sexto osso lombar foi registrado em imagem via μ CT para determinar volume ósseo sobre o volume total (BV/TV) e foi submetido a testagem bioquímica para determinar força máxima para falha (resistência óssea).

[00167] Resultados são mostrados nas FIGS. 22, 23, e 24. Mudanças significativas de BV/TV (%) em comparação com Camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados para mAb1 a 3 x semanalmente, 1 x semanalmente, 1 x a cada 2 semanas, e 1 x a cada 4 semanas. Mudanças significativas of BV/TV (%) em comparação com Camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados para mAb1 F6 a 3 x semanalmente e 1 x semanalmente. Tratamento com mAb1 exibia BV/TV significativamente mais alto em comparação com tratamento com mAb1 F6 a 1 x a cada 2 semanas e 1 x a cada 4 semanas de frequência de administração dosada. Mudanças significativas da força máxima para falha em comparação com Camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados para mAb1 a 3 x semanalmente, 1 x semanalmente e 1 x a cada 2 semanas. Mudanças significativas de força máxima para falha em comparação com Camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados para mAb1 F6 a 3 x semanalmente e 1 x semanalmente. Camundongos G610C tratados com um anticorpo de controle (13C4) exibiam diminuições significativas em BV/TV e uma tentativa de força máxima mais baixa para falha, em comparação com cepa de base de WT.

[00168] Estes resultados demonstram que tanto mAb1 quanto mAb1 F6 podem induzir efeitos máximos similares em BV/TV e força máxima para falha nos Camundongos G610C. mAb1 parece ter uma vantagem na durabilidade da eficácia em comparação com mAb1 F6,

mantendo eficácia significativa quando administrado dosadamente uma vez a cada 4 semanas para BV/TV e uma vez a cada 2 semanas para força máxima para falha. No entanto, as médias de amostra de soro de PK nos regimes de administração dosada equivalentemente eficazes (mAb1, 1 x a cada 2 semanas e mAb1 F6, 1 x semanalmente) resultou em cerca de 38 µg/mL e 8 µg/mL para mAb1 e mAb1 F6, respectivamente. Isto sugere que exposição de soro pode ser menos com mAb 1 F6, que pode oferecer vantagens seguraas para pacientes com OI.

Exemplo 19: Estudo de frequência de dosagem no osso lombar com mAb1 F16

[00169] Neste exemplo, a estudo de frequência de administração dosada foi realizado em um modelo de animal de osteogênese imperfeita para determinar a frequência de administração dosada apropriada para mAb1 F16 para conseguir seu ótimo impacto na densidade óssea.

[00170] mAb1 e mAb1 F16 foram administrados dosadamente intraperitonealmente 3 x semanalmente a 5 mg/kg por 8 semanas nos Camundongos G610C. Após a dose final, camundongos foram necropsiados e o sexto osso lombar foi registrado em imagem via µCT para determinar volume ósseo sobre o volume total (BV/TV).

[00171] Resultados são mostrados na FIG. 25. Mudanças significativas de BV/TV (%) em comparação com Camundongos G610C tratados com 13C4 foram observados a 5 mg/kg para tanto mAb1 quanto mAb F16. Camundongos G610C tratados com o anticorpo de controle (13C4) exibia diminuições significativas no BV/TV em comparação com cepa de base de WT. Estes resultados demonstram que tanto mAb1 quanto mAb F16 induzem mudanças relacionadas com dose similar no BV/TV nos Camundongos G610C sob este regime de administração dosada.

Exemplo 20: Estudo de frequência de dosagem no osso com mAb1 F11

[00172] Neste exemplo, um estudo de frequência de dosagem foi realizado em camundongos de tipo selvagem para determinar a frequência apropriada da dosagem para mAb1 F11 para conseguir seu ótimo impacto na densidade óssea.

[00173] mAb1 e mAb1 F11 foram administrados dosadamente intraperitonealmente 3 x semanalmente a 5 mg/kg por 11 semanas em camundongos de tipo selvagem. Vários pontos de tempo de μ CT *in vivo* foram tirados durante na porção da vida do estudo. Dados são mostrados só em 9 semanas pós-dose para volume ósseo sobre o volume total (BV/TV%).

[00174] Resultados são mostrados na FIG. 26. Mudanças significativas de BV/TV (%) em comparação com camundongos de tipo selvagem tratados com 13C4 foram observados a 5 mg/kg para ambos os tratamentos. Estes resultados demonstram que tanto mAb1 quanto mAb1 F11 induzem mudanças relacionadas dom dose similar em BV/TV em camundongos de tipo selvagem neste regime de dosagem.

Exemplo 21: Biodistribuição de anticorpos de anti-TGF β de direcionamento ósseo de ser humano e de camundongo mAb1 F6 e mAb2 F6 em camundongos

[00175] Neste exemplo, um estudo foi conduzido para comparar a distribuição de mAb1, mAb1 F6, mAb2, e mAb2 D10 fluorescentemente marcado (D10 conjugado à cadeia pesada C-terminal de mAb2; mAb2 F6) em camundongos de tipo selvagem. Uma única dose intraperitoneal de cada artigo de teste e veículo foi administrado aos camundongos, que eram submetidos a eutanásia em vários pontos de tempo para coleção de tecidos. Entre outros tecidos coletados (dados não mostrados), vértebra lombar, coração, fígado, e intestinos foram coletadas a 1, 4, 10, 20, 43, e 98 dias depois da dosagem com mAb1 e

mAb1 F6. Tecidos foram também amostrados após a dosagem com mAb2 e mAb2 D10 a 24 e 96 hrs.

[00176] Resultados são mostrados nas FIGS. 27-33. As FIGS. 27-30 mostram eficácia radiante total (TREs) nos tecidos oriundos de camundongos administrados dosadamente com mAb1, mAb1 F6, ou veículo em 1-98 dias pós dose. Vértebra lombar exibe presença persistente robusto de mAb1 F6 em comparação com mAb1, com eficácia radiante total significativamente mais alta (TRE) a cada ponto de tempo. No coração e fígado, mAb1 F6 exibe TRE muito menor em relação a mAb1. Finalmente, nenhuma diferença significativa foi observada entre o veículo e qualquer artigo de teste nos intestinos.

[00177] Esses resultados demonstram que mAb1 F6 são caracterizados por alta afinidade óssea que de modo inverso leva a exposição mais baixa em outros tecidos (por exemplo, coração e fígado). Os resultados também indicam a vantagem de segurança de direcionamento do sítio de inibição de TGF- β no osso enquanto inibição de TGF- β sistêmico limitante e redução de efeitos colaterais adversos. A carência de qualquer TRE em relação a um veículo nos intestinos demonstra que o fluoroforo mantinha sua marcação nos respectivos anticorpos. Dados anteriores têm mostrados se o fluoforo não mantivesse seu rótulo nos anticorpos, seria detectado nos intestinos.

[00178] As FIGS. 31-33 mostram TREs em tecidos de camundongos administrados dosadamente com ou mAb2 ou mAb2 D10. FIG. 31 demonstra a alta afinidade óssea de mAb2 D10 em comparação com mAb2. Significativamente, TRE mais alto é observado no fêmur para mAb2 D10 em comparação com mAb2. A mesma tendência global foi observada na lombar. As razões de lombar/soro e fêmur/soro nos camundongos administrados dosadamente com mAb2 D10 em comparação com aqueles em camundongos administrados dosadamente com mAb2 também fortemente suportam a capacidade de direcionamento

ósseo de mAb2 D10 (FIGS. 32 e 33).

[00179] Tendo descrito a invenção em detalhes e por referência a suas concretizações específicas, estará evidente que modificações e variações são possíveis sem se afastar do escopo da invenção definidos nas reivindicações anexas. Mais especificamente, embora alguns aspectos da presente invenção sejam identificados aqui como particularmente vantajosos, é contemplado que a presente invenção não é necessariamente limitada a estes aspectos particulares da invenção. Em algumas concretizações, valores revelados aqui podem alternativamente variar em quantidade por ±10, 20, ou 30% de valores revelados e permanecem dentro do escopo da invenção contemplado.

[00180] A não ser de outra maneira definido aqui, termos científicos e técnicos usados em ligação com a presente invenção terão os significados que são comumente entendidos por aqueles de habilidade comum na técnica. Métodos e materiais exemplares são descritos abaixo, embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam também ser usados na prática ou na testagem da presente invenção. Todas as publicações e outras referências mencionadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, controlarão. Embora numerosos documentos sejam citados aqui, tal citação não constitui uma admissão de que qualquer desses documentos forme parte do conhecimento comum geral da técnica. Além disso, a não ser se de outra maneira exigido pelo contexto, termos singulares devem incluir pluralidades e termos no plural termos devem incluir o singular. Em geral, a nomenclatura usada em conexão com, e técnicas de, cultura de tecidos e células, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética, química analítica, química orgânica sintética, química medicinal e química farmacêutica, e química de proteínas e química de ácidos nucleicos e hibridização descritas aqui são aque-

las bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações dos fabricantes, como comumente realizadas na técnica ou como descrito aqui. Através de todo este relatório descritivo e das concretizações, as palavras "têm" e "compreendem", ou variações tais como "tem", "tendo", "compreende," ou "compreendendo' devem ser entendidas como implicando a inclusão de um mencionado número inteiro ou grupo de números inteiros mas não a exclusão de quaisquer outros números inteiros ou grupo de números inteiros. Além disso, as formas singulares "um", "uma," e "o" incluem referências plurais a não ser que o contexto claramente afirme de outra maneira. Por exemplo, referência a "um anticorpo" significa um ou mais anticorpos.

[00181] Para as finalidades de descrição e definição da presente invenção deve-se observar que o termo "substancialmente" é utilizado aqui para representar o grau inherente de incerteza que pode ser atribuído a qualquer comparação quantitativa, valor, medida, ou outra representação. O termo "substancialmente" é também utilizado aqui para representar o grau pelo qual uma representação quantitativa pode variar em comparação com uma referência afirmada sem resultar em uma mudança na função básica do assunto em questão.

[00182] Como usado aqui, o termo "cerca de" refere-se a $\pm 10\%$ de uma dada quantidade, no entanto sempre que a quantidade in questão se refere a um objeto indivisível, tal como um aminoácido ou outro objeto que perderia sua identidade se fosse subdividido, então "cerca de" refere-se a ± 1 do objeto indivisível. Por exemplo, cerca de 2% de água refere-se a 1,8% to 2,2% de água, enquanto que cerca de 6 resíduos de aminoácido refere-se a 5-7 resíduos de aminoácido.

[00183] Como usado aqui, os termos "ou" e "e/ou" são usados para descrever múltiplos componentes em combinação ou exclusive um do outro. Por exemplo, "x, y, e/ou z" pode referir-se a "x" sozinho, "y" so-

zinho, "z" sozinho, "x, y, e z", "(x e y) ou z," "x ou (y e z)," ou "x ou y ou z."

[00184] Sequências referidas no relatório descritivo são providas na Tabela 11 abaixo bem como na Listagem de Sequências.

Tabela 11 Sequências

Sequência de Aminoácidos para D10 (SEQ ID NO: 1)	DDDDDDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb1 (WT HC) (SEQ ID NO: 2)	HVQLQQSGPELVRPGASVKLSCKASGYIFITYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIFPASGSTNYNEMFEGKAT LTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNY ALDAMDYWGQGTSVTVSSAKTPPSVYPLAPGSA AQTNNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWPSQTVTCNVA HPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP PKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD DVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTKGRPKAPQVY TIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN GQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYSKLNQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGKDDDDDD DDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb1 com C-terminal D10 (HC-D10) (SEQ ID NO: 3)	HVQLQQSGPELVRPGASVKLSCKASGYIFITYWMN WVKQRPGQGLEWIGQIFPASGSTNYNEMFEGKAT LTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNY ALDAMDYWGQGTSVTVSSAKTPPSVYPLAPGSA AQTNNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWPSQTVTCNVA HPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP PKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD DVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTKGRPKAPQVY TIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN GQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYSKLNQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGKDDDDDD DDDDDD

Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb1 com N-terminal D10 (D10-HC) (SEQ ID NO: 4)	DDDDDDDDDDHVQLQQSGPELVRPGASVQLSCK ASGYIFITYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIFPASGST NYNEMFEGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARGDGNYALDAMDYWGQGTSVTVSSAKTTP PSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVT WNSGSLSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSS WPSQTVCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPPKPKDVLTTLTPKVTCVVVDISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSV SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTIKT KGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDVKSLTCMITDFFF EDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYS KLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLS HSPGK
Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb1 com N- e C-terminais D10 (D10-HC-D10) (SEQ ID NO: 5)	DDDDDDDDDDHVQLQQSGPELVRPGASVQLSCK ASGYIFITYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIFPASGST NYNEMFEGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARGDGNYALDAMDYWGQGTSVTVSSAKTTP PSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVT WNSGSLSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSS WPSQTVCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPPKPKDVLTTLTPKVTCVVVDISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSV SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTIKT KGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDVKSLTCMITDFFF EDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYS KLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLS HSPGKDDDDDDDDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb1 (WT LC) (SEQ ID NO: 6)	NIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVD SYGNS FMHWYQQKSGQPPKLLIYL ASNLESGVPARFSGS GSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPLTFGA GTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC LNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKS FNRNEC
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb1 com N-terminal D10 (D10-LC) (SEQ ID NO: 7)	DDDDDDDDDDNIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVD SYGNS SESVD SYGNSFMHWYQQKSGQPPKLLIYL ASNLE SGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQ NNEDPLTFGA GTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVL NSWTDQDSK DSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI EATHKTSTSPIVKS FNRNEC
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb1 com C-terminal D10 (LC-D10) (SEQ ID NO: 8)	NIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVD SYGNS FMHWYQQKSGQPPKLLIYL ASNLESGVPARFSGS GSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPLTFGA GTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC LNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKS FNRNECDDDDDDDDDD

Sequência de Aminoácidos para: 1X ligante de peptídeo (G4S) (SEQ ID NO: 9)	GGGGS
Sequência de Aminoácidos para: 2X ligante de peptídeo ((G4S)x2) (SEQ ID NO: 10)	GGGGSGGGGS
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb1 com 1X Ligante e C-terminal D10 (LC-G4S-D10) (SEQ ID NO: 11)	NIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVD SYGNS FMHWYQQKSGQPPKLLIYL ASNLES GVPARFSGS GSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPLTFGA GTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC LNNFYPKDINVKW KIDG SERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKS FNRNECGGGGSDDDDDDDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb1 com Ligante 2X e C-terminal D10 (LC-(G4S)2-D10) (SEQ ID NO: 12)	NIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVD SYGNS FMHWYQQKSGQPPKLLIYL ASNLES GVPARFSGS GSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPLTFGA GTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC LNNFYPKDINVKW KIDG SERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKS FNRNECGGGGSGGGGSDDDDDDDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb2WT de Cadeia pesada mAb2 (WT HC) (SEQ ID NO: 13)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVI SWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRV TITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVL DAMDYWQGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVF LFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQP PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb2 com C-terminal D10 (HC-D10) (SEQ ID NO: 14)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVI SWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIA NYAQRFKGRV TITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVL DAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP PRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGKD DDDDDDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb2WT de Cadeia leve de mAb2 (WT LC) (SEQ ID NO: 15)	ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb2 com N-terminal D10 (D10-HC) (SEQ ID NO: 16)	DDDDDDDDDDQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCK ASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAV YYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQP RE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK QKSLSLSLGKDDDDDDDDDD
Sequência de Aminoácidos para Cadeia pesada de mAb2 com N-terminal D10 e C-terminal D10 (D10-HC-D10) (SEQ ID NO: 17)	DDDDDDDDDDQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCK ASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIA NYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAV YYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQP RE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK QKSLSLSLGKDDDDDDDDDD

Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb2 com N-terminal D10 (D10-LC) (SEQ ID NO: 18)	DDDDDDDDDDDETQLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSQGLSSPVTKSFNRGEC
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb2 com C-terminal D10 (LC-D10) (SEQ ID NO: 19)	ETVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb2 com N-terminal D10 e C-terminal D10 (D10-LC-D10) (SEQ ID NO: 20)	DDDDDDDDDDDETQLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSQGLSSPVTKSFNRGEC
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb2 com Ligante 1X e C-terminal D10 (LC-G4S-D10) (SEQ ID NO: 21)	ETVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
Sequência de Aminoácidos para Cadeia leve de mAb2 com Ligante 2X e C-terminal D10 (LC-(G4S)2-D10) (SEQ ID NO: 22)	ETVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

Sequência de ácidos nucleicos para WT de Cadeia pesada mAb2 (WT HC) (SEQ ID NO: 23)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTG CAAGGCTTCTGGATACACCTCAGTAGCAATGTT ATCAGCTGGTGCGCCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGGGGTCATCCCTATTGTT TGATATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGG CAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACTAG TACAACTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTC TGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGCAC ACTTGGTCTCGTCCTGGATGCTATGGACTACTG GGGTCAAGGGTACGTTAGTGACGGTCTCGAGTGC TTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTCCCCCTGGC GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTGAGCAGCAGCCTCAGGC GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGC TGT CCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCAGCTTGGG CACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAA GCCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGAGAGTTGA GTCCAATATGGTCCCCCATGCCAACCATGCC AGCACCTGAGTTCCCTGGGGGACCATCAGTCTT CCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCC AGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCCGCGGGAGGAGCAGT TCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC CCGT CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAGAGCCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA GCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTGGGGAAATGA
--	---

Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia pesada de mAb2 com N-terminal D10 (D10-HC) (SEQ ID NO: 24)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATCAG GTGCAGCTGGTGCAGTCCTGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATAACACCTTCAGTAGCAATGTTATC AGCTGGGTGCCAGGCCCTGGACAAGGGCT CGAGTGGATGGGGGGTCATCCCTATTGTTGA TATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGGCAG AGTCACGATTACCGCGACGAATCCACTAGTAC AAC TTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGA GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGCACACT TGGTCTCGTCCTGGATGCTATGGACTACTGGGG TCAGGGTACGTTAGTGACGGTCTCGAGTGCTTC CACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCC CTGCTCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGCGTGACACCTCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGAC GAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTCGACAAGAGAGTTGAGTC CAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGC ACCTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTTCCT GTTCCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAG TTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCC GTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCT GCCCCCCATCCCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA CCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCC TCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTGGGAAATGA
---	--

Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia pesada de mAb2 com C-terminal D10 (HC-D10) (SEQ ID NO: 25)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTG CAAGGCTTCTGGATACACCTCAGTAGCAATGTT ATCAGCTGGTGCGCCAGGCCCCCTGGACAAGG GCTCGAGTGGATGGGGGGTCATCCCTATTGT TGATATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGG CAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACTAG TACAACTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTC TGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGCAC ACTTGGTCTCGTCCTGGATGCTATGGACTACTG GGGTCAGGGTACGTTAGTGACGGTCTCGAGTGC TTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTCCCCCTGGC GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTGCGAGCAC GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGC TGT CCTACAGT CTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCAGCTTGGG CACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGACAAAGAGAGTTGA GTCCAATATGGTCCCCCATGCCAACCATGCC AGCACCTGAGTTCCCTGGGGGACCATCAGTCTT CCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCC AGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT TCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC CCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAGGCCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAAGAGCA GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGGAAAGACG ACGATGATGACCGATGACGACGACGATTGA
---	--

Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia pesada de mAb2 com N-terminal D10 e C-termina (D10-HC-D10) (SEQ ID NO: 26)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATCAG GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACCTTCAGTAGCAATGTTATC AGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAAGGGCT CGAGTGGATGGGGGGGTATCCCTATTGTTGA TATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGGCAG AGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACTAGTAC AACTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGA GGACACGGCCGTATTACTGTGCGAGCACACT TGGTCTCGTCTGGATGCTATGGACTACTGGGG TCAGGGTACGTTAGTGACGGTCTCGAGTGCTTC CACCAAGGGCCCATTCCGTCTCCCCCTGGCGCC CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCG AACCGGTACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGAC GAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTCGACAAGAGAGTTGAGTC CAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGC ACCTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTTCT GTTCCCCCCTGGGGGACCATCAGTCTTCT CTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAG TTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTT AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCC GTCCTCCATCGAGAAAACCCTCTCCAAGGCCAA GGGCAGCCCCGAGAGGCCACAGGTGTACACCC GCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA CCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGC CTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCT TCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTGGGGAAAGACGACG ATGATGACGATGACGACGACGATTGA
---	--

Sequência de ácidos nucleicos para WT de Cadeia leve de mAb2 (WT LC) (SEQ ID NO: 27)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTG TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTAC TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGTCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGATCCAGCAGG GCACCTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGT GGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGC CGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTTATTACT GTCAGCAGTATGCTGACTCACCGATCACCTCG GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTAG
Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia leve de mAb2 com N-terminal D10 (D10-LC) (SEQ ID NO: 28)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATGAA ACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCCTGC AGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGTCAGGCTCCC AGGCTCCTCATCTATGGTGATCCAGCAGGGCA CCTGGCATCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGGGG TCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGA CTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTTATTACTGTC AGCAGTATGCTGACTCACCGATCACCTCGGCC AAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCAC AGGGGAGAGTGTAG

Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia leve de mAb2 com C-terminal D10 (LC-D10) (SEQ ID NO: 29)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTG TCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTAC TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGTCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGATCCAGCAGG GCACCTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGT GGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGC CGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTCAGTTATTACT GTCAGCAGTATGCTGACTCACCGATCACCTCG GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAAGTCTACGCCTGCAGTACCCAT CAGGGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTGACGACGATGATGACGAT GACGACGACGATTAG
Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia leve de mAb2 com N-terminal D10 e C-terminal D10 (D10-LC-D10) (SEQ ID NO: 30)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATGAA ACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCCTGC AGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTA GCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGTCAGGCTCCC AGGCTCCTCATCTATGGTGATCCAGCAGGGCA CCTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGGGG TCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGA CTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTATTACTGTC AGCAGTATGCTGACTCACCGATCACCTCGGCC AAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCAGTACCCATCAG GGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTGACGACGATGATGACGATGAC GACGACGACGATTAG

Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia leve de mAb2 com Ligante 1X e C-terminal D10 (LC-G4S-D10) (SEQ ID NO: 31)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTG TCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTAC TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGTCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCACCTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGT GGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGC CGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTTATTACT GTCAGCAGTATGCTGACTCACCGATCACCTCG GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCAGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTGGCGGAGGCAGCGA CGGAGGCAGCGACGACGATGATGACGATGACGATTAG
Sequência de ácidos nucleicos para Cadeia leve de mAb2 com Ligante 2X e C-terminal D10 (LC-(G4S)2-D10) (SEQ ID NO: 32)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTG TCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTAC TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGTCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCACCTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGT GGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGC CGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTTATTACT GTCAGCAGTATGCTGACTCACCGATCACCTCG GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCAGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTGGCGGAGGCAGCGA CGGAGGCAGCGACGACGATGATGACGATGACGATTAG
mAb2 HCDR1 (SEQ ID NO: 33)	SNVIS
mAb2 HCDR2 (SEQ ID NO: 34)	GVIPIVDIANYAQRFKG

mAb2 HCDR3 (SEQ ID NO: 35)	TLGLVLDAMDY
mAb2 LCDR1 (SEQ ID NO: 36)	RASQSLGSSYLA
mAb2 LCDR2 (SEQ ID NO: 37)	GASSRAP
mAb2 LCDR3 (SEQ ID NO: 38)	QQYADSPIT
mAb2 HCVD (SEQ ID NO: 39)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVI SWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRV TITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVL DAMDYWGQGTLTVSS
mAb2 LCVD (SEQ ID NO: 40)	ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQQGTRL EIK

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada, uma cadeia leve, e um ou mais (poli-D) peptídeos de poliaspartato ligados à cadeia pesada e/ou ao C-terminal da cadeia leve, em que os um ou mais poli-D peptídeos são integrais com a sequência de aminoácidos da cadeia pesada ou da cadeia leve.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um poli-D peptídeo integral com o N-terminal da cadeia pesada, (ii) um poli-D peptídeo integral com o C-terminal da cadeia pesada, ou (iii) ambos (i) e (ii).

3. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende um poli-D peptídeo integral com o C-terminal da cadeia leve.

4. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o(s) poli-D peptídeo(s) está(ão) fundido(s) à cadeia pesada ou à cadeia leve via um ligante de peptídeo.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que os um ou mais poli-D peptídeos, cada um independentemente, compreendem de 2-30 resíduos de ácido aspártico.

6. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é uma IgG.

7. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno especificamente se liga a um ou mais de TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3.

8. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende as regiões determinantes de complementaridade (CDR) de cadeia pesada 1-3 na SEQ ID NO: 13 e a CDR1-3 de cadeia leve na SEQ ID NO: 15.

9. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada(V_H) que corresponde a resíduos de 1-120 de SED ID NO: 13 e uma sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve (V_L) que corresponde a resíduos de 1-108 de SEQ ID NO: 15.

10. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende uma região constante de IgG4 de ser humano tendo uma prolina na posição 228 (numeração EU).

11. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada do anticorpo comprehende a sequência de aminoácidos de ID NO: 13, e a cadeia leve do anticorpo comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

12. Anticorpo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 14, 16, ou 17, e a cadeia leve comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 19, 21, ou 22.

13. Anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende sequências de aminoácidos de cadeia leve e pesada de SEQ ID NOs: 2 e 6, respectivamente.

14. Anticorpo de IgG4 que liga TGF β 1, TGF β 2, e TGF β 3 de

ser humano, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada do anticorpo comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 ou 17, e a cadeia leve comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que comprehende um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

16. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 14, caracterizado pelo fato de que para a manufatura de um medicamento para o tratamento de um ser humano com uma condição óssea que se beneficia da inibição de TGF β .

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que os resultados de tratamento em pelo menos uma de (1) uma redução nos níveis de TGF β , (2) uma redução na atividade de TGF β , (3) uma redução na perda óssea, (4) uma redução na taxa de perda óssea, (5) um aumento na densidade óssea, (6) um aumento na resistência óssea, e (7) uma redução nos níveis de IL-11 no ser humano.

18. Uso de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o ser humano tem osteogenese imperfeita, perda óssea ou osteoporose, doença de rim crônica, ou câncer com metástase óssea.

19. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que comprehende uma sequência de nucleotídeos que codifica a cadeia pesada, a cadeia leve, ou ambas, do anticorpo ou do fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 14.

20. Vtor de expressão, caracterizado pelo fato de que

compreende a molécula de ácido nucleico isolada como definida na reivindicação 19.

21. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 20.

22. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

23. Método de produção de um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 14, caracterizado pelo fato de que compreende:

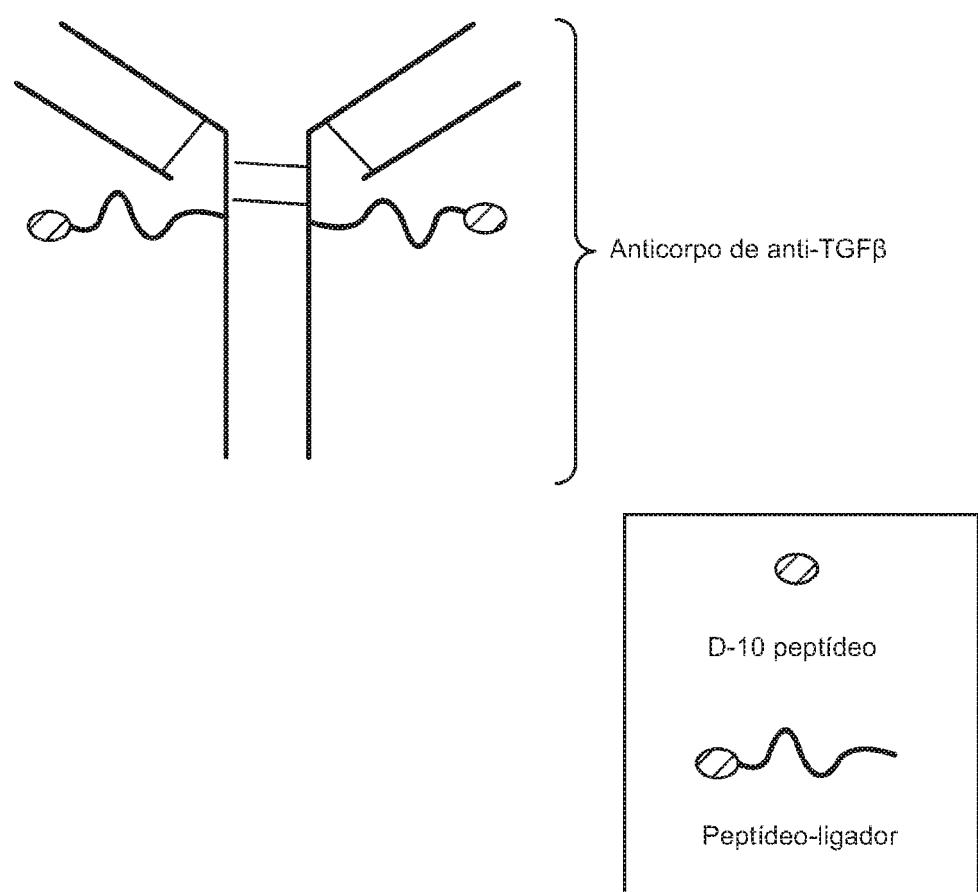
prover uma célula hospedeira compreendendo uma primeira e uma segunda sequências de nucleotídeos que codificam a cadeia pesada e a cadeia leve, respectivamente, do anticorpo ou do fragmento de ligação de antígeno,

desenvolver a célula hospedeira sob condições que permitem a produção do anticorpo ou do fragmento de ligação de antígeno, e

recuperar o anticorpo ou do fragmento de ligação de antígeno.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a primeira sequência de nucleotídeos compreende SEQ ID NO: 23, 24, 25, ou 26, e a segunda sequência de nucleotídeos compreende SEQ ID NO: 27, 29, 31, ou 32.

FIG. 1



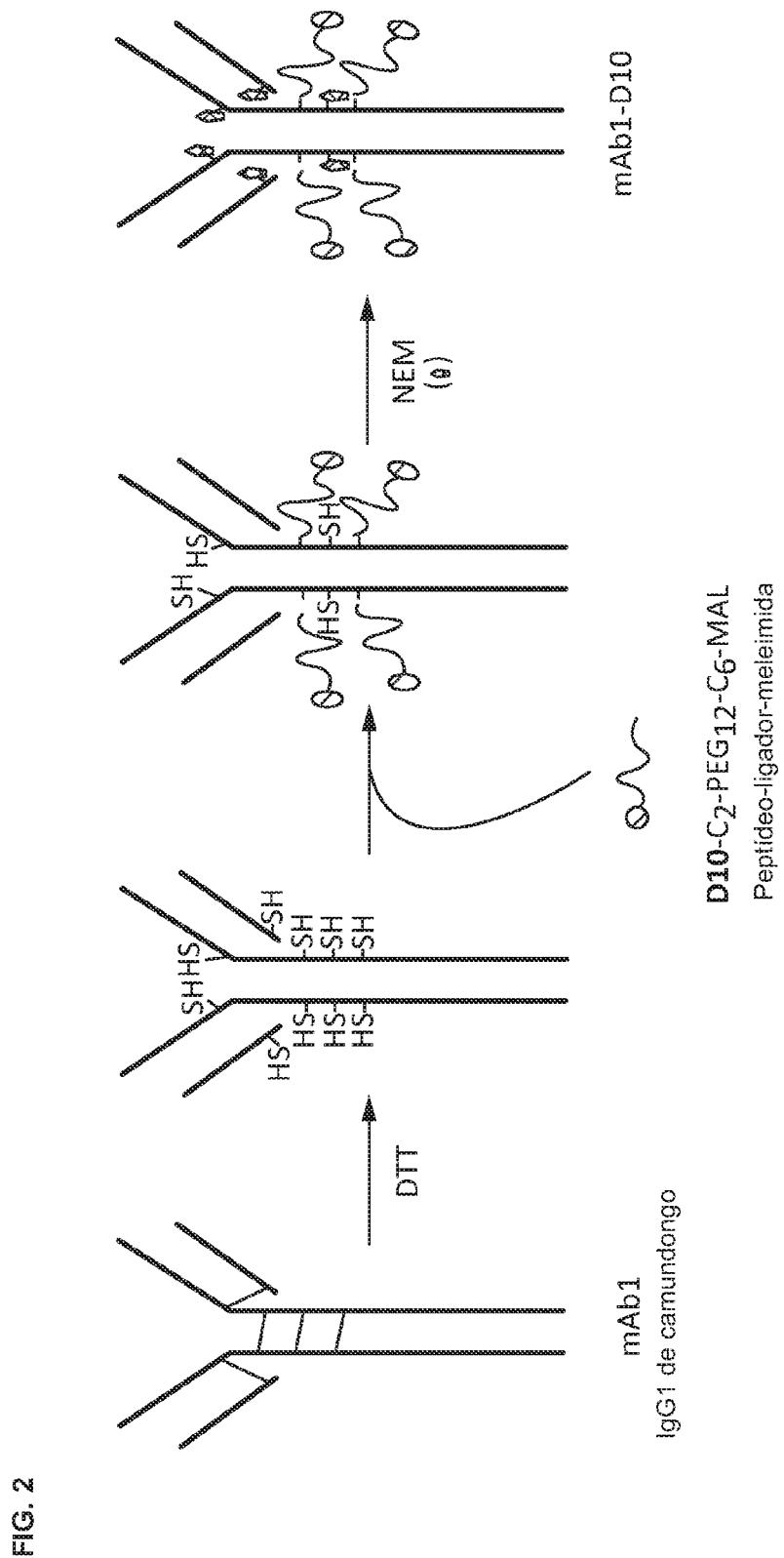


FIG. 2

D10-C₂-PEG₁₂-C₆-MAL
Peptideo-ligador-maleímidado

mAb1
IgG1 de camundongo

mAb1-D10

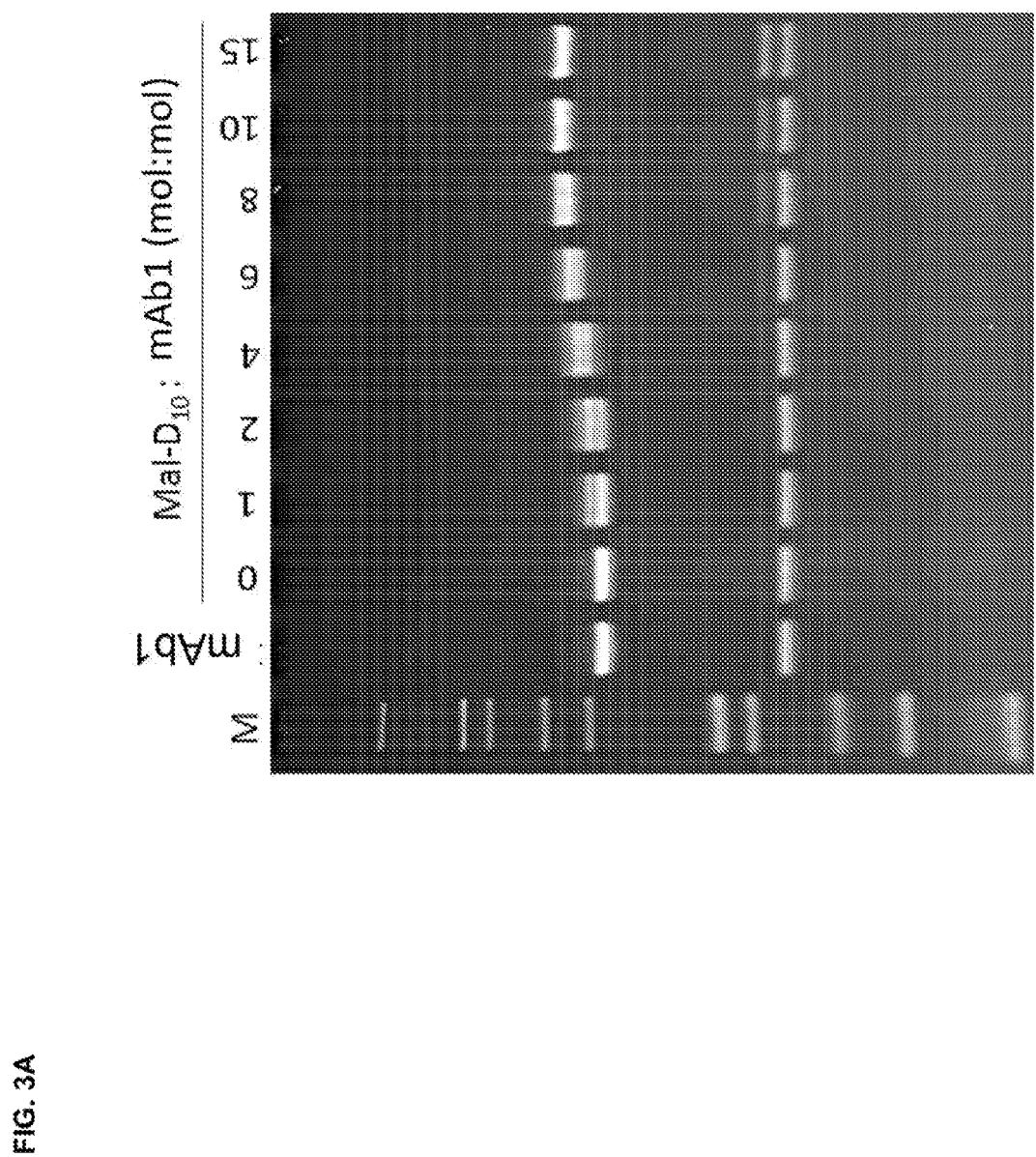
mAb1-D10

mAb1-D10

mAb1
IgG1 de camundongo

mAb1-D10

mAb1-D10



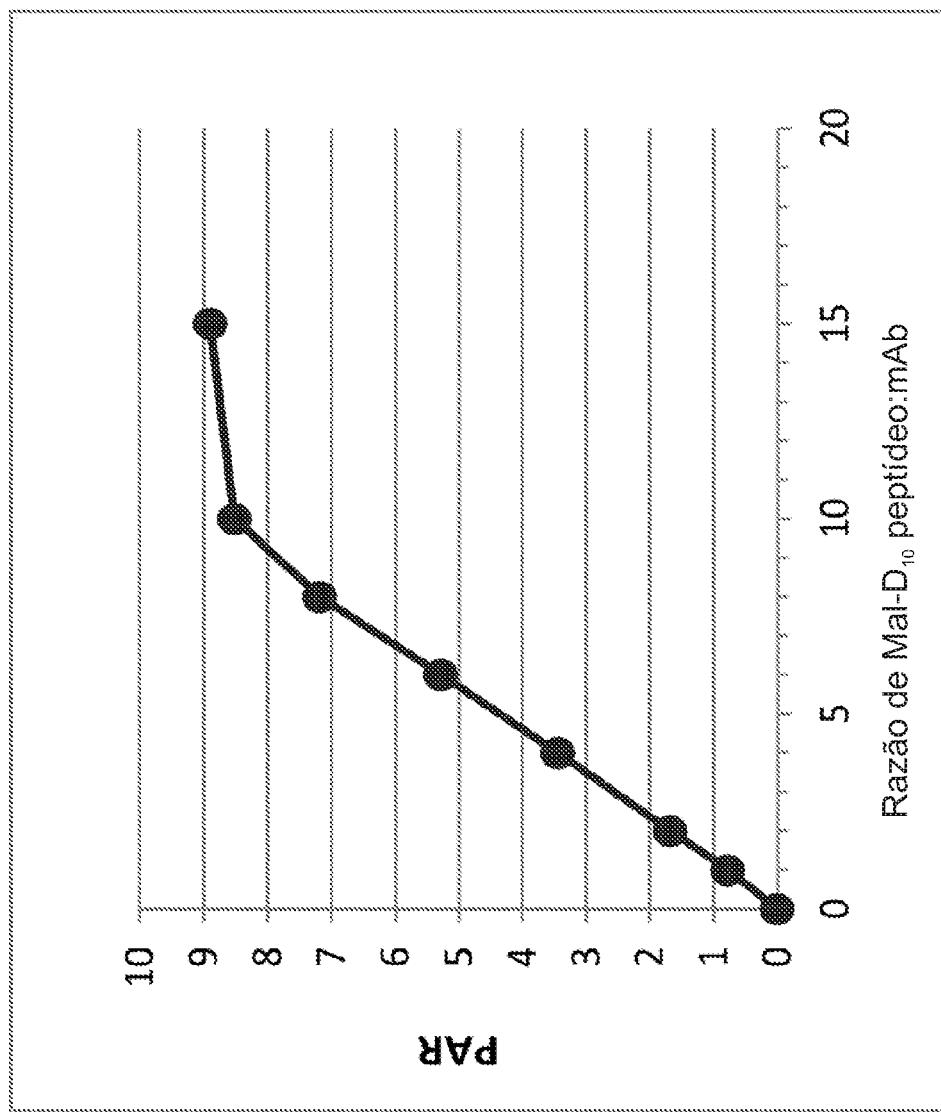
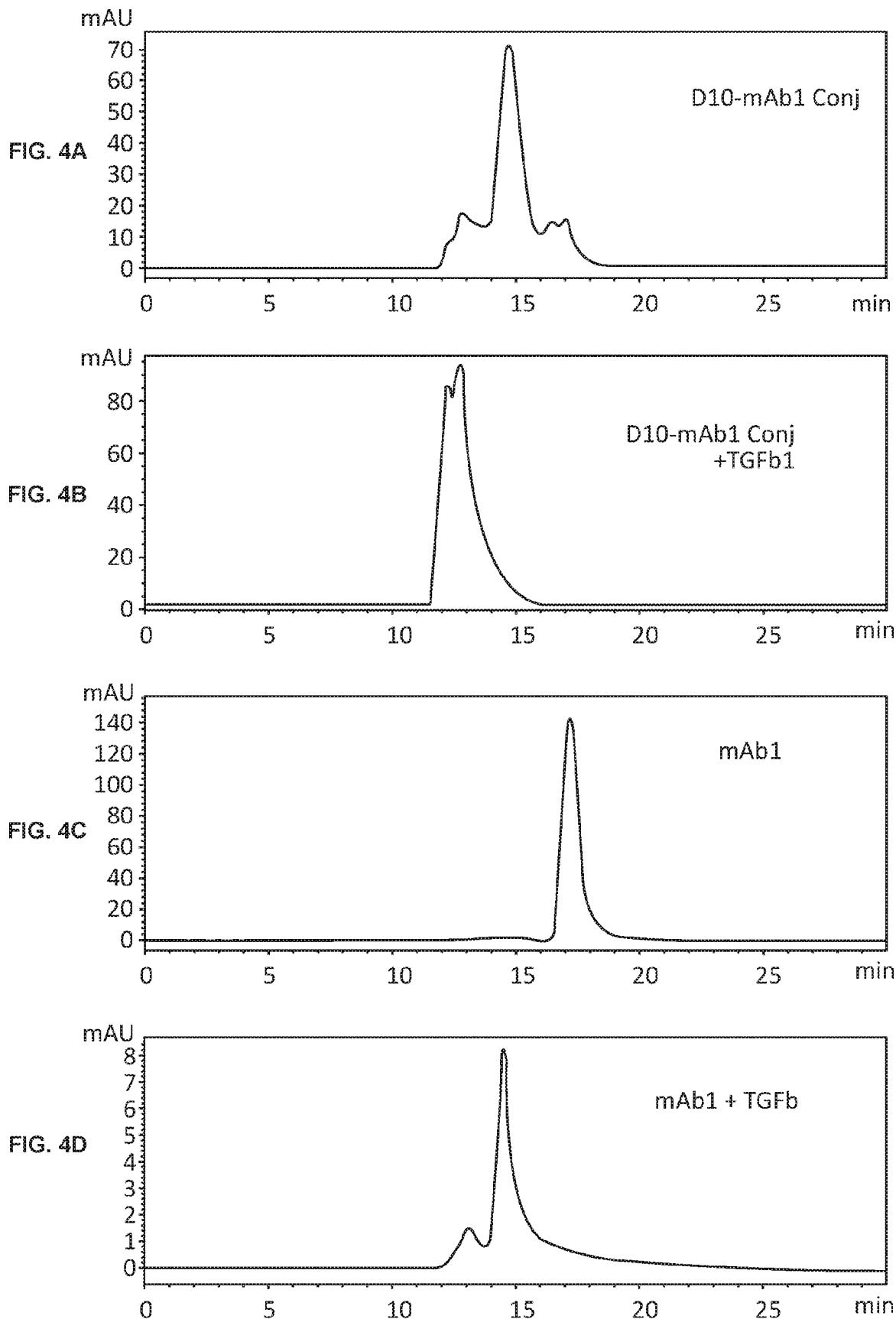
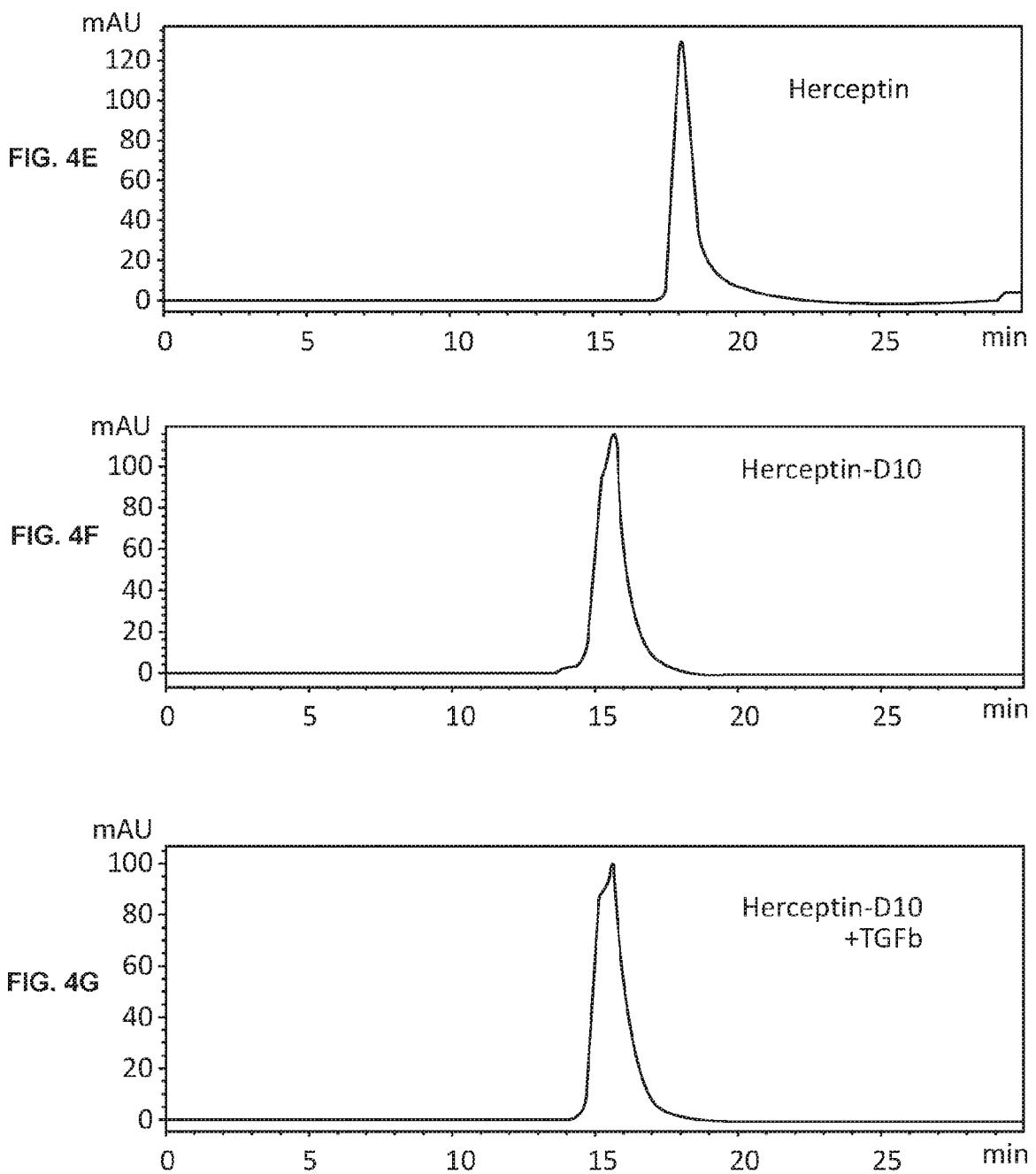


FIG. 3B





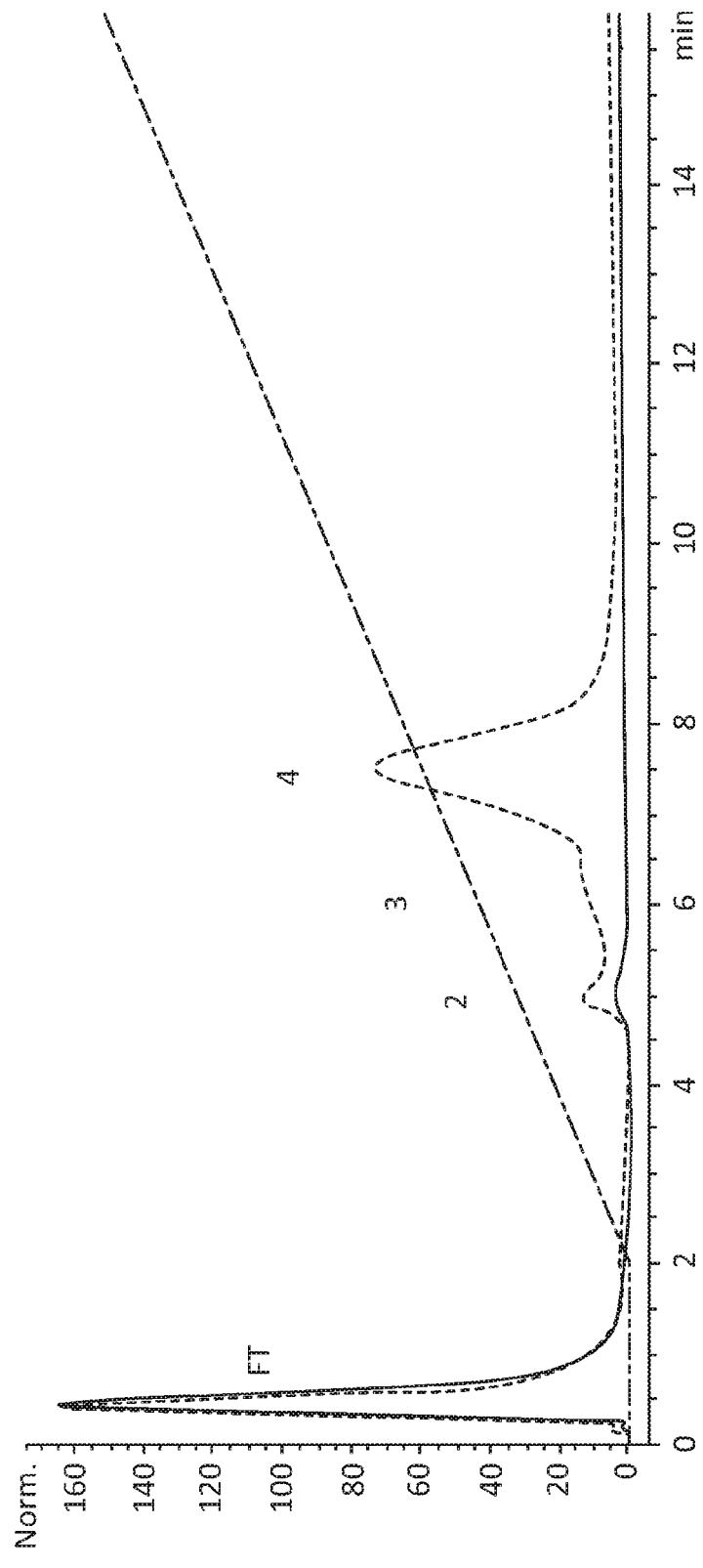


FIG. 5A

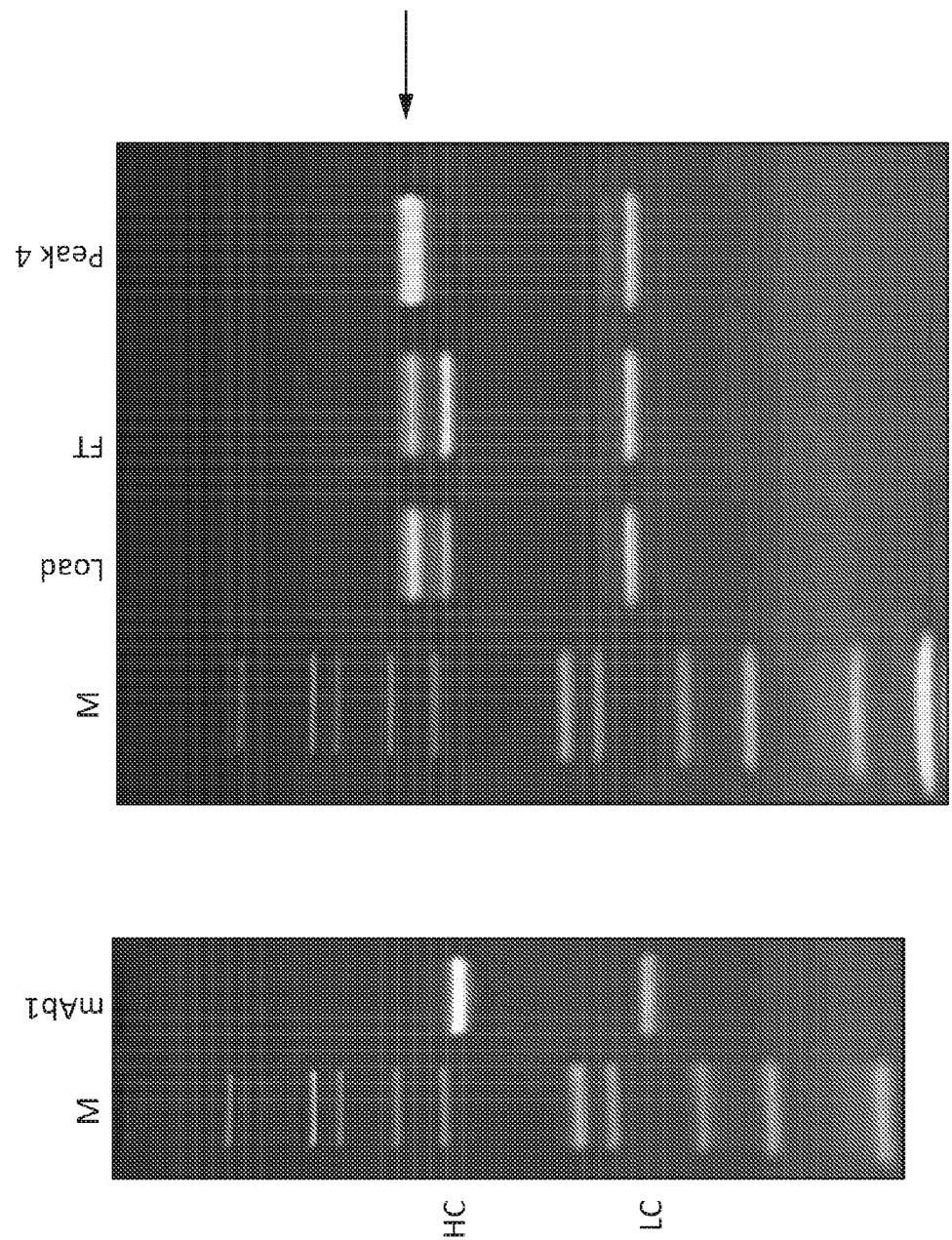
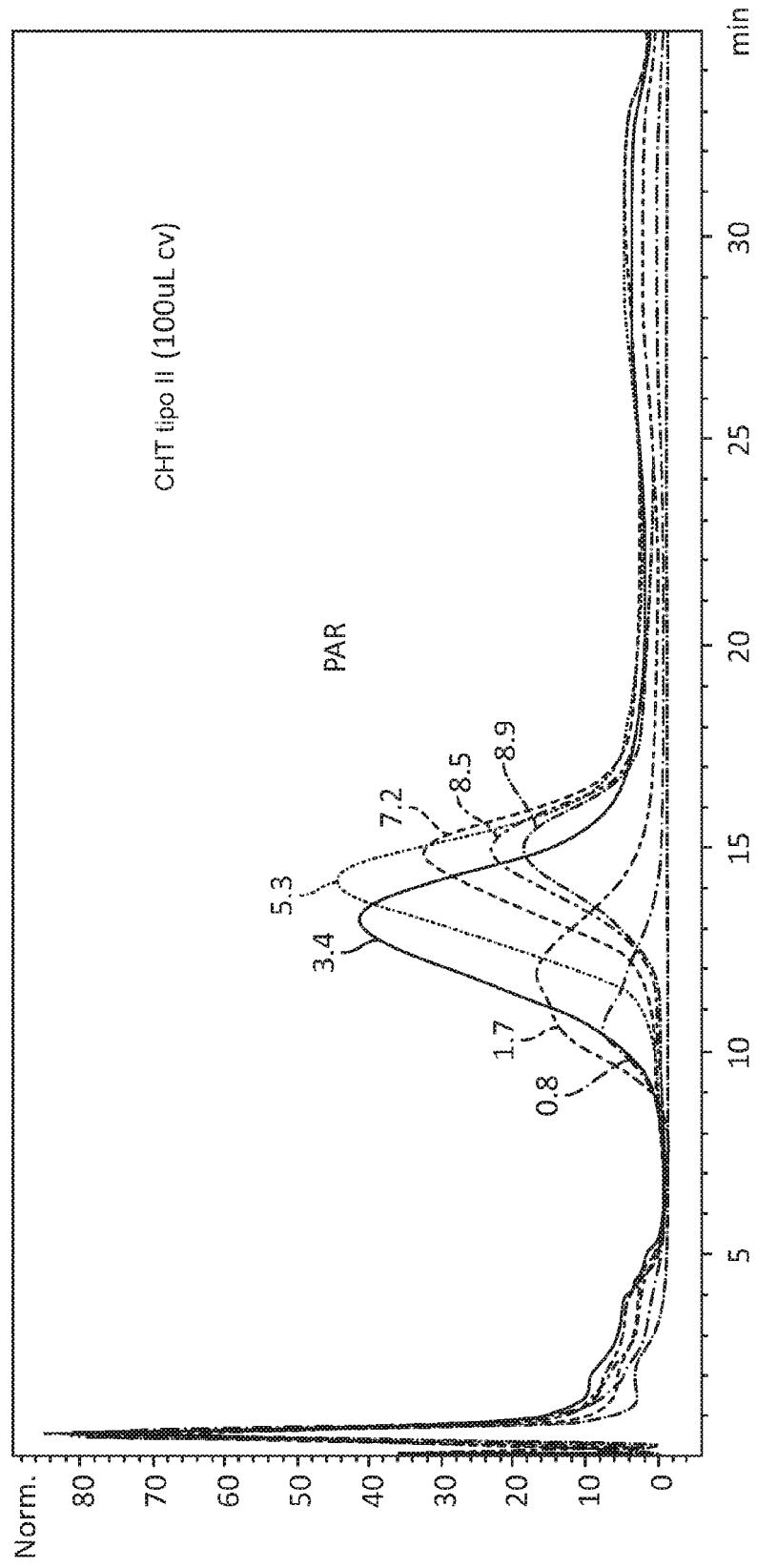


FIG. 5B

FIG. 6A



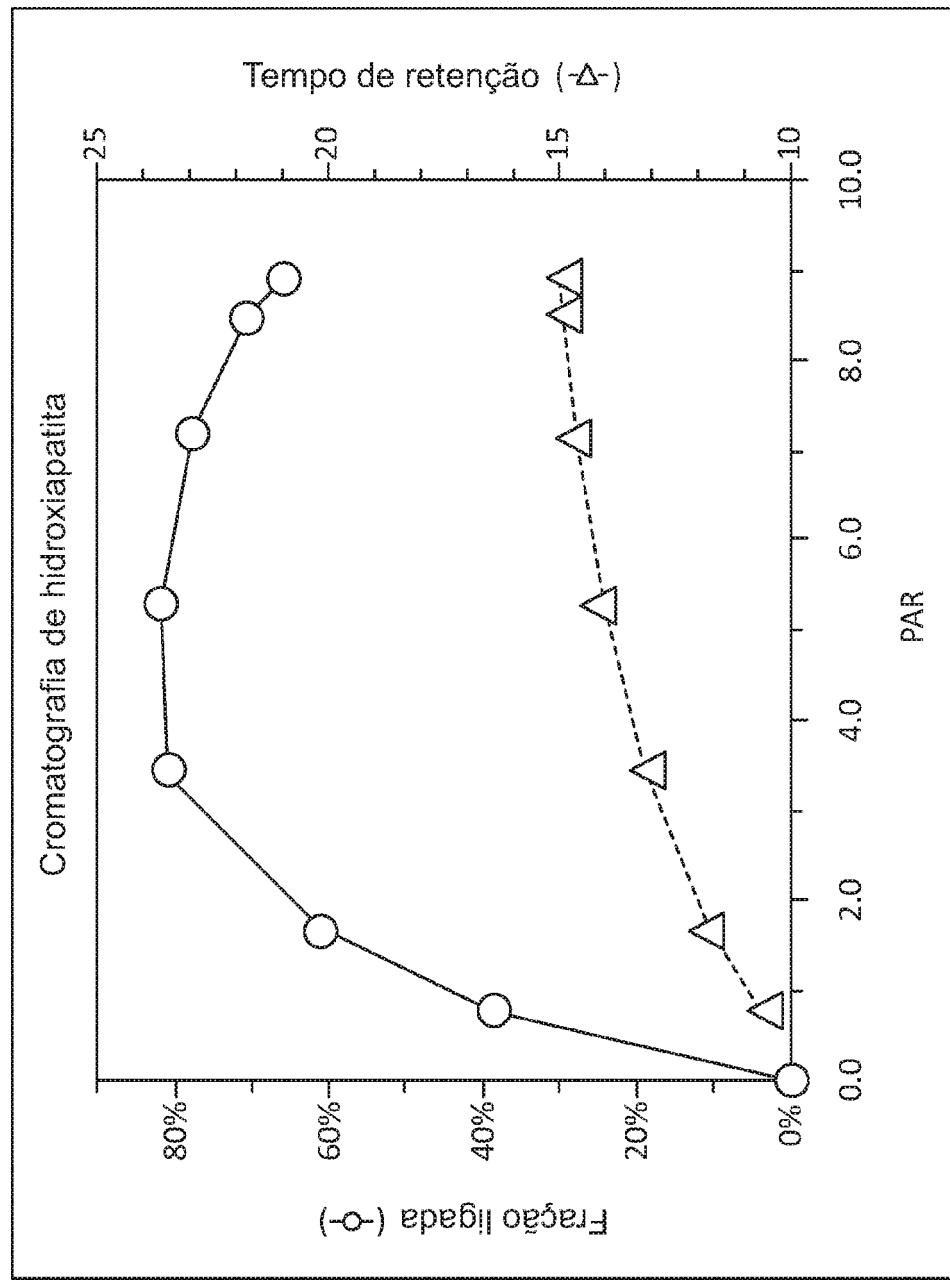


FIG. 6B

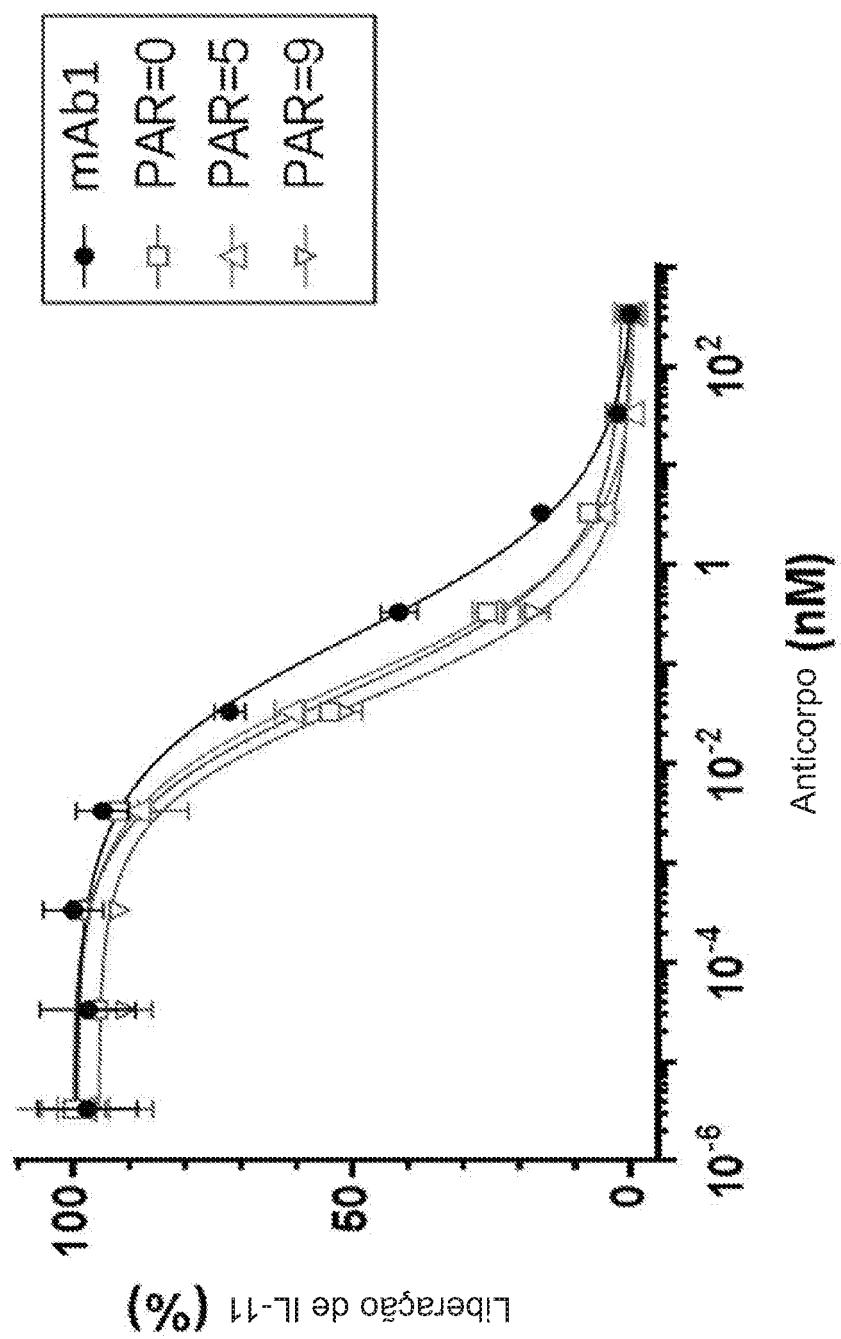


FIG. 7

FIG. 8A

PAR 4,5 marcado com AlexaFluor 750

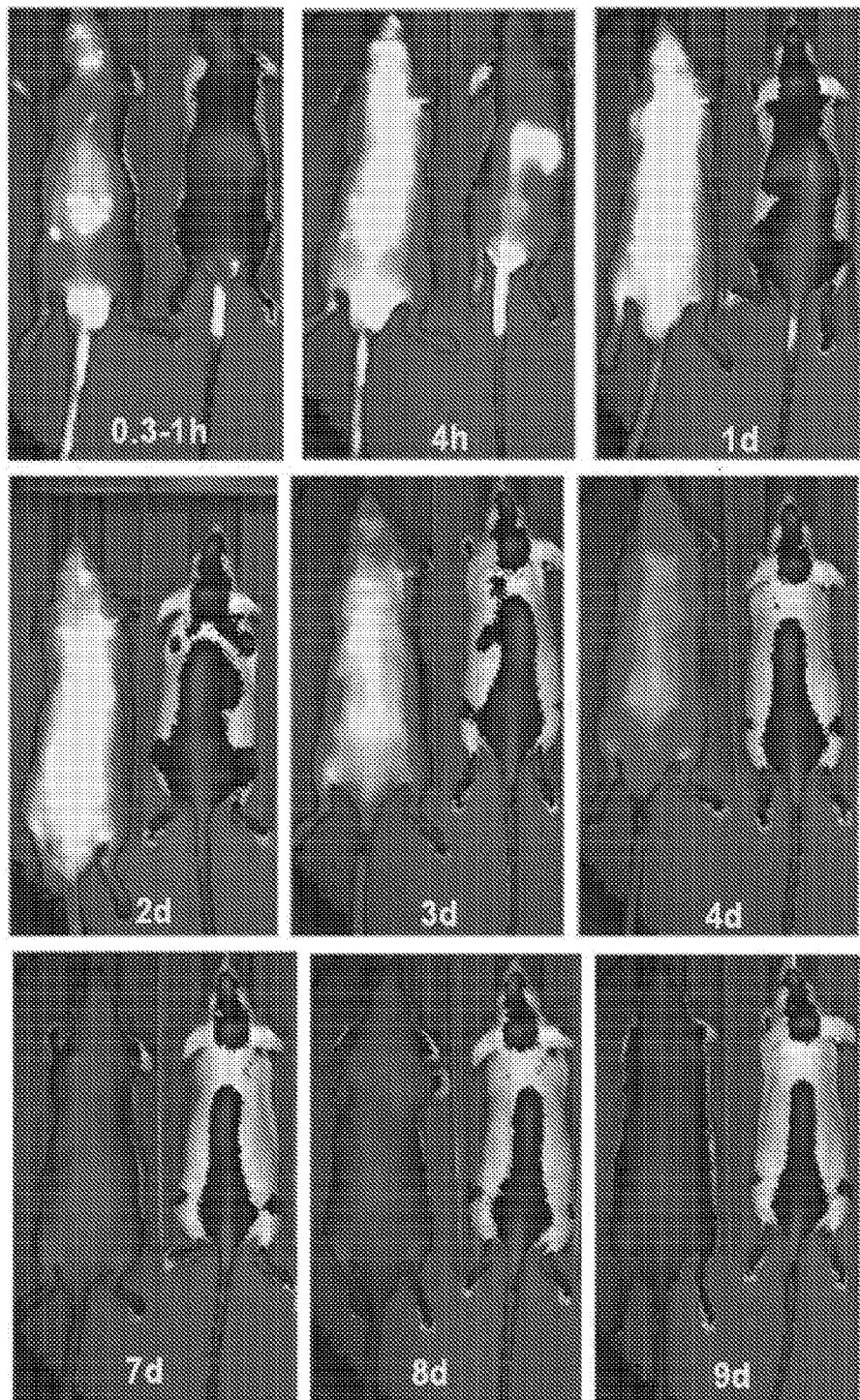
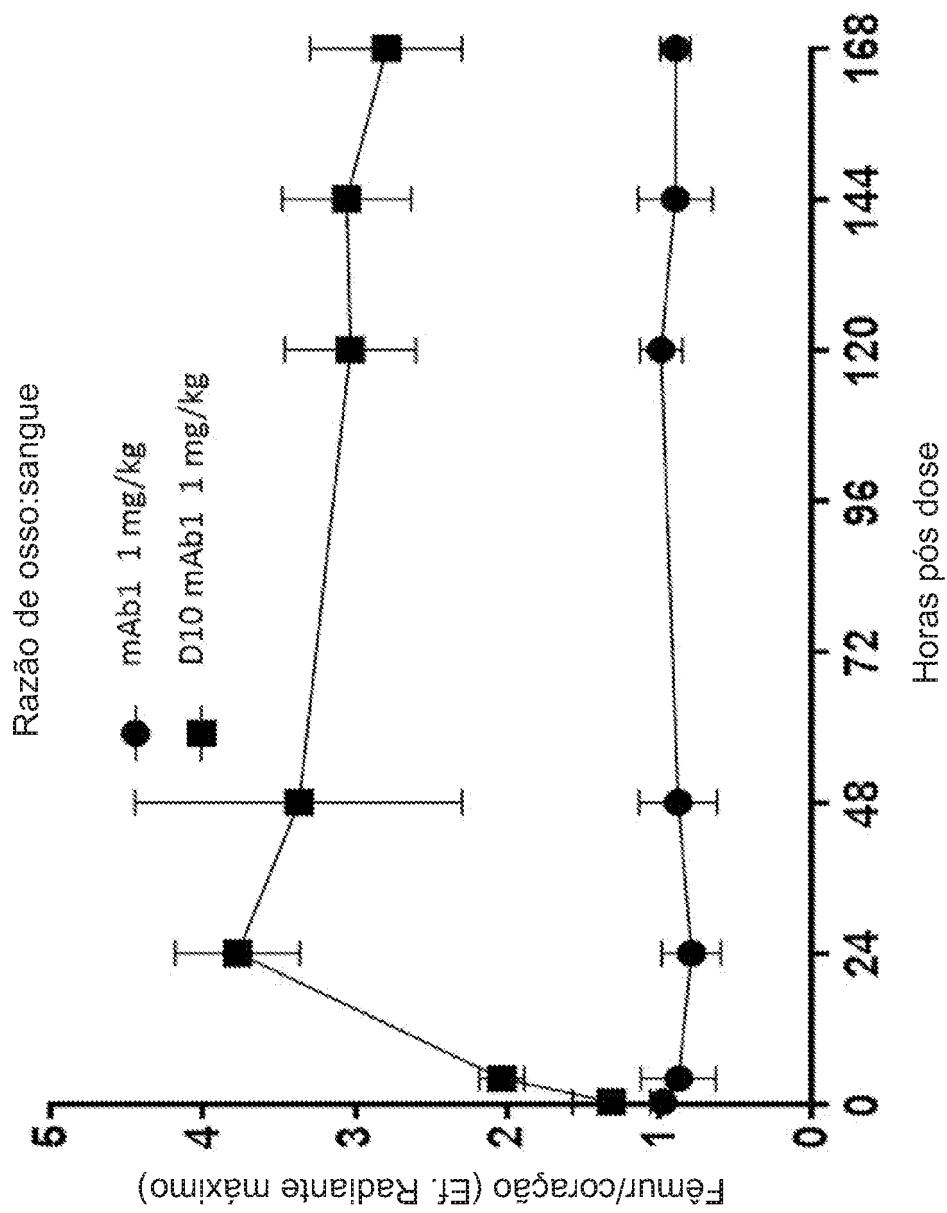


FIG. 8B



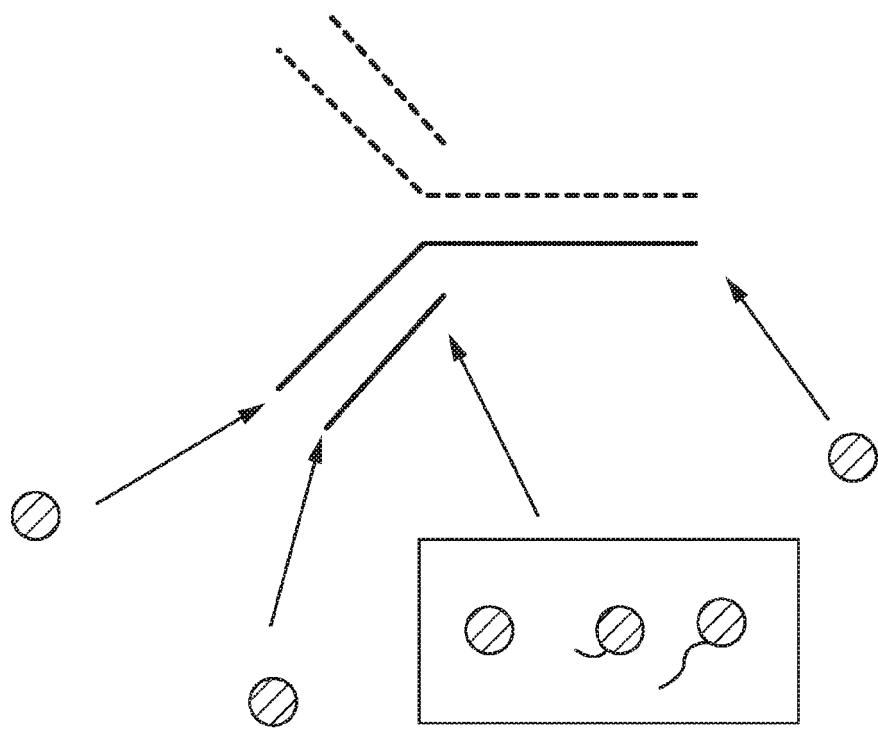


FIG. 9A

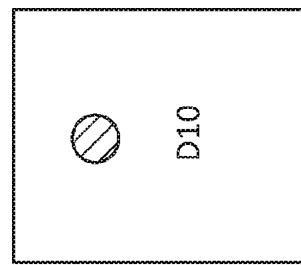


FIG. 9B

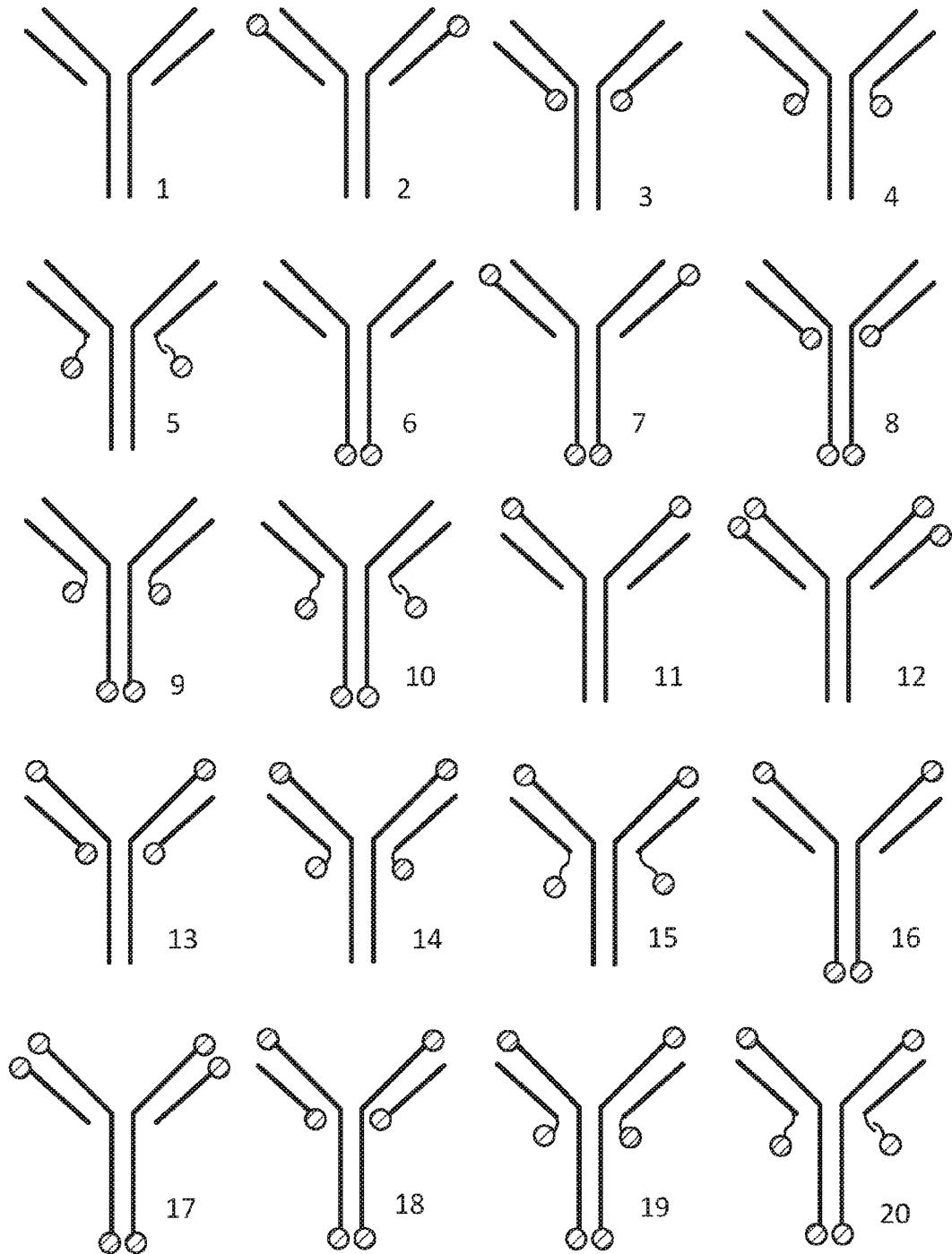
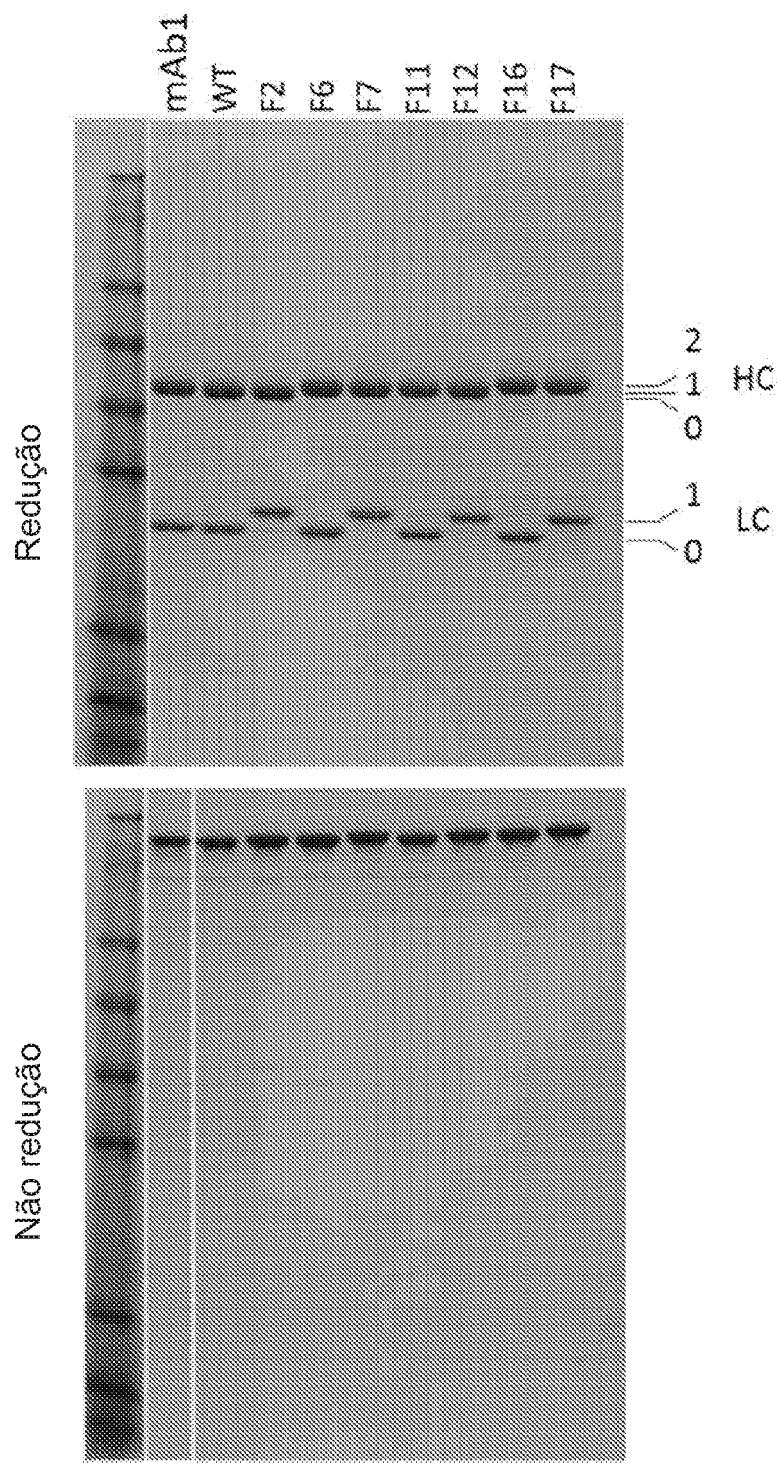
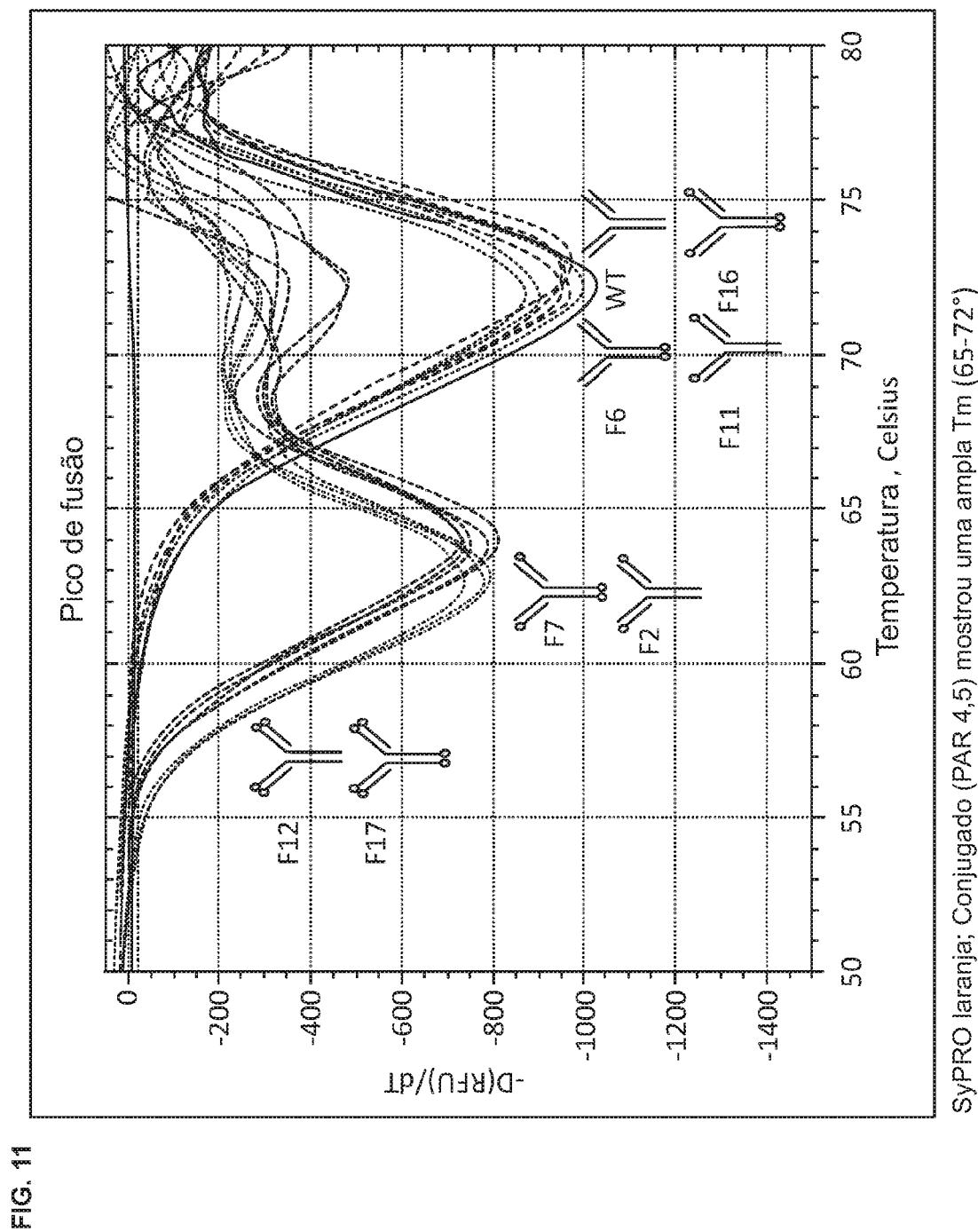
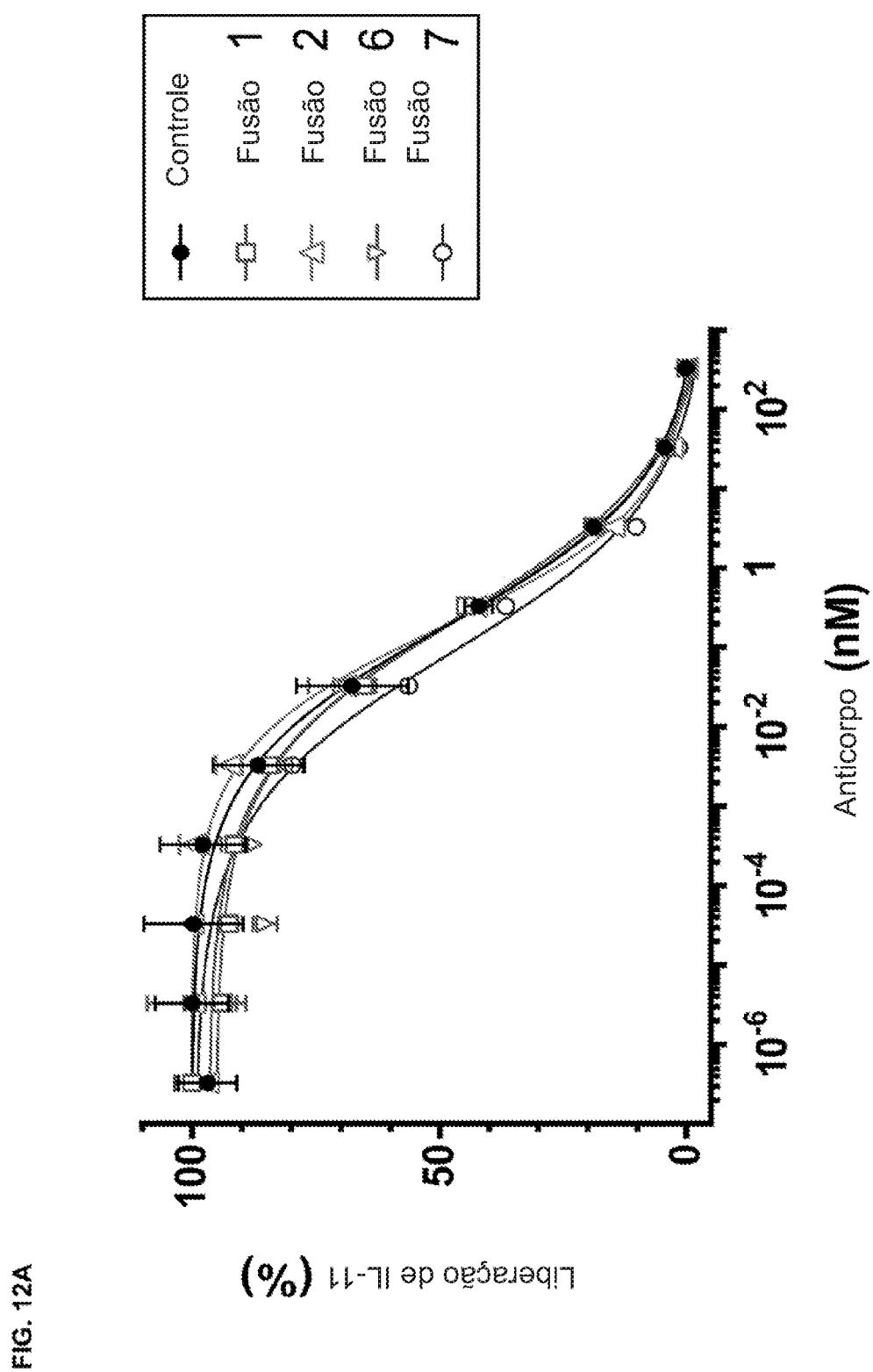


FIG. 10





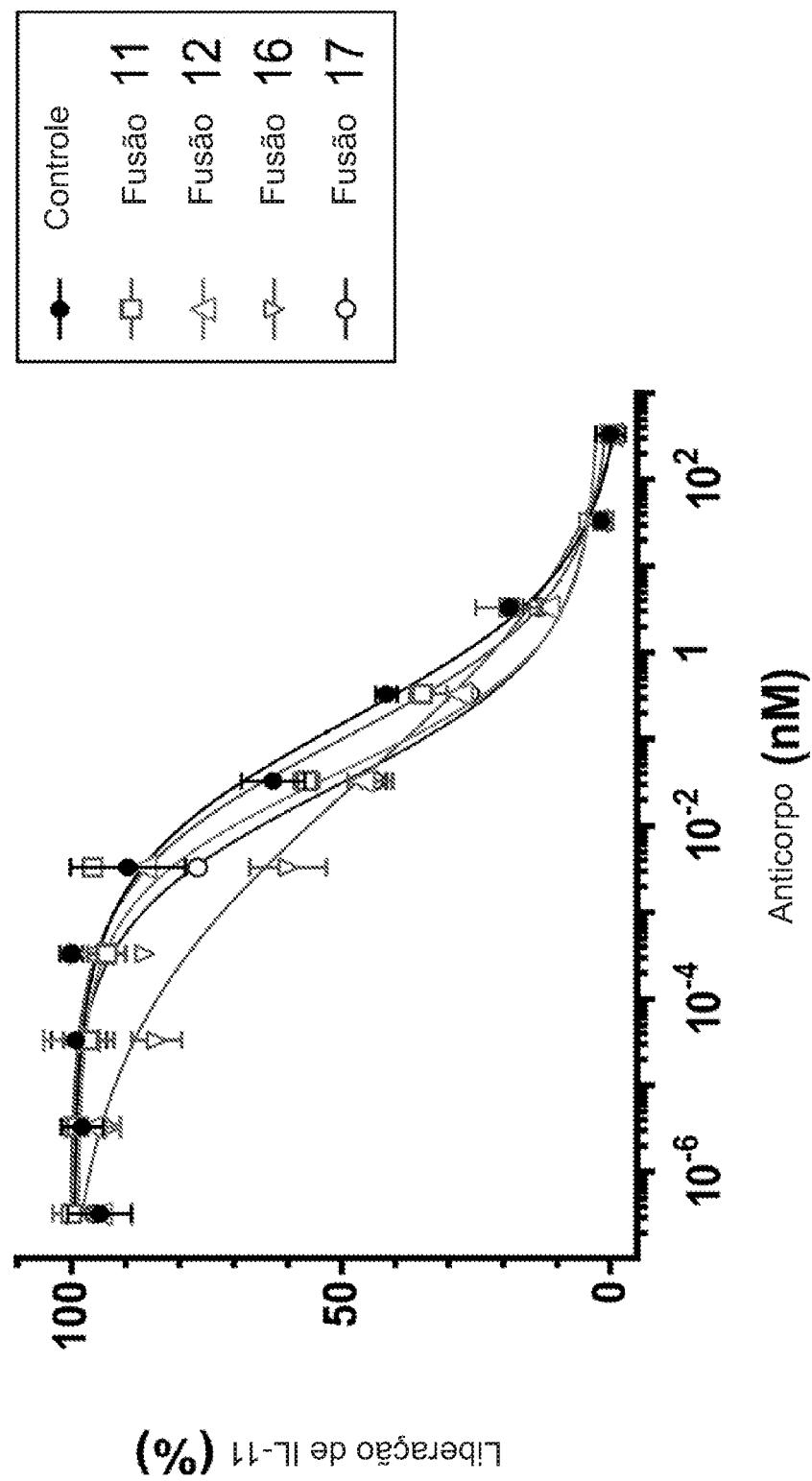


FIG. 12B

Liberação de IL-11 (%)

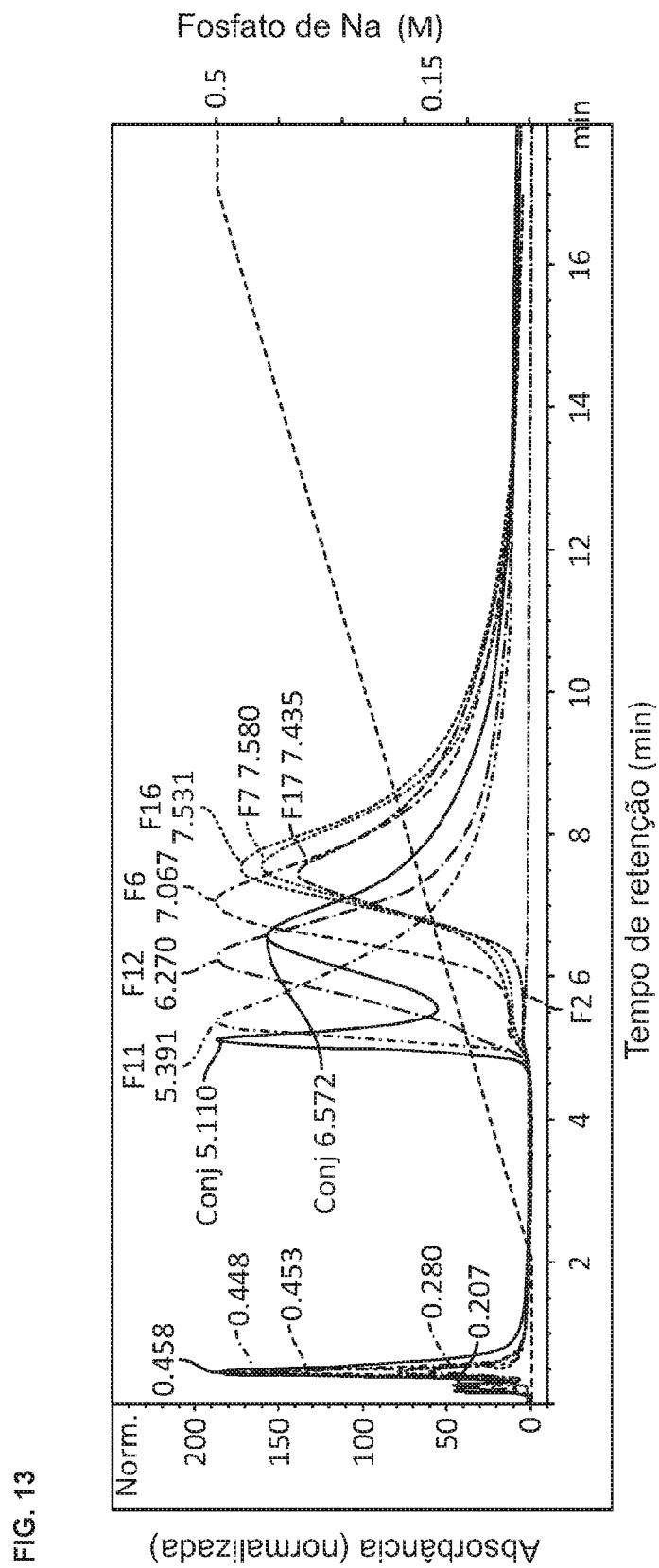
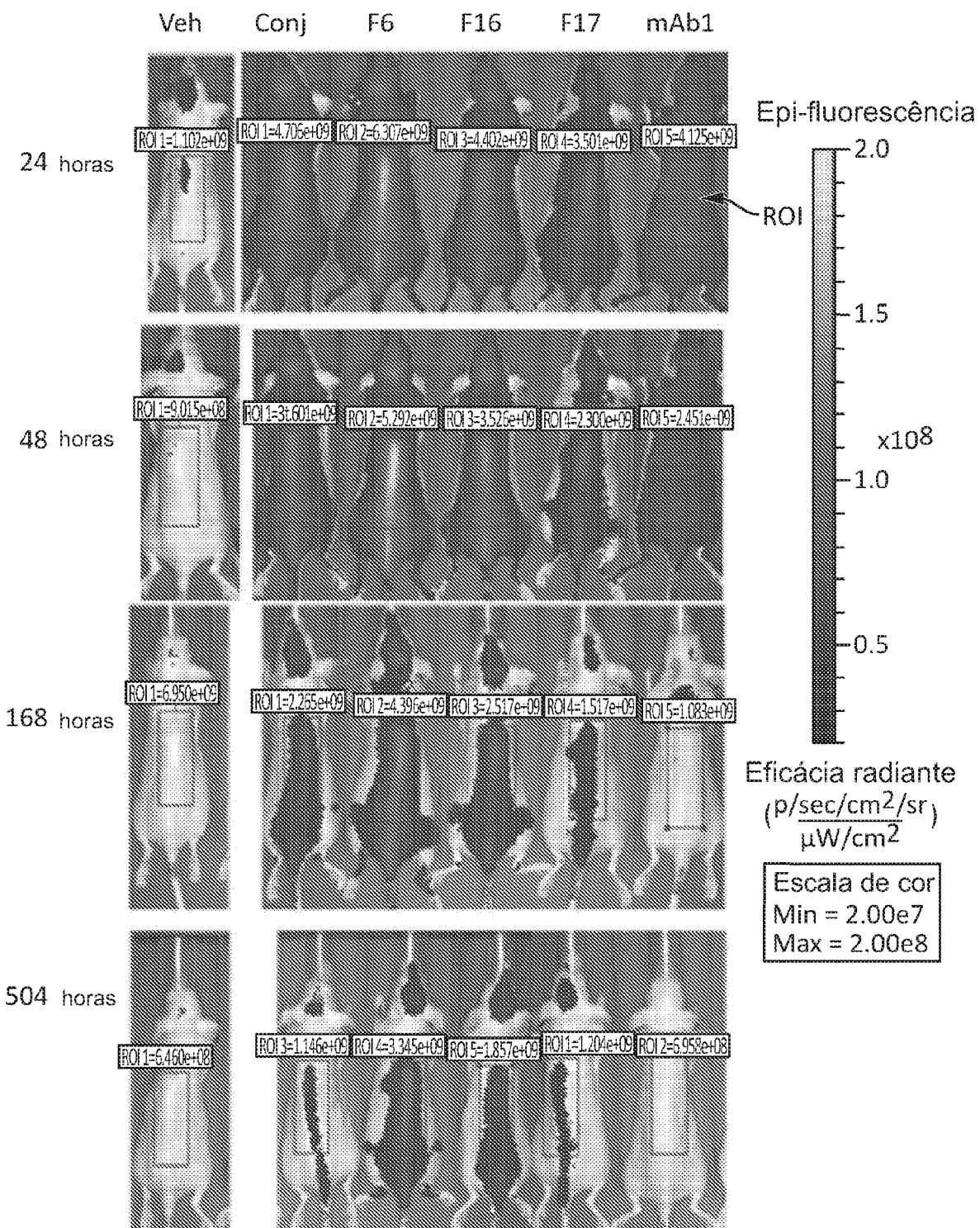


FIG. 13

FIG. 14



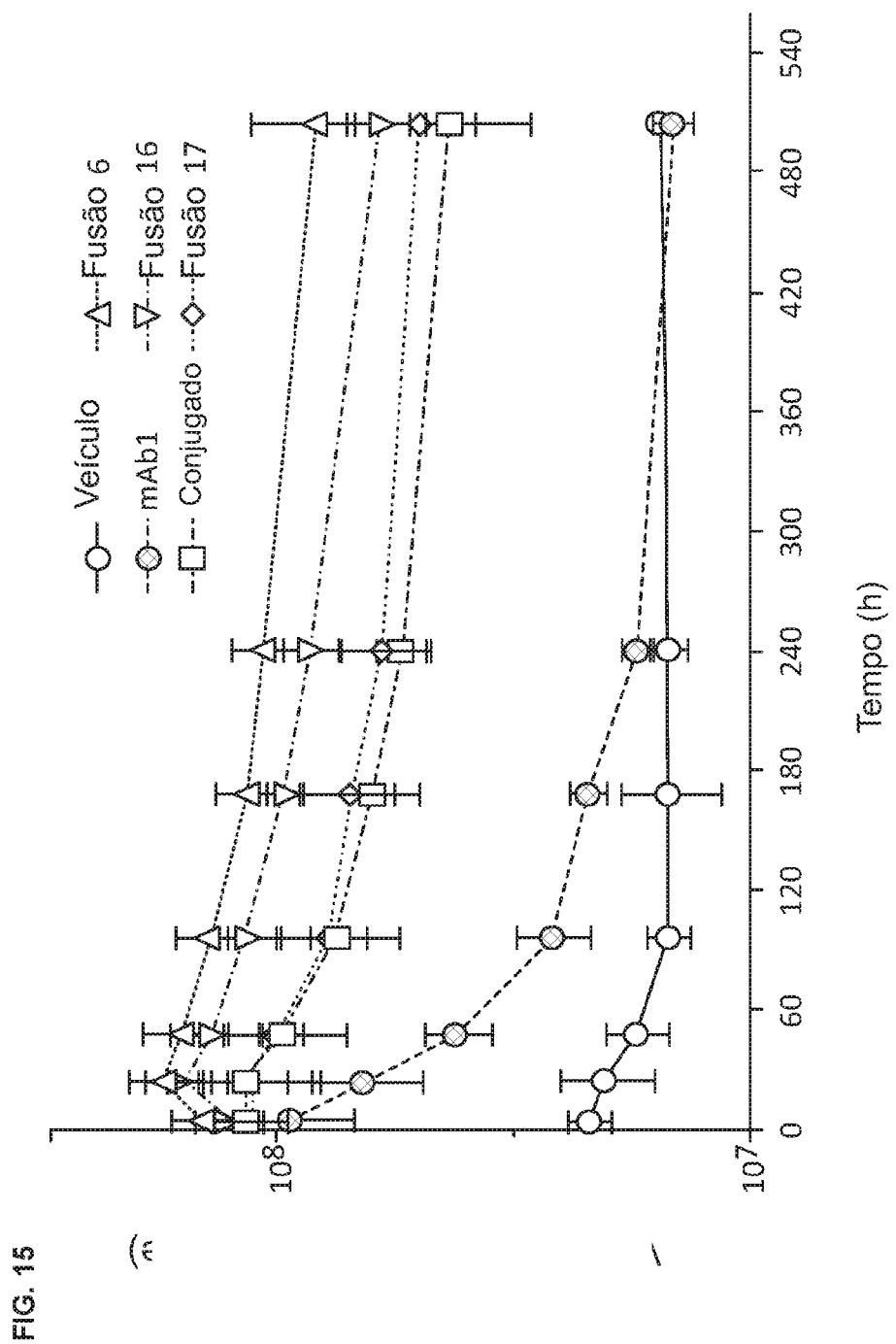
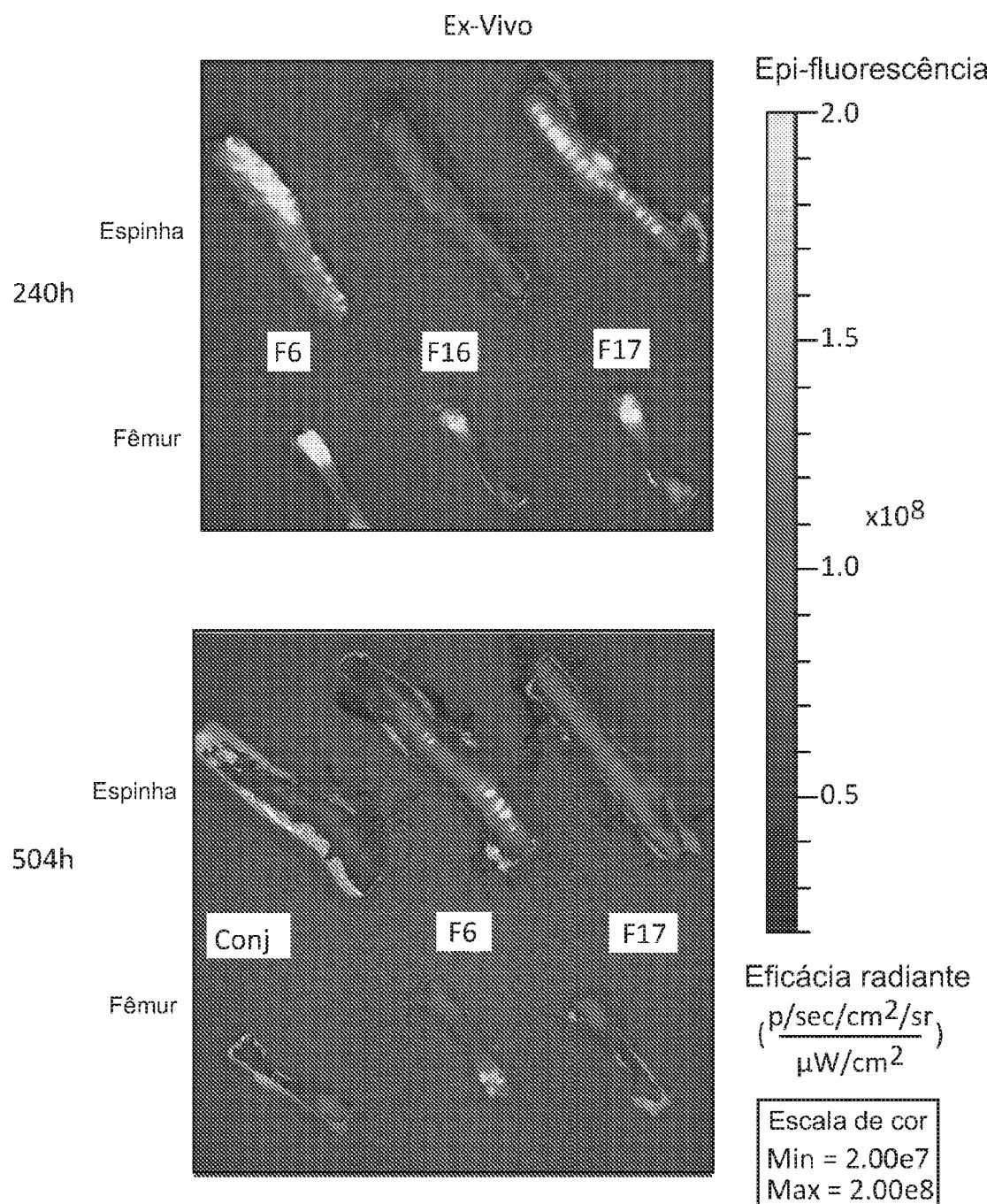


FIG. 16

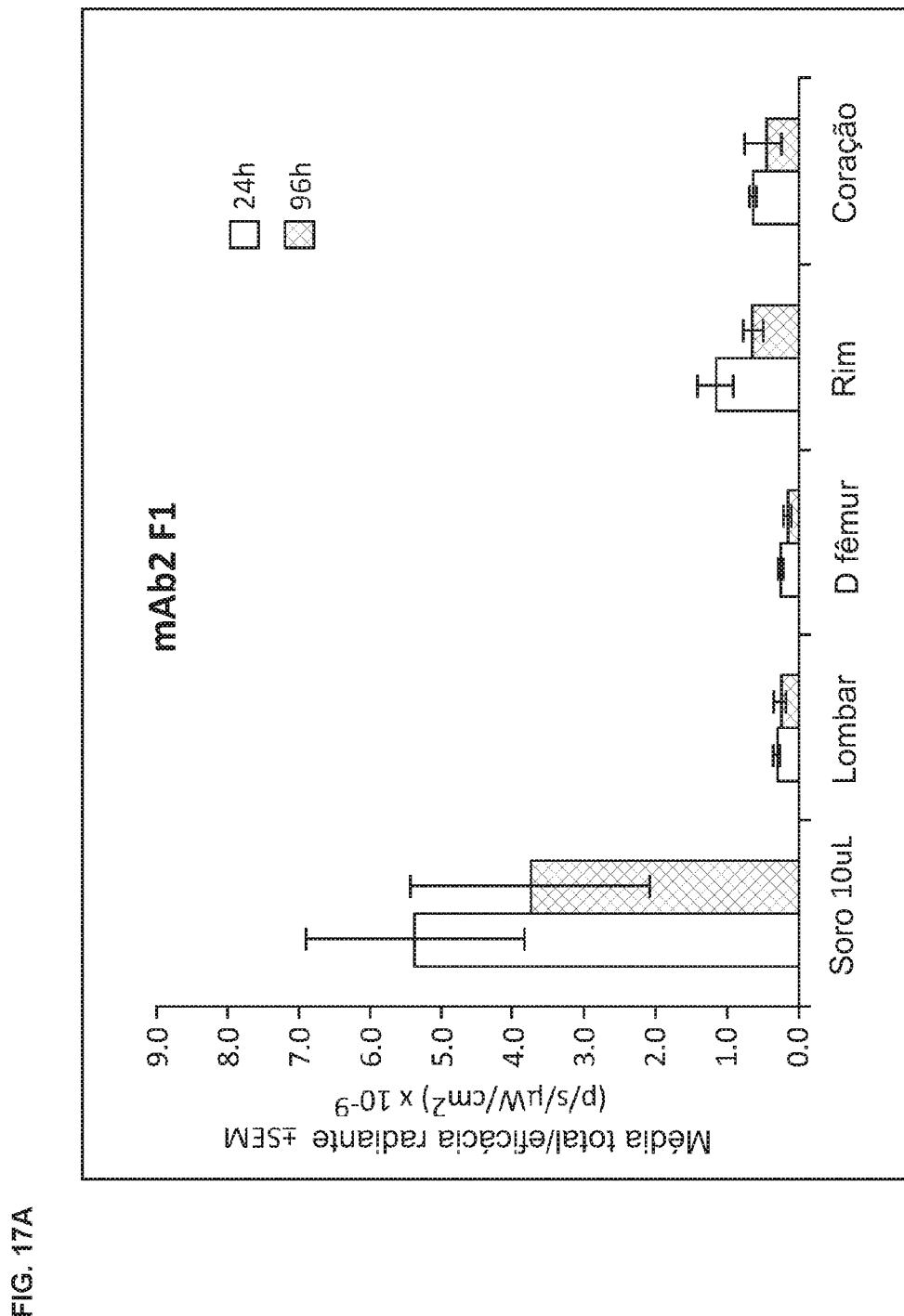


FIG. 17A

FIG. 17B

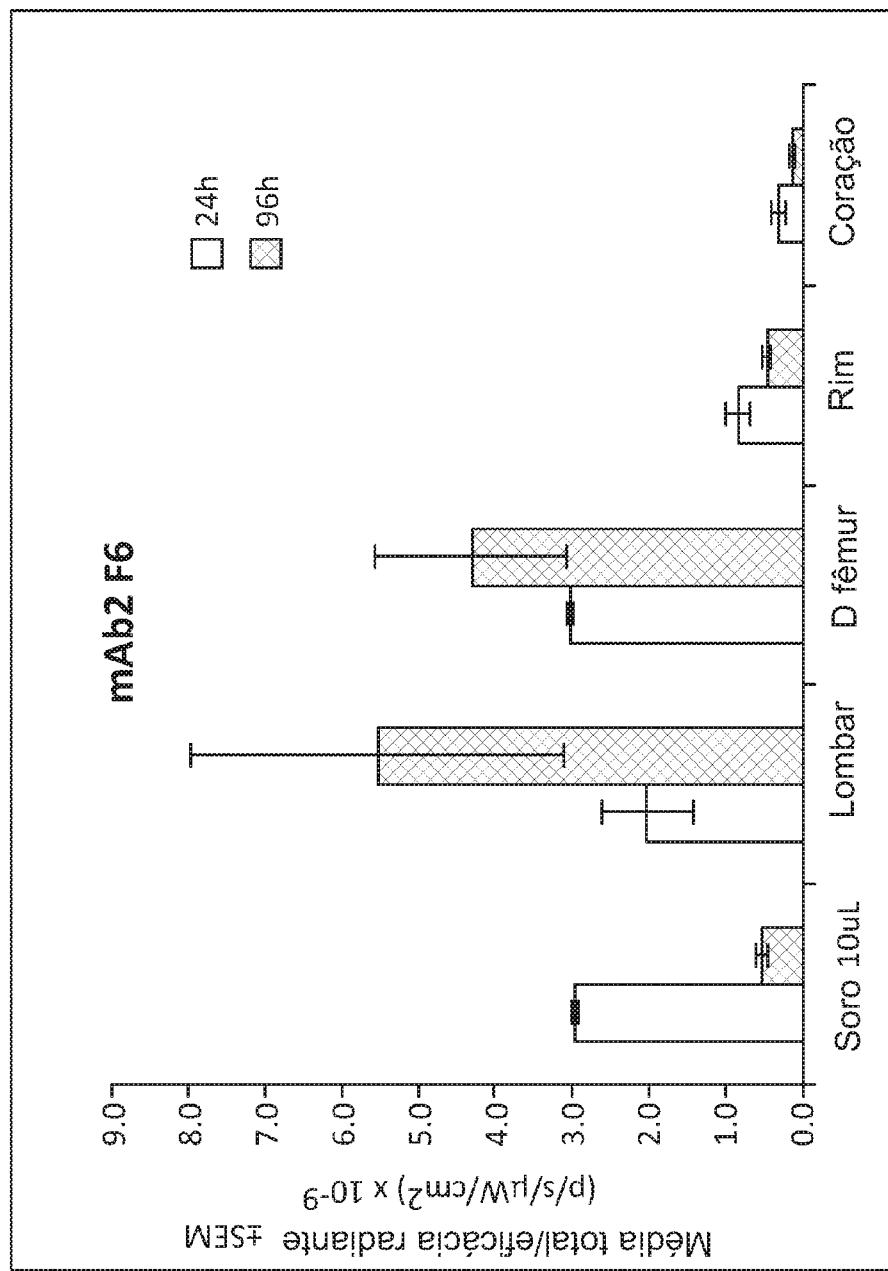
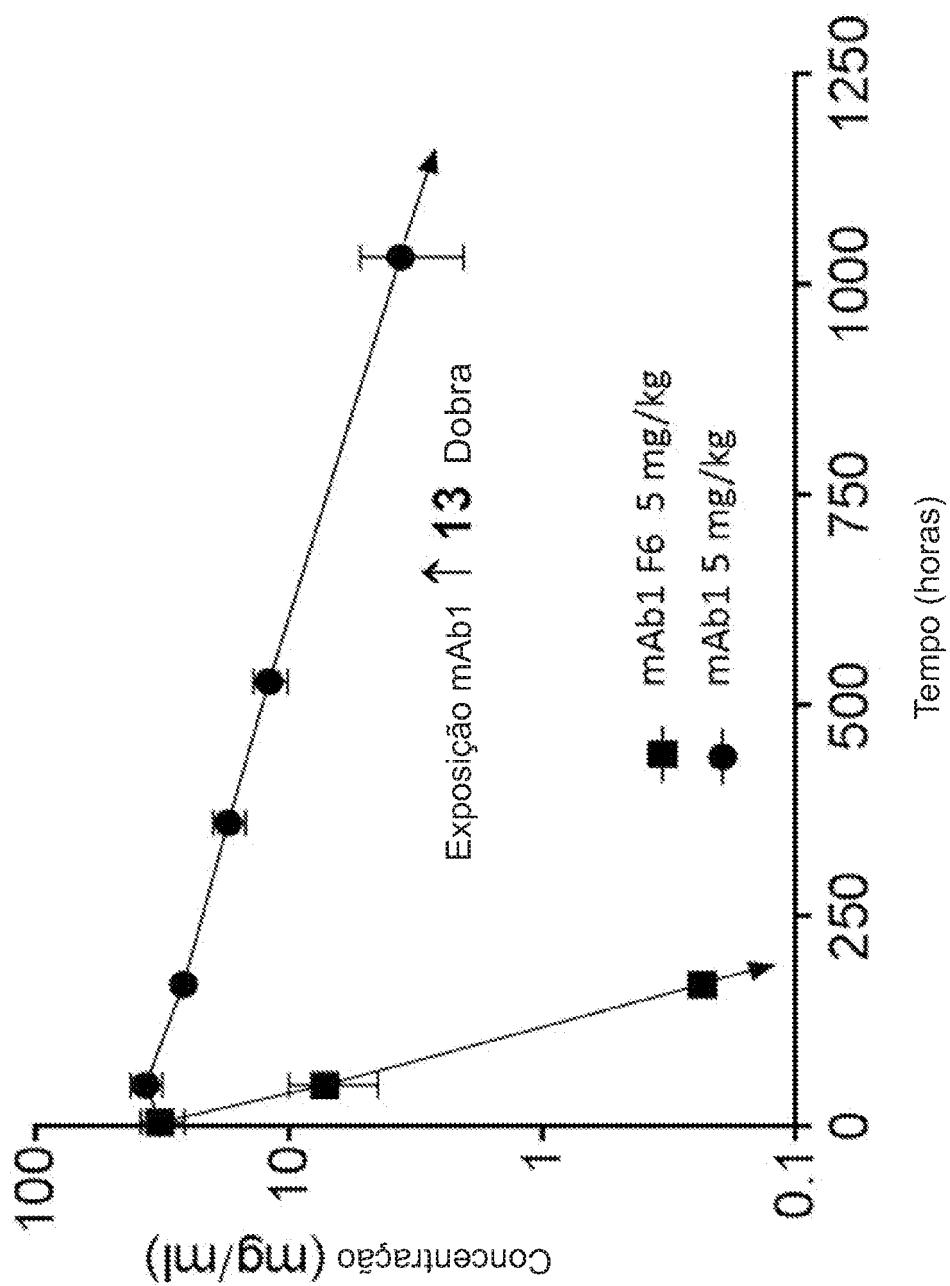


FIG. 18A



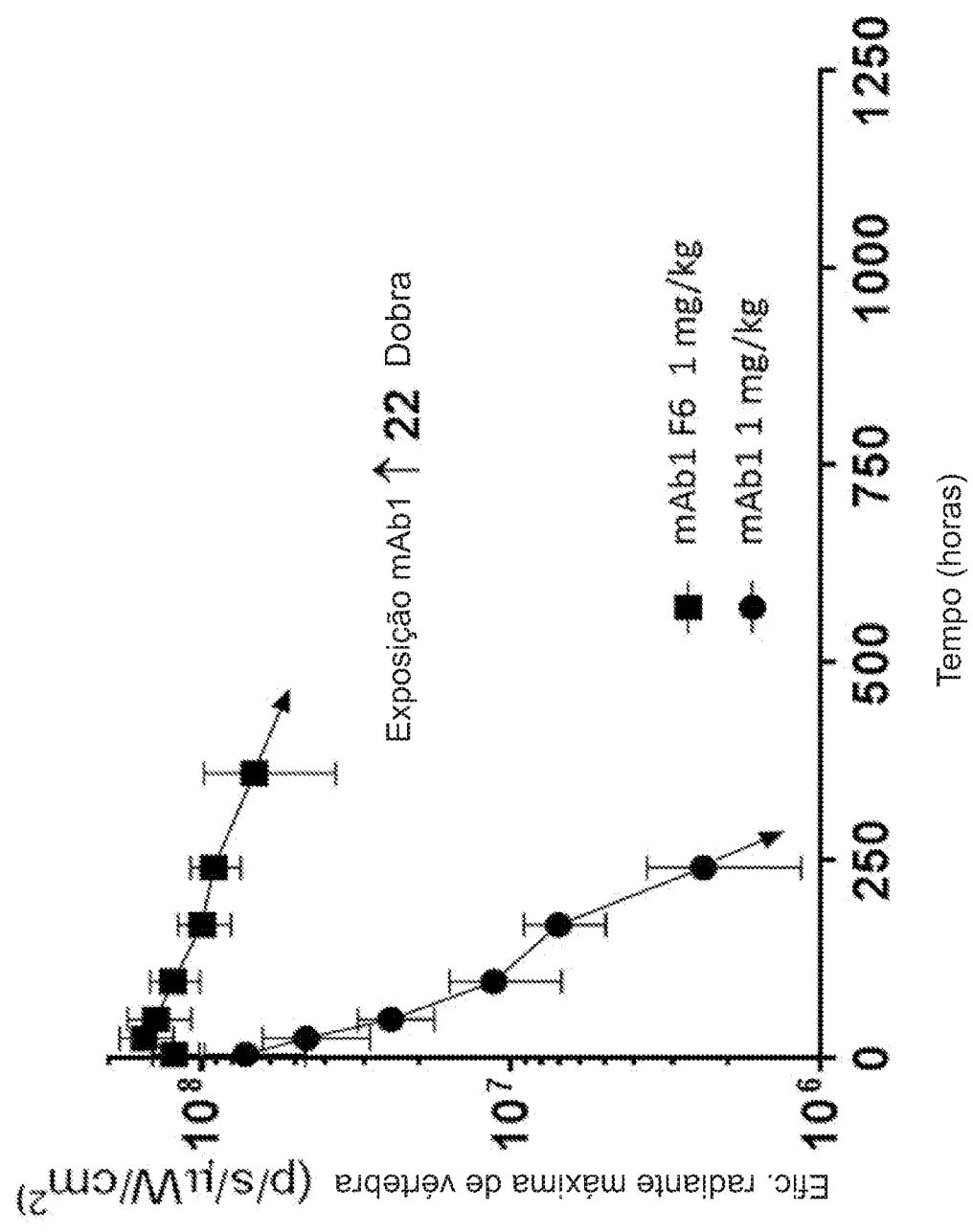
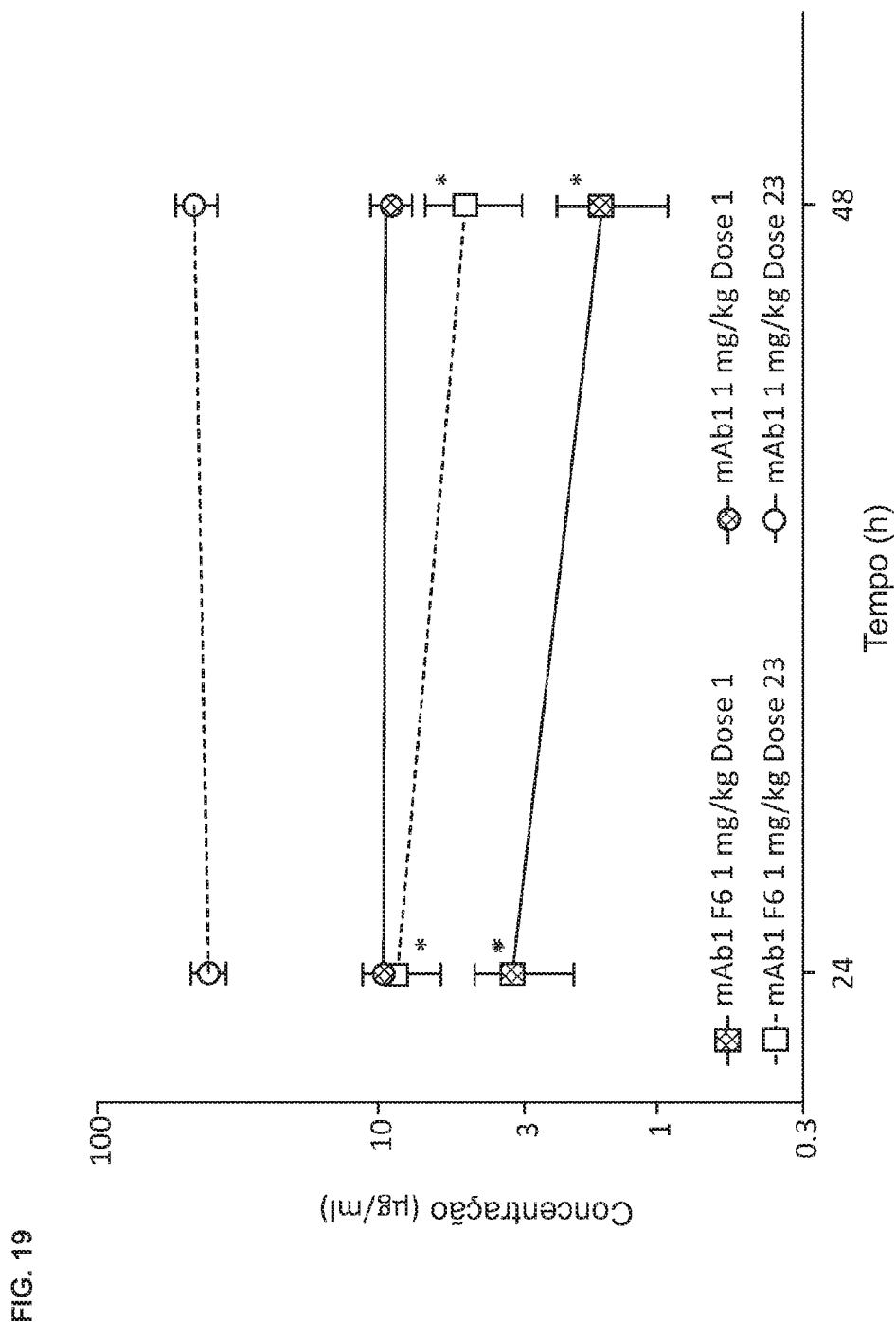
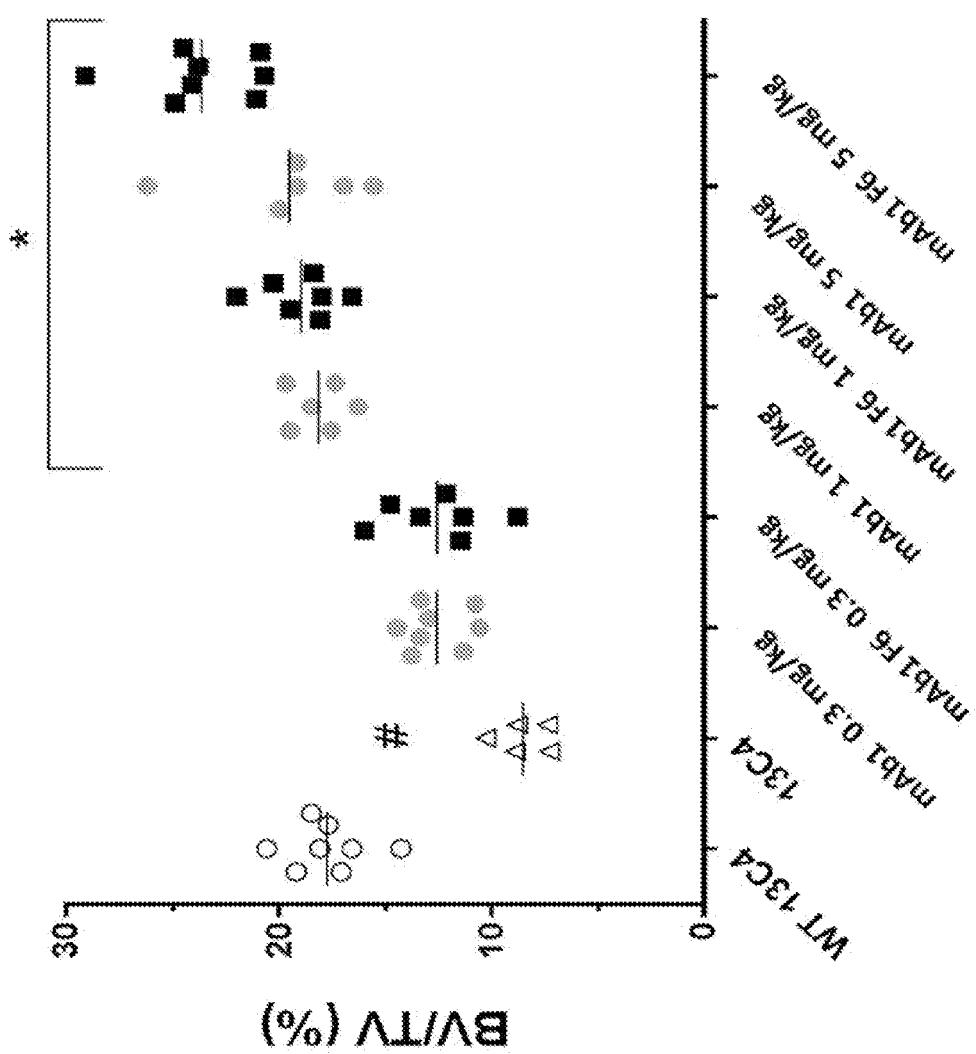


FIG. 18B





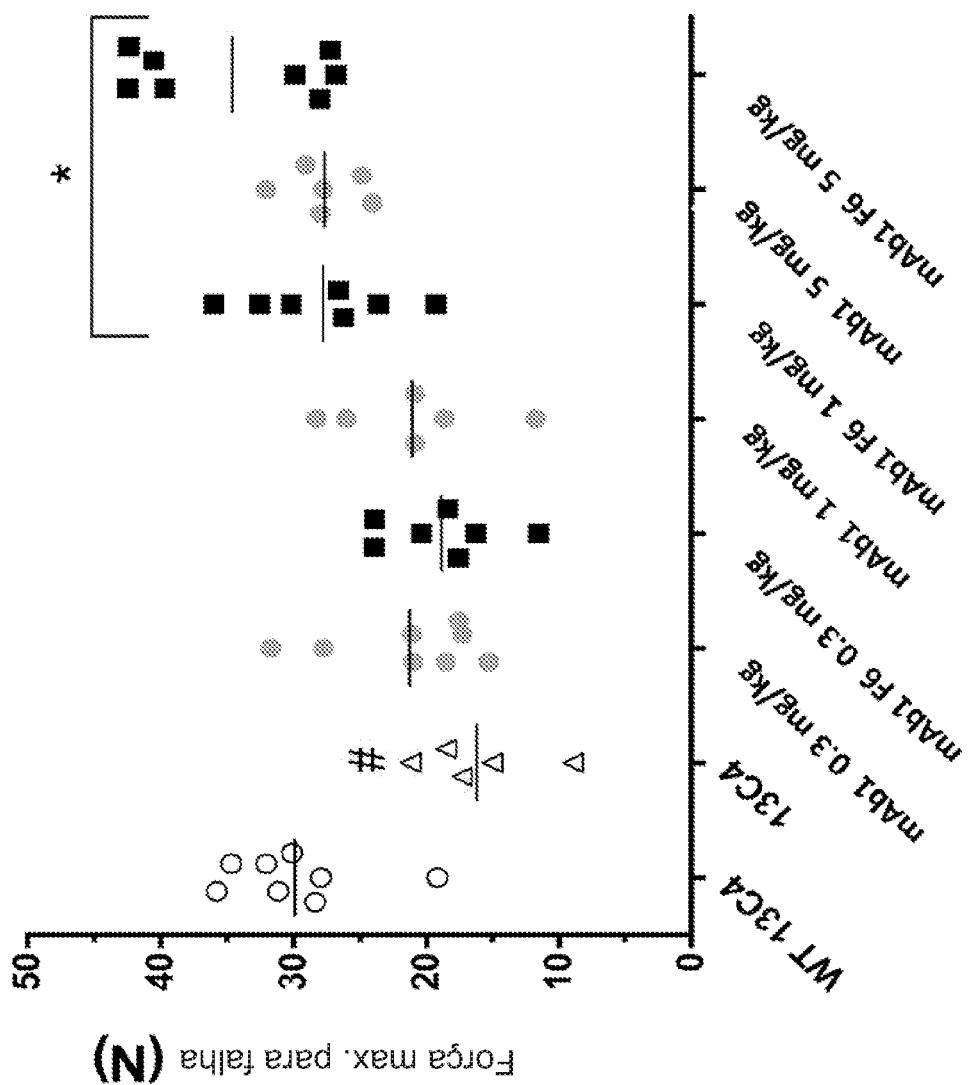


FIG. 21

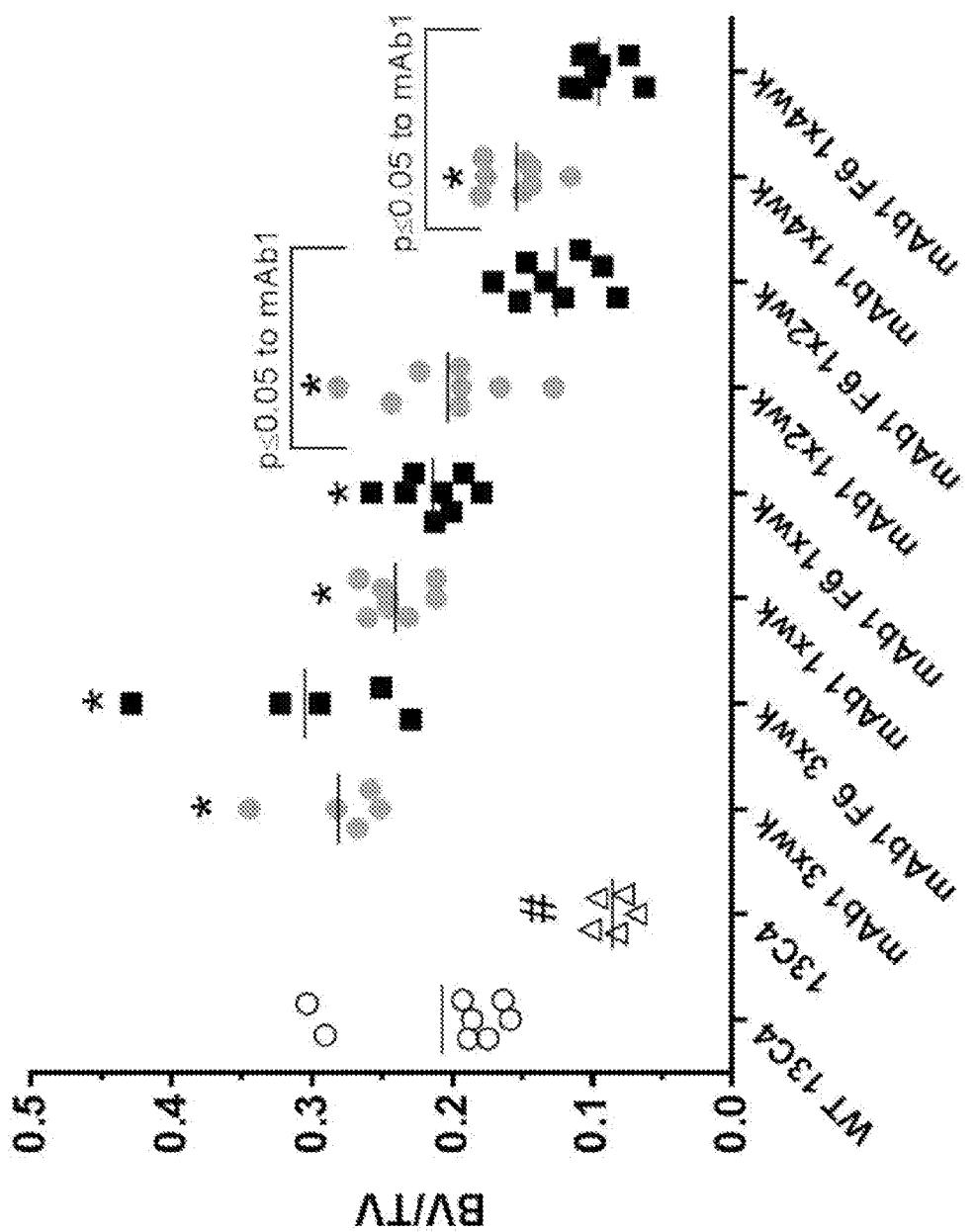


FIG. 22

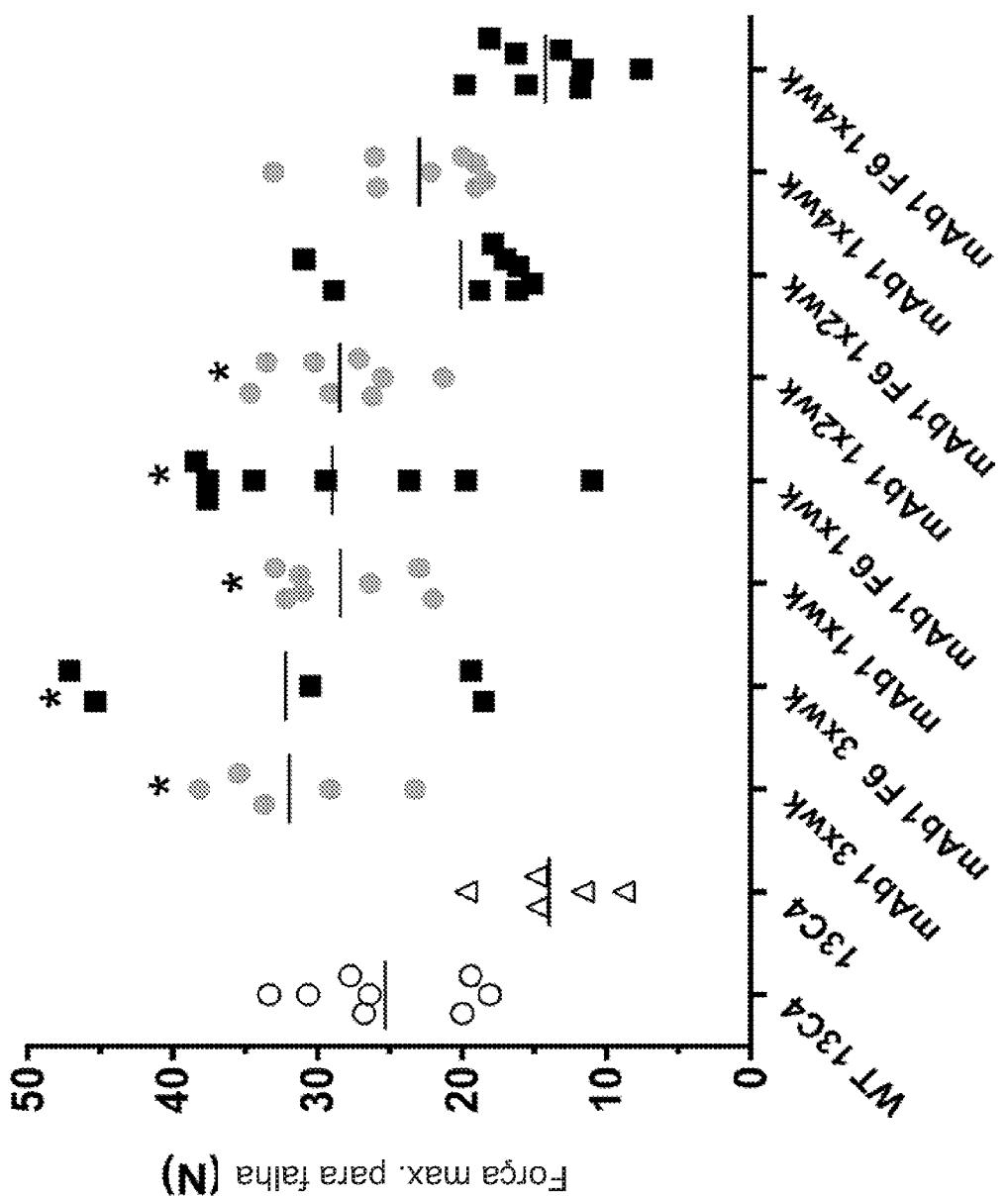


FIG. 23

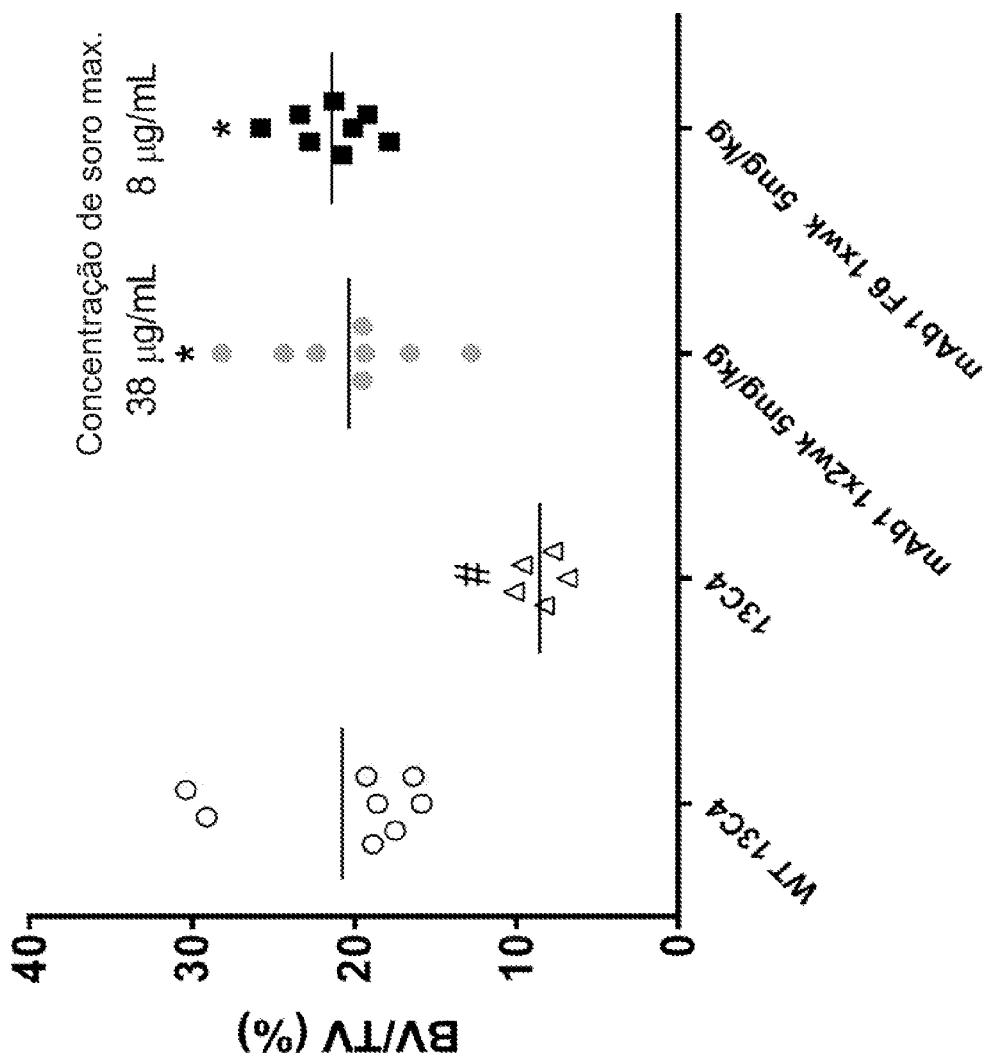


FIG. 24

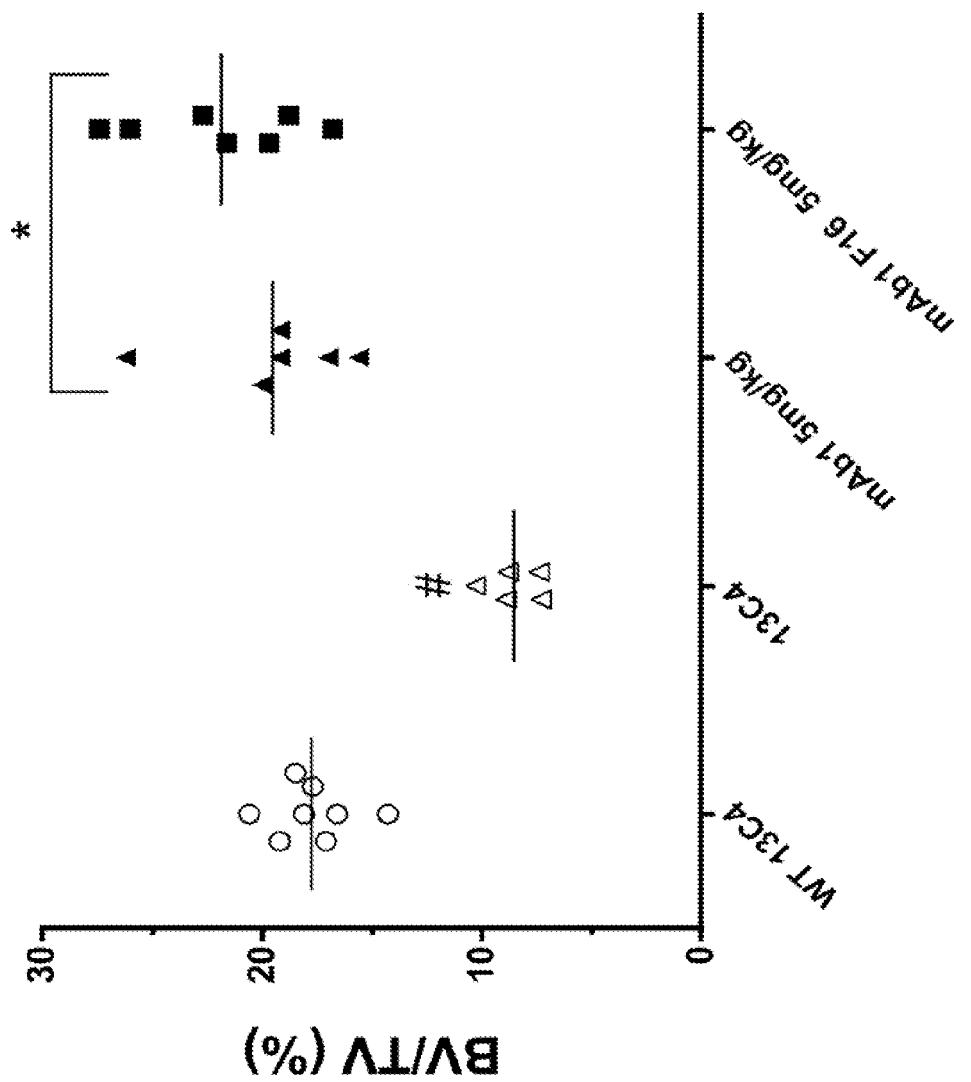


FIG. 25

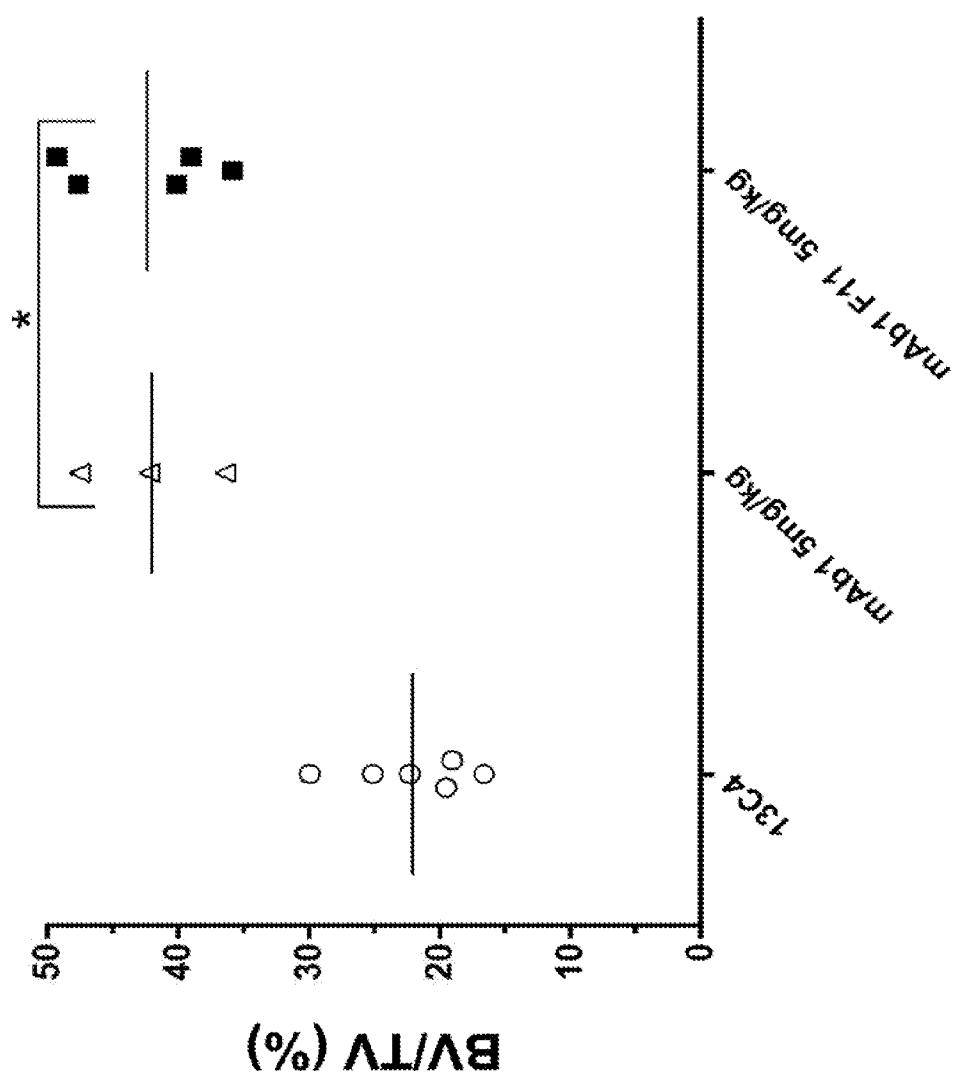


FIG. 26

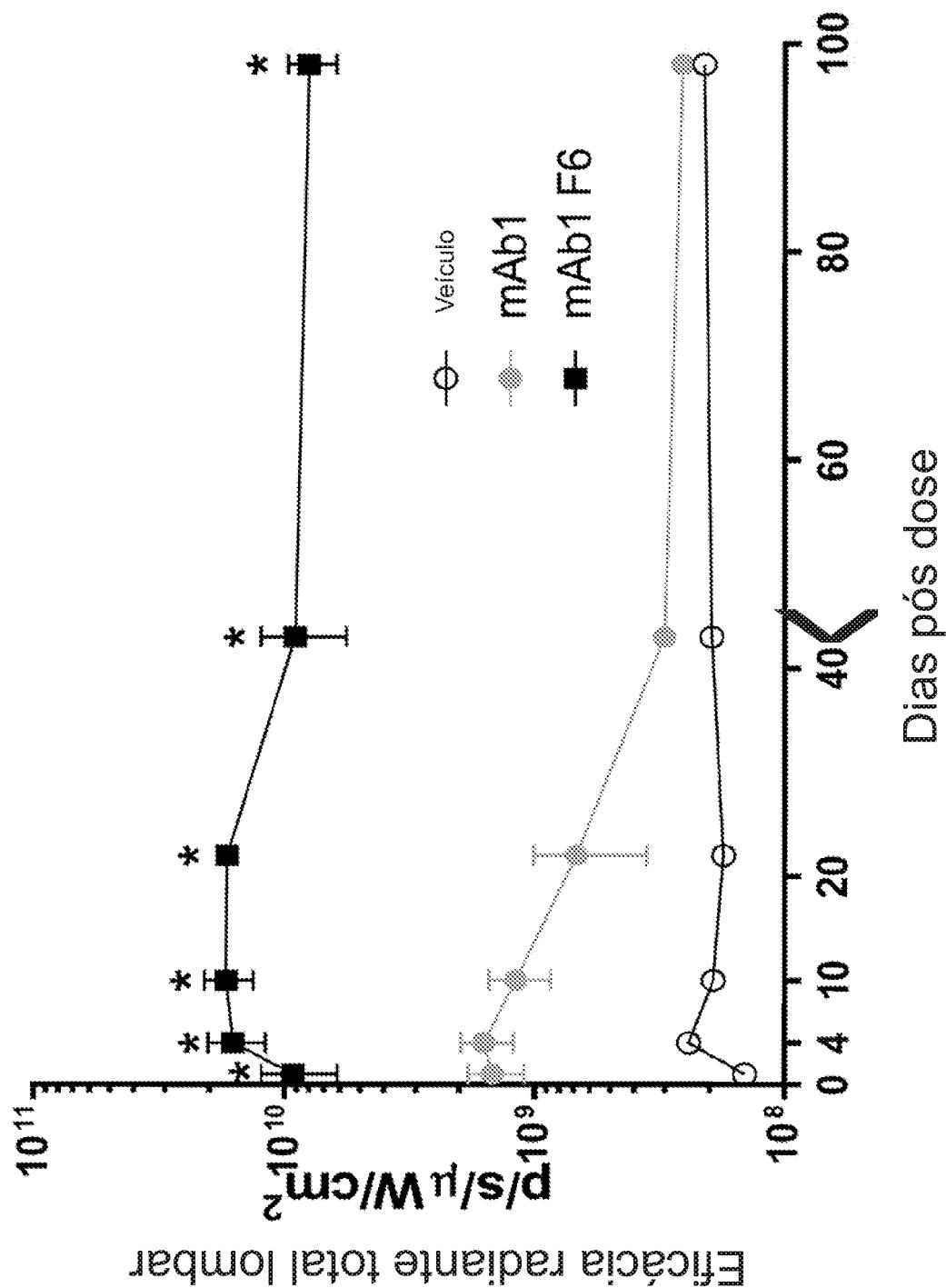


FIG. 27

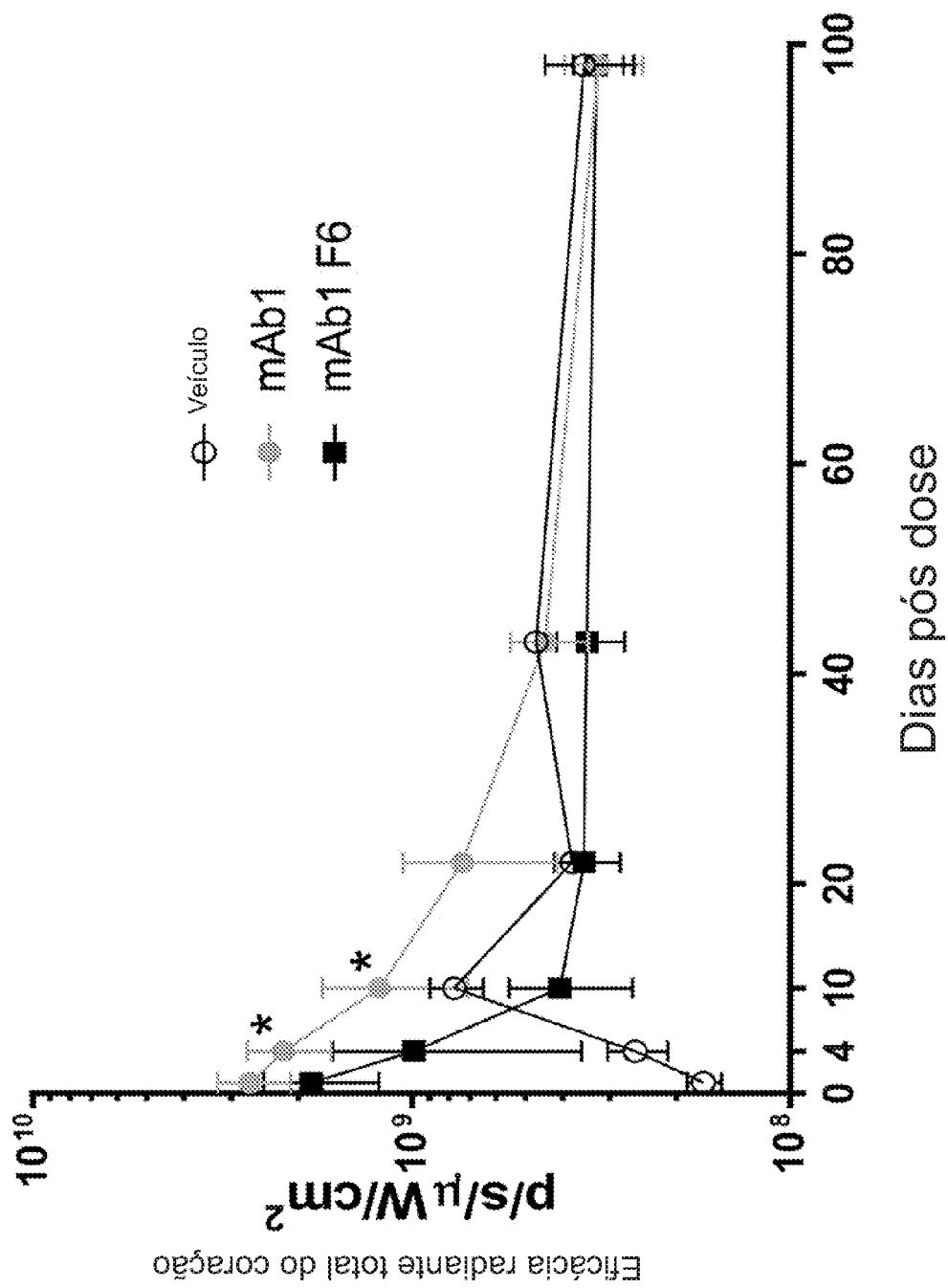


FIG. 28

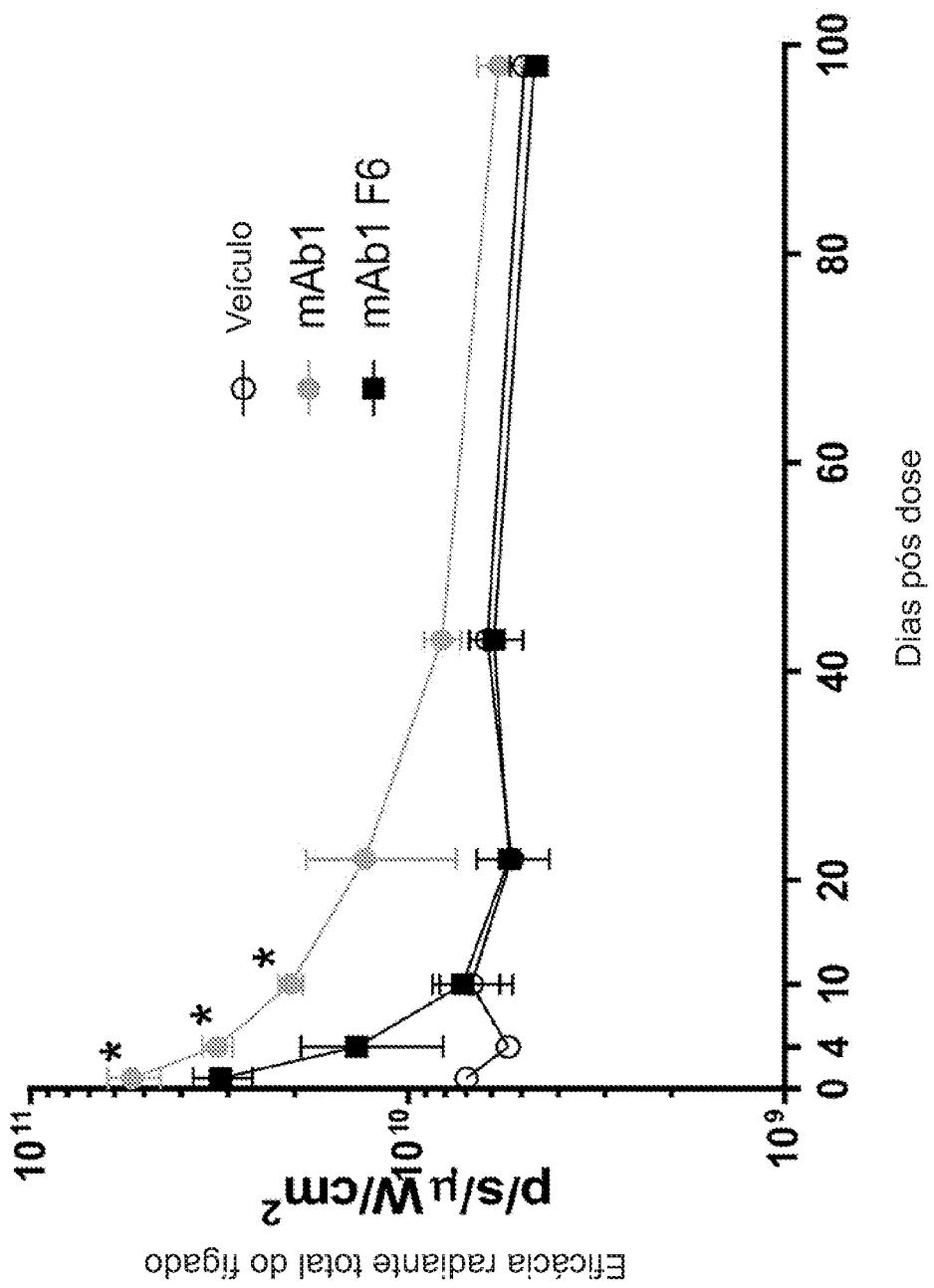


FIG. 29

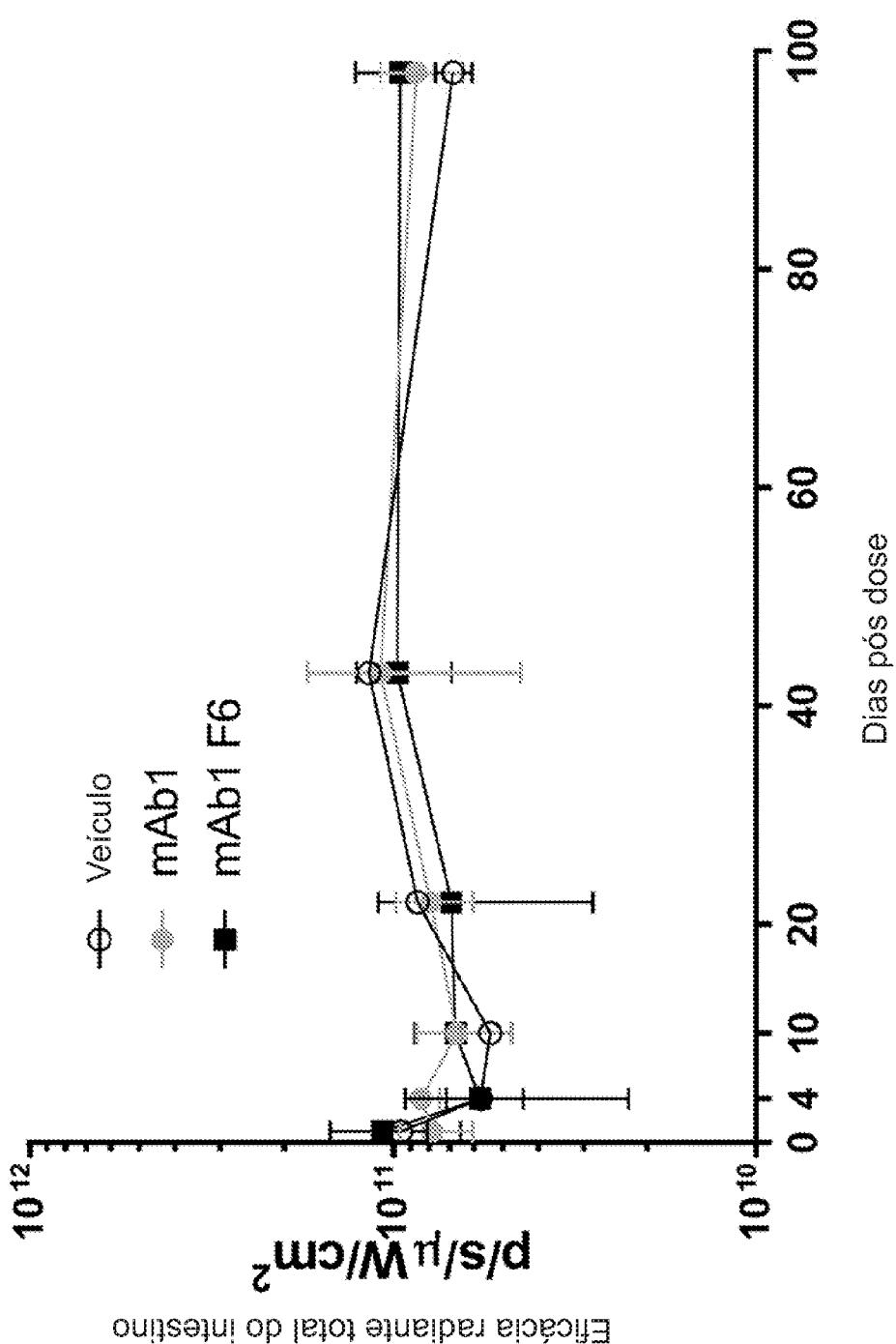
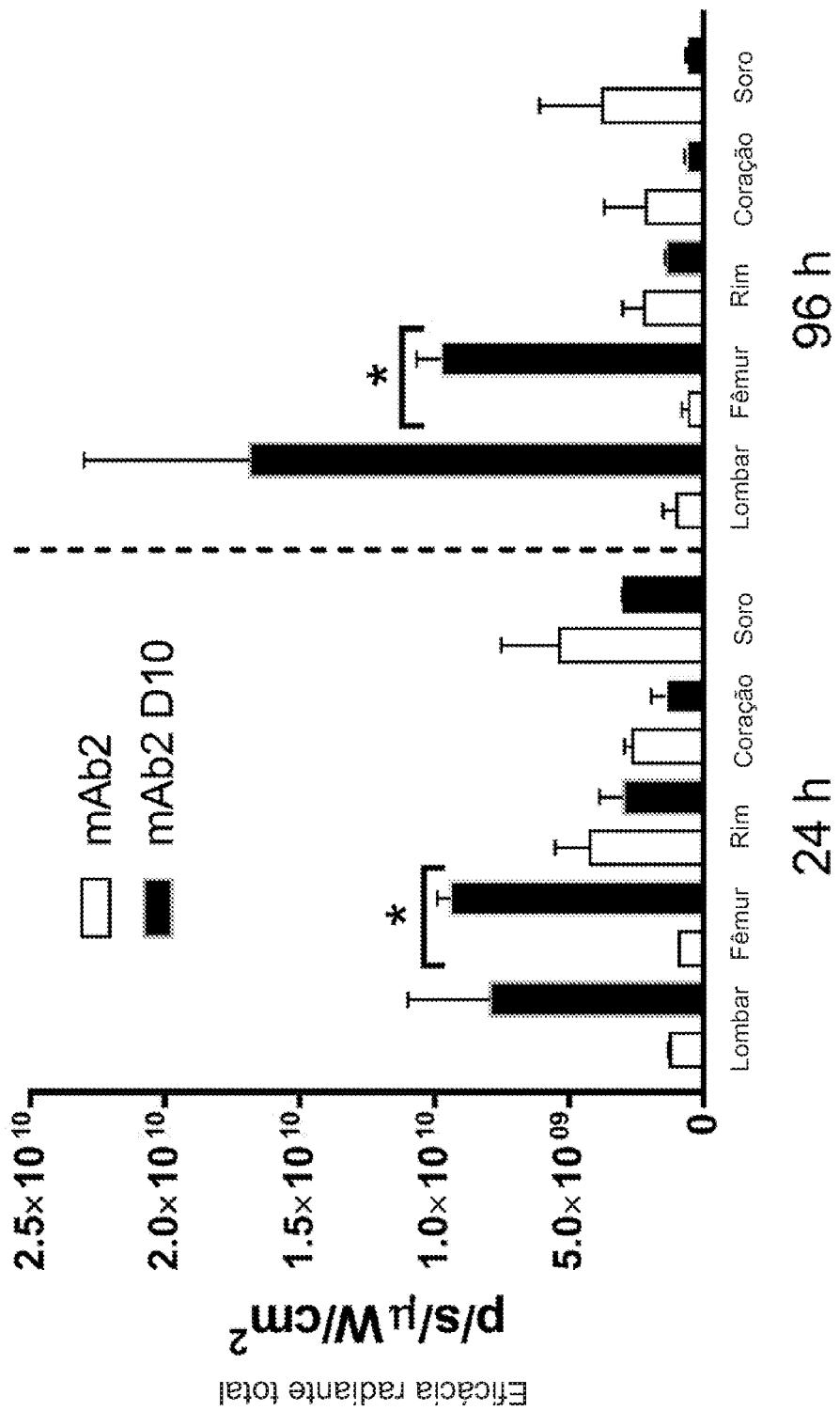


FIG. 30

FIG. 31



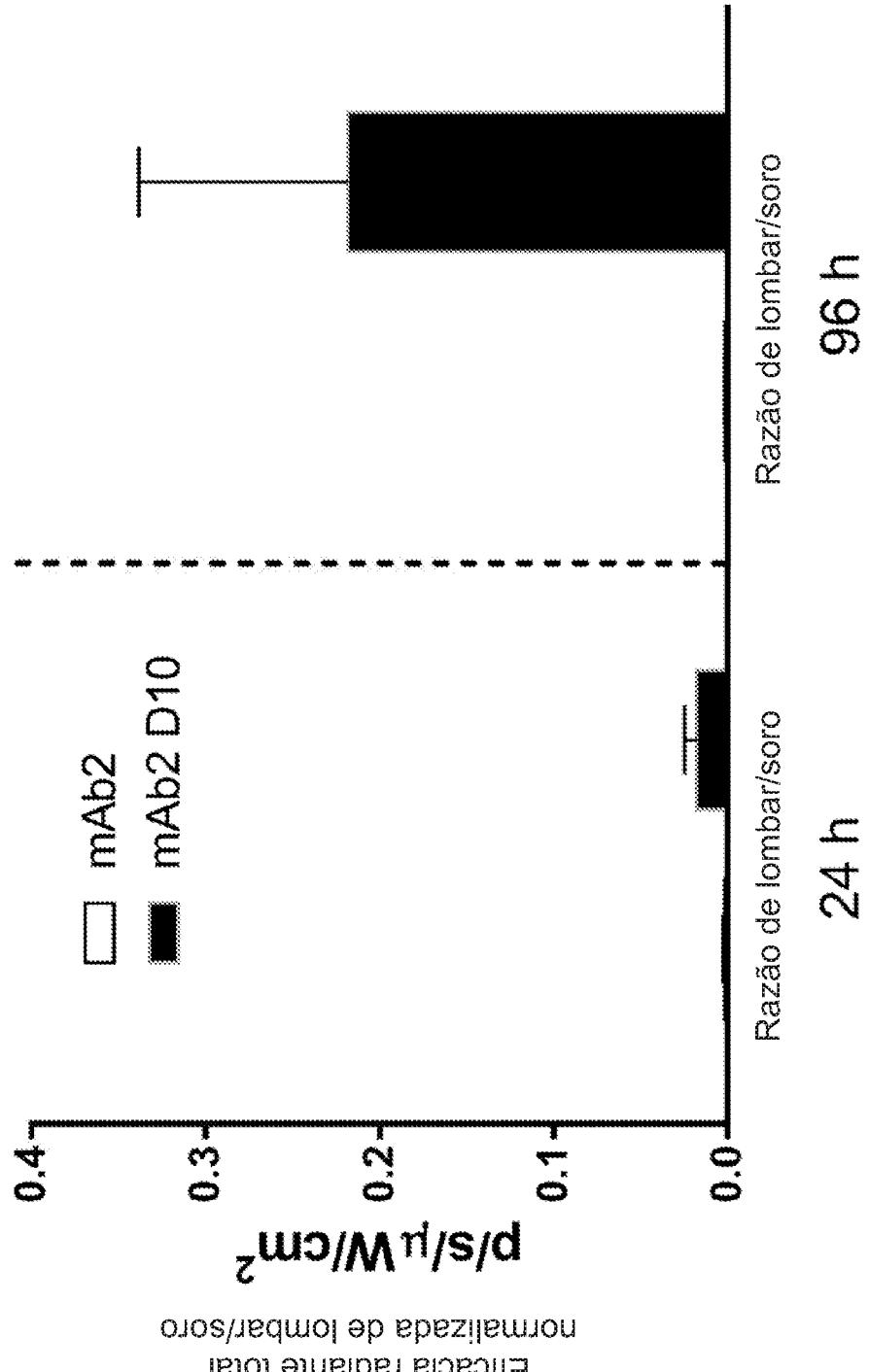


FIG. 32

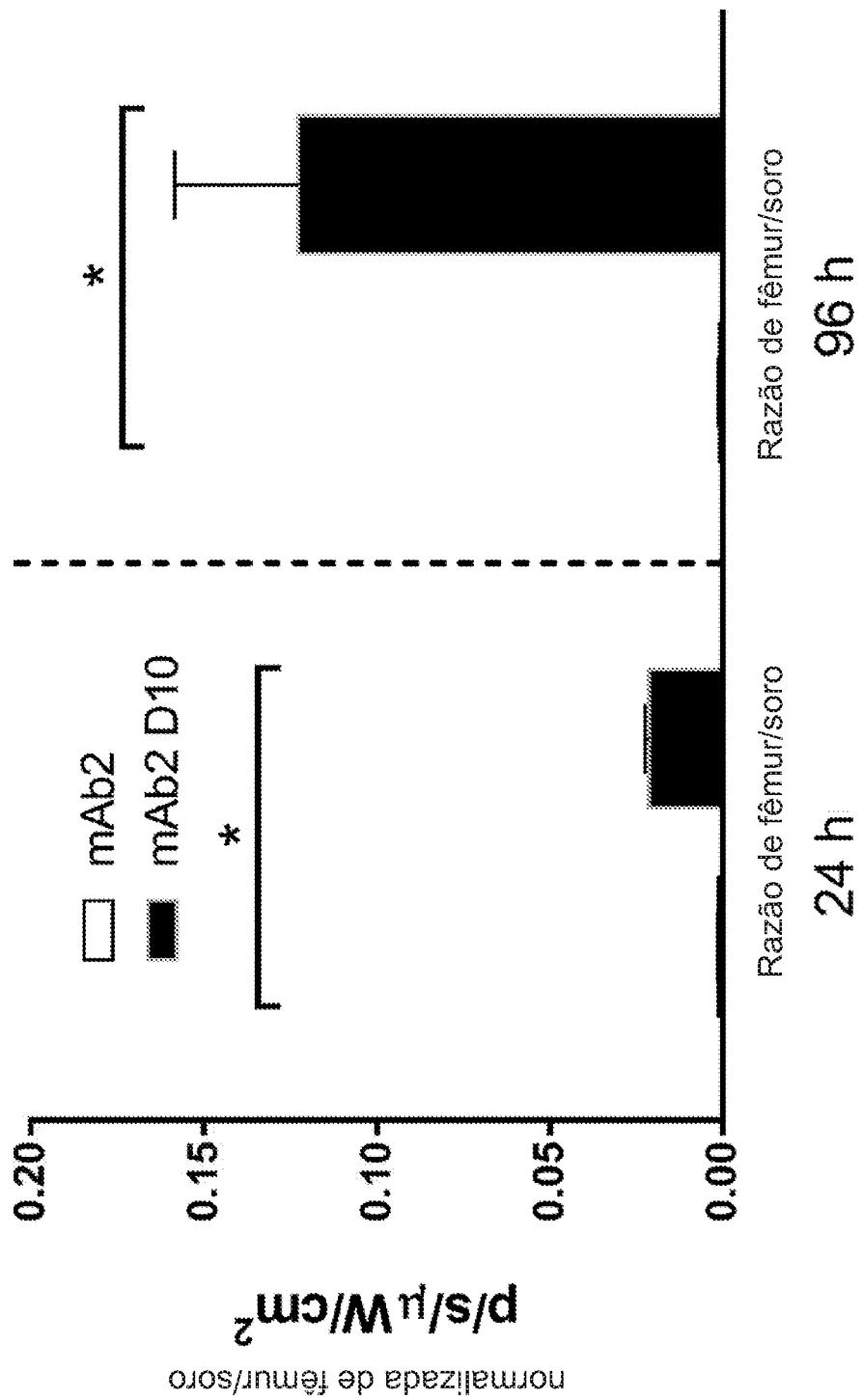


FIG. 33

Eficácia radiante total
normalizada de fêmur/soro

$\mu\text{s}/\mu\text{W}/\text{cm}^2$

0.20
0.15
0.10
0.05
0.00

Razão de fêmur/soro

96 h

24 h

□ mAb2
■ mAb2 D10

*

RESUMO

Patente de Invenção: "ANTICORPOS DE DIRECIONAMENTO ÓSSEO".

São providos anticorpos recombinantes quimicamente conjugados e fragmentos dos mesmos modificados com um ou mais (poli-D) peptídeos de poliaspartato (por exemplo, uma sequência D10) para melhorar a localização dos anticorpos ou fragmentos no osso. Métodos para sua produção e usos desses anticorpos e fragmentos também são revelados.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P241313.TXT
- Data de Geração do Código: 05/07/2019
- Hora de Geração do Código: 11:59:33
- Código de Controle:
 - Campo 1: 0AA422A2DF8E0CA3
 - Campo 2: FFC575A86CA19ACE