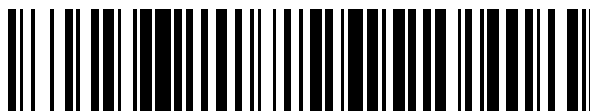


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 160**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2019** **E 19185896 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021** **EP 3677278**

54 Título: **Inhibidores selectivos de la isoforma TGF β 1 y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

11.07.2018 US 201862696752 P
11.07.2018 US 201862696774 P
13.08.2018 US 201862718196 P
23.08.2018 US 201862722081 P
27.09.2018 US 201862737534 P
09.11.2018 US 201862758180 P
09.11.2018 US 201862757917 P
25.02.2019 US 201962810263 P
01.04.2019 US 201962827552 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2022

73 Titular/es:

SCHOLAR ROCK, INC. (100.0%)
301 Binney Street, 3rd Floor
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

DATTA, ABHISHEK;
CAPILI, ALLAN;
SCHURPF, THOMAS;
MARTIN, CONSTANCE;
DAGBAY, KEVIN B.;
CHAPRON, CHRISTOPHER;
WAWERSIK, STEFAN;
LITTLEFIELD, CHRISTOPHER;
CARVEN, GREGORY J.;
BUCKLER, ALAN;
LIN, SUSAN;
JACKSON, JUSTIN W.;
COOPER, ANTHONY;
AVERY, ANDREW;
SALOTTO, MATTHEW y
STEIN, CAITLIN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 905 160 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores selectivos de la isoforma TGFβ1 y utilización de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGFβ, junto con otras dos isoformas estructuralmente relacionadas, a saber, TGFβ2 y TGFβ3, cada una de las cuales está codificada por un gen separado. Estas isoformas de TGFβ funcionan como citoquinas pleiotrópicas que regulan diversos procesos biológicos, como la proliferación/diferenciación celular, la inmunomodulación y la reorganización de la matriz extracelular, tanto en homeostasis como en contextos de enfermedad. Las tres isoformas TGFβ emiten señales a través de los mismos receptores de la superficie celular y desencadenan eventos canónicos de transducción de señales descendentes similares que incluyen la vía SMAD2/3. Sin embargo, los estudios de eliminación de genes en ratones muestran fenotipos diversos, lo que sugiere que cada isoforma desempeña un papel discreto in vivo. Esto puede lograrse en parte mediante la expresión diferencial de las tres isoformas, así como mediante interacciones con proteínas de anclaje, denominadas "moléculas presentadoras" que son más específicas a tejido y contexto.

[0002] Dentro del sistema inmunitario, las células T se reconocen como un objetivo directo importante para TGFβ. La señalización de TGFβ es importante en la proliferación de células efectoras, así como en la regulación de la diferenciación de células T reguladoras y efectoras. Por ejemplo, TGFβ es un potente supresor de células T efectoras Th1 y Th2. Se ha demostrado que las funciones efectoras de las células T citotóxicas son suprimidas por TGFβ a través de múltiples mecanismos. Además, la evidencia muestra que otros tipos de células del sistema inmunológico, como ciertos macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK), también están regulados por la vía de señalización del TGFβ. La desregulación de TGFβ se ha asociado con una serie de enfermedades, como cáncer, fibrosis y trastornos inmunitarios.

[0003] Muchos de los procesos biológicos en los que la matriz extracelular juega un papel están asociados con señalización de TGFβ. Por nombrar algunos, el TGFβ se ha implicado en la cicatrización de heridas, la invasión de tumores y la metástasis, así como en la progresión de la fibrosis.

[0004] Por estas y otras razones, TGFβ ha sido una diana terapéutica atractiva para el tratamiento de trastornos del sistema inmunitario, varios trastornos proliferativos y condiciones fibróticas. Sin embargo, las observaciones de los estudios preclínicos, incluso en ratas y perros, han revelado toxicidades graves asociadas con la inhibición sistémica de TGFβs in vivo. Además, aunque se han desarrollado varios inhibidores de TGFβ hasta la fecha, la mayoría de los programas clínicos dirigidos a TGFβ se han interrumpido debido al riesgo de efectos secundarios graves (resumidos, por ejemplo, en el documento WO 2017/156500). Por lo tanto, a pesar de las líneas de evidencia directa e indirecta que apuntan a la importancia de la señalización de TGFβ en la progresión de enfermedades como el cáncer y la fibrosis, hasta la fecha no hay terapias de TGFβ disponibles en el mercado que se consideren seguras y eficaces.

[0005] Anteriormente, el solicitante describe una clase de anticuerpos monoclonales que funciona con un nuevo mecanismo de acción para la señalización del factor de crecimiento modular (ver, por ejemplo, el documento WO 2014/182676). Estos anticuerpos se diseñaron para aprovechar el hecho de que TGFβ1 se expresa como un complejo de proproteína latente compuesto por predominio y factor de crecimiento, que requiere un paso de activación que libera el factor de crecimiento del complejo latente. En lugar de adoptar el enfoque tradicional de dirigirse directamente al propio factor de crecimiento maduro después de la activación (como los anticuerpos neutralizantes), la nueva clase de anticuerpos inhibidores se dirige específicamente al complejo inactivo de pro-proteína en sí para bloquear preventivamente el paso de activación, corriente arriba de interacción ligando-receptor. Se razonó que este mecanismo de acción único debería proporcionar ventajas para lograr beneficios tanto espaciales como temporales, ya que actúan en la fuente, es decir, dirigiéndose al complejo proTGFβ1 latente dentro de un microambiente de la enfermedad antes de que tenga lugar la activación.

[0006] El uso de este enfoque, los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente e inhiben el paso de activación de TGFβ1 (es decir, liberación del factor de crecimiento maduro del complejo latente) de una manera isoforma selectiva se generaron (véase, el documento WO 2017/156500). Los datos presentados en el mismo apoyan la noción de que la inhibición específica de isoforma (en contraposición a la *pan*-inhibición) de TGFβ puede producir perfiles de seguridad mejorados de antagonizar el TGFβ *in vivo*. Teniendo esto en consideración, el Solicitante buscó entonces desarrollar inhibidores de TGFβ1 que sean ambos i) específicos de isoforma; y ii) capaz de dirigirse ampliamente a múltiples complejos de señalización de TGFβ1 que están asociados con diferentes moléculas presentadoras, como agentes terapéuticos para afecciones impulsadas por efectos multifacéticos de TGFβ1 y su desregulación.

[0007] Tales anticuerpos se describen posteriormente en el documento PCT/US2018/012601 (presentado el 5 de enero de 2018). De hecho, agentes inhibidores específicos a isoformas allí descritos eran capaces de dirigirse tanto a ECM asociada a TGFβ1 y TGFβ1 asociada a célula inmunitaria, bloqueando de este modo *múltiples fuentes* de TGFβ1 en *múltiples contextos biológicos* mientras se mantiene la especificidad a isoforma. Se divulgaron datos de varios modelos in vivo que muestran la eficacia y seguridad de los inhibidores de la activación de TGFβ1 selectivos de isoformas, lo que demuestra que dichos inhibidores son útiles para el tratamiento de enfermedades que implican la desregulación de

TGFβ1 asociado a ECM y TGFβ1 asociado a células inmunitarias in vivo.

[0008] Mientras que el anterior trabajo referenciado arriba demostró la utilidad de anticuerpos capaces de dirigir cada uno de los complejos conocidos de proTGFβ1 y actividades inhibitoras, son deseables inhibidores mejorados de TGFβ1 selectivos de isoformas con una potencia in vivo incluso mayor.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a cada uno de los siguientes complejos de antígeno: i) LTBP1-proTGFβ1 humano; ii) LTBP3-proTGFβ1 humano; iii) GARP-proTGFβ1 humano; y iv) LRRC33-proTGFβ1 humano; en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 13 y un dominio variable de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15.

[0010] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0011] La presente invención también proporciona la anterior composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo y/o fibrótico en un sujeto.

[0012] La presente invención también proporciona un método para fabricar una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, que comprende: i) proporcionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención; ii) formular el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0013] La presente divulgación proporciona una nueva clase de alta afinidad, los anticuerpos selectivos de isoforma, capaces de inhibir activación de TGFβ1 con alta potencia. Estos incluyen anticuerpos (incluidas inmunoglobulinas y fragmentos de unión a antígeno o porciones de los mismos, y moléculas diseñadas que incorporan dichos fragmentos) que son capaces de dirigirse a complejos de molécula proTGFβ1 de presentación múltiple (denominados "complejos latentes grandes" o "LLC") con altas afinidades. Estos anticuerpos conservan la selectividad equisita y los perfiles de seguridad, y se ha demostrado que logran una eficacia in vivo mejorada en múltiples modelos preclínicos con capacidad de traducción a condiciones humanas. Estos atributos de los inhibidores de TGFβ1 abren oportunidades para desarrollar agentes terapéuticos de TGFβ1 seguros y eficaces para el tratamiento de enfermedades que implican la desregulación de TGFβ1.

[0014] Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de selección en la generación de anticuerpos proTGFβ1 de la presente descripción: 1) selectividad de isoformas; 2) altas afinidades por LLC humanas, por ejemplo, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1; 3) potencia inhibitora robusta; 4) perfiles favorables de seguridad/toxicología in vivo; y 5) eficacia in vivo en un modelo preclínico que recapitula la enfermedad humana. Además, al evaluar la eficacia de los inhibidores de TGFβ1 utilizados como terapia de combinación (p. ej., terapia complementaria), debe sopesarse la capacidad de lograr efectos sinérgicos (en contraposición a meros efectos aditivos). Basándose en estos criterios, los inventores de la presente divulgación han identificado una clase de anticuerpos monoclonales de alta afinidad y fragmentos de los mismos, capaces de dirigirse específicamente a complejos de proTGFβ1 y bloquear potentemente la activación de TGFβ1. Las composiciones, el uso terapéutico, las preparaciones, las formulaciones, los procesos y los métodos relacionados están incluidos en la presente divulgación.

[0015] La invención incluye un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse a cada uno de los siguientes complejos LLC humanos con una KD de ≤ 10 nM, según se mide mediante valoración de solución de equilibrio: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1. El anticuerpo tiene una KD de ≤ 1 nM para cada una de las cuatro LLC humanas.

[0016] El anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la invención se une un lazo de latencia, o una porción del mismo, de proTGFβ1. El anticuerpo o el fragmento puede además unirse una parte del dominio del factor de crecimiento, tal como Dedo-1 y Dedo-2. El anticuerpo o el fragmento puede unirse a un epítipo que comprende uno o más residuos de aminoácidos de lazo de latencia. El epítipo puede comprender además uno o más residuos de aminoácidos del dominio del factor de crecimiento. Por tanto, tal epítipo puede ser un epítipo combinatorio. El anticuerpo no se une al factor de crecimiento de TGFβ1 libre que no está asociado con un complejo de proTGFβ1.

[0017] Los inhibidores de TGFβ1 de la invención son anticuerpos funcionales en que ejercen actividades inhibitoras hacia TGFβ1. La potencia de tales anticuerpos es isoforma específica, medida por ensayos de potencia in vitro adecuados tales como ensayos de reportero basados en células descritas en este documento. Por tanto, el anticuerpo no se une ni inhibe a los homólogos de TGFβ2 o TGFβ3.

[0018] Los inhibidores TGFβ1 de la invención son capaces de bloquear la liberación de factor de crecimiento maduro a partir de complejos LLC latentes. Los inhibidores de TGFβ1 pueden inhibir la activación de TGFβ1 dependiente de integrina y/o la activación de TGFβ1 dependiente de proteasa. La proteasa puede ser calicreína, plasmina o una proteasa

MMP. Los inhibidores de TGFβ1 pueden bloquear la activación de TGFβ1 dependiente de la integrina sin bloquear la unión de la integrina a las LLC.

[0019] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden funcionar a través de los modos de inhibidores duales de acción hacia LLC asociadas a células (p. ej., GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1). En un mecanismo, tales inhibidores bloquean el paso de activación del TGFβ1 asociado con el GARP anclado a la membrana y/o LRRC33. En un segundo mecanismo, tales inhibidores pueden, tras el acoplamiento de la diana, inducir la internalización dependiente de anticuerpos (por lo tanto, la eliminación) de las LLC de la superficie celular, reduciendo así la señalización de TGFβ1 en el nicho.

[0020] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para reducir la expresión de genes asociados a enfermedades in vivo, tales como TGFB1, Acta2, Col1a1, Col3a1, Fn1, Itga11, Lox, Loxl2, Mmp2 y CCL2.

[0021] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para reducir la fosforilación del efector corriente abajo SMAD2/3 in vivo.

[0022] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para el tratamiento de indicaciones relacionadas con TGFβ1. Tales indicaciones incluyen enfermedades que implican la expresión de gen anormal, enfermedades que implican la desregulación ECM, enfermedades caracterizadas por el aumento de células inmunosupresoras (p. ej., células T reguladoras, MDSCs y/o macrófagos M2), enfermedades que implican transición mesenquimal, enfermedades que implican proteasas, enfermedades relacionadas con la proliferación y/o diferenciación de células madre anormales, etc., mientras que estas categorías de enfermedades no pretenden excluirse mutuamente. En algunas formas de realización, la indicación relacionada con TGFβ1 es un trastorno proliferativo tal como trastorno mieloproliferativo y cáncer que comprende un tumor sólido. En algunas formas de realización, la indicación relacionada con TGFβ1 es un trastorno fibrótico, tal como fibrosis de órganos. El cáncer puede ser un cáncer avanzado, que incluye un tumor/cáncer localmente avanzado y un cáncer metastásico.

[0023] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden reducir el número o la proporción relativa de las poblaciones de células inmunosupresoras en un sitio de enfermedad, tales como microambiente tumoral y microambiente fibrótico. En algunas formas de realización, las poblaciones de células inmunosupresoras pueden incluir macrófagos polarizados M2 y/o MDSC.

[0024] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para conseguir el control del tumor (p. ej., respuesta parcial y respuesta completa), en donde el tumor es, opcionalmente, un fenotipo inmunosupresor (p. ej., inmuno-excluido). Los tumores caracterizados por un fenotipo inmunosupresor (p. ej., fenotipo inmuno-excluido) pueden denominarse tumores inmunosupresores. Los inhibidores de TGFβ1 pueden lograr efectos antitumorales sinérgicos cuando se usan junto con una terapia contra el cáncer, como la terapia de bloqueo de puntos de control, la quimioterapia y la radioterapia. La terapia de bloqueo del punto de control puede comprender, por ejemplo, anticuerpo(s) anti-P_D-(L)1. En tales terapias de combinación, los inhibidores de TGFβ1 pueden vencer la resistencia al tratamiento (p. ej., resistencia primaria), haciendo así que el cáncer sea más susceptible a la terapia del cáncer. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 pueden usarse para el tratamiento de cáncer que comprende un tumor inmunosupresor en un sujeto. El sujeto puede ser i) un no respondedor primario a una terapia contra el cáncer, tal como un inhibidor de punto de control; o, ii) diagnosticado con un cáncer para el cual al menos un inhibidor de punto de control está aprobado por una autoridad reguladora como terapia. Las tasas de respuesta (respondedores parciales y completos combinados entre los que recibieron una terapia) para el cáncer para el que se aprobó al menos un inhibidor de punto de control son inferiores al 100%. Normalmente, las tasas de respuesta oscilan entre el 10 y el 60%. Los inhibidores de TGFβ1 pueden aumentar las tasas de respuesta entre una población de pacientes. Además, dentro de un grupo de respuesta parcial entre los respondedores primarios, los inhibidores de TGFβ1 pueden proporcionar mejores beneficios clínicos. En algunas formas de realización, entre un grupo de respondedor primario, los inhibidores de TGFβ1 pueden reducir la tasa de resistencia adquirida a la terapia del cáncer. El tumor inmunosupresor puede ser un cáncer/tumor localmente avanzado o un cáncer metastásico. En algunas formas de realización, la terapia contra el cáncer puede incluir, por ejemplo, terapia con inhibidores de puntos de control, quimioterapia y/o radioterapia.

[0025] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para lograr un beneficio de supervivencia en sujetos con un tumor sólido, en donde el tumor sólido es opcionalmente un cancer localmente avanzado o metastásico.

[0026] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para lograr efectos anti-tumorales duraderos mediante la inducción de la función de memoria de células T. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 pueden reducir o retrasar la recurrencia de la enfermedad.

[0027] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser eficaces para conseguir efectos antitumorales en tumores que expresan predominantemente TGFB1/TGFβ1, en donde opcionalmente, los tumores expresan más TGFB3/TGFβ3. En algunas formas de realización, el tumor que coexpresa TGFβ1 y TGFβ3 es un carcinoma.

[0028] Los inhibidores TGFβ1 de la invención pueden ser capaces de superar la resistencia primaria del tumor a una terapia del cáncer. En algunas formas de realización, dicho tumor se infiltra con tipos de células inmunosupresoras, tales

como células T reguladoras, macrófagos de tipo M2 y/o células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). Tras el tratamiento, hay una reducción en el número de células inmunosupresoras asociadas a tumores y un aumento correspondiente en el número de células T efectoras antitumorales.

[0029] Los inhibidores TGF β 1 de la invención pueden promover la infiltración de células efectoras (p. ej., afluencia) en tumores. En algunas formas de realización, las células efectoras pueden entrar en el tumor a través de la vasculatura del tumor. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 de la invención promueven la expansión de las células efectoras (p. ej., la proliferación). Esto puede estar mediado al menos en parte por la inhibición de las células T reguladoras GARP positivas.

[0030] Los inhibidores TGF β 1 de la invención pueden ser eficaces para el tratamiento de la mielofibrosis. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 logran efectos antifibróticos de la médula ósea de sujetos con mielofibrosis, que pueden incluir opcionalmente la reversión parcial o completa de la fibrosis establecida. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 son eficaces para normalizar ciertos parámetros hematológicos.

[0031] Los inhibidores TGF β 1 de la invención pueden ser eficaces para lograr los efectos anti-fibróticos in vivo. Los efectos antifibróticos pueden incluir la reversión de la fibrosis establecida, que puede ser una reversión parcial o una reversión completa.

[0032] Los inhibidores de TGF β 1 de la invención pueden tolerarse bien en estudios preclínicos de seguridad/toxicología a dosis de hasta 100, 200 o 300 mg/kg cuando se administran semanalmente durante al menos 4 semanas. Dichos estudios pueden llevarse a cabo en especies animales que se sabe que son sensibles a la inhibición de TGF β , como ratas y primates no humanos. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 de la invención no causan toxicidades observables asociadas con la inhibición de TGF β , tales como toxicidades cardiovasculares (p. ej., valvulopatía) e hiperplasia epitelial y otras toxicidades conocidas en la técnica.

[0033] Los inhibidores TGF β 1 de la invención pueden alcanzar la suficiente ventana terapéutica en donde las cantidades eficaces de los inhibidores mostrados por los estudios de eficacia in vivo están muy por debajo (tal como al menos 3 veces, al menos 6 veces, o al menos 10 veces) de las cantidades o concentraciones que causan toxicidades observables. En algunas formas de realización, las cantidades terapéuticamente eficaces de los inhibidores están entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg por semana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0034]

FIGS. 1A y 1B son gráficos que muestran la inhibición de la activación de LTBP1-proTGF β en un ensayo LN229.

FIGS. 2A y 2B son gráficos que muestran la inhibición de la activación del complejo de LTBP3-proTGF β 1 en un ensayo LN229.

FIGS. 3A y 3B son gráficos que muestran la inhibición de la activación de GARP-proTGF β 1 en un ensayo SW480 β 6.

FIGS. 4A y 4B son gráficos que muestran la inhibición de la activación de LRRC33-proTGF β 1 en un ensayo SW480 β 6.

FIG. 5A muestra efectos inhibidores de Ab3 y Ab6 sobre la activación inducida por calicreína de TGF β 1 in vitro.

FIG. 5B muestra los efectos inhibidores de Ab3 y Ab6 sobre la activación inducida por Plasmina de TGF β 1 in vitro.

FIG. 6 proporciona un gráfico que muestra la internalización rápida de LRRC33-proTGF β 1 tras la unión de Ab6 en células heterólogas transfectadas con LRRC33 y proTGF β 1.

FIG. 7A proporciona dos gráficos que muestran el efecto de Ab6 o Ab3 sobre la expresión de genes de colágeno (Col1a1 y Col3a1) en ratones UUO. Los ratones se trataron con 3, 10 o 30 mg/kg/sem de Ab3 o 3 o 10 mg/kg/sem de Ab6. Se utilizó IgG sola como control.

FIG. 7B proporciona dos gráficos que muestran el efecto de Ab3 o Ab6 sobre la expresión de los genes Fn1 y Loxl2 en ratones UUO. Los ratones se trataron con 3, 10 o 30 mg/kg/sem de Ab3 o 3 o 10 mg/kg/sem de Ab6. Se utilizó IgG sola como control.

FIG. 8A es un gráfico que muestra el efecto de Ab2 o Ab3 sobre la expresión de genes de colágeno (Col1a1 y Col3a1) en ratones UUO. Los ratones se trataron con 3, 10 o 30 mg/kg/sem de Ab3 o 3 o 10 mg/kg/sem de Ab2. Se utilizó IgG sola como control.

FIG. 8B es un gráfico que muestra el efecto de Ab3 o Ab2 sobre la expresión de los genes Fn1 y Loxl2 en ratones UUO. Los ratones se trataron con 3, 10 o 30 mg/kg/sem de Ab3 o 3 o 10 mg/kg/sem de Ab2. Se utilizó IgG sola como control.

FIG. 9 resume la importancia estadística de los cambios en la expresión génica (frente a UUO + IgG) después del tratamiento en el modelo UUO.

FIG. 10A y **FIG. 10B** son gráficos que muestran proporciones relativas de Smad2/3 fosforilado frente al total (fosforilado y no fosforilado) en riñones de un modelo genético del síndrome de Alport tratado con y sin anticuerpos Ab2 y Ab3. **FIG. 10C** es un gráfico que muestra el efecto de Ab3 y Ab2 sobre la expresión génica en los riñones a partir de un modelo genético del síndrome de Alport.

FIG. 11A es un gráfico que muestra la exposición sérica de Ab2 en el modelo de ratón CDHFD a las 6, 8, 10 y 12 semanas. **FIG. 11B** es un gráfico que muestra el efecto de Ab2 sobre la fosforilación de Smad2/3 en tejido hepático de ratones tratados con CDHFD. **FIG. 11C** es un gráfico que muestra una correlación entre la exposición reducida de Smad2/3 fosforilada y Ab2. **FIG. 11D** es un gráfico que muestra una comparación del efecto de Ab3 y Ab2 sobre la fosforilación de Smad2/3 en tejido hepático de ratones tratados con CDHFD. **FIG. 11E** es un gráfico que muestra el efecto de Ab3 y Ab2 sobre la fibrosis hepática medido por los niveles de hidroxiprolina. **FIG. 11F** es un gráfico que muestra el efecto de Ab2 sobre α -Col1 por IHC en ratones tratados con CDHFD. **FIG. 11G** es un gráfico que muestra una correlación entre los niveles de exposición a Ab2 y los niveles reducidos de α -Col1.

FIG. 12 es un gráfico que muestra el efecto de Ab3 y Ab2 sobre la fibrosis medido por tinción con rojo picrosirius (PRS) en un modelo de ratón CCL4 de fibrosis hepática.

FIG. 13 es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo (días) en el modelo de melanoma Cloudman S91, después de la administración de Ab3 a 30 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD-1.

FIG. 14A proporciona cinco gráficos que muestran el cambio en el crecimiento del tumor (volumen del tumor mm³) expresado como la mediana de la progresión del tumor en el modelo de melanoma Cloudman S91, medido en el tiempo (días) después de la administración de Ab3 o Ab6 a 30 mg/kg o 10 mg/kg, cada uno en combinación con anti-PD-1. Se usó anti-PD-1 solo como control. Las líneas discontinuas representan animales que tuvieron que ser sacrificados antes de alcanzar el criterio de punto final de 2000 mm³ debido a la ulceración del tumor.

FIG. 14B proporciona dos gráficos que muestran los volúmenes tumorales medios de Cloudman S91 en función del tiempo después de la administración de Ab3 (izquierda) o Ab6 (derecha) a 30 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD-1. Se utilizaron como controles Anti-PD-1 solo, Ab3 solo, Ab6 solo e IgG solo.

FIG. 14C proporciona seis gráficos que muestran cambios en el volumen del tumor S91 en función del tiempo en ratones tratados con (1) IgG de control; (2) Ab6 solo; (3) anti-PD1 solo; (4) anti-PD1/Ab6 (3mg/kg); (5) anti-PD1/Ab6 (10 mg/kg); y (6) anti-PD1/Ab6 (30 mg/kg). El volumen del tumor de punto final de 2.000 mm³ se indica en la línea de puntos superior; y el volumen umbral del 25% de 500 mm³ se muestra en la línea de puntos inferior. Los respondedores se definieron como aquellos que lograron un tamaño tumoral de menos del 25% del volumen del punto final.

FIG. 14D proporciona tres gráficos que muestran cambios en el volumen del tumor S91 en función del tiempo en ratones tratados con una combinación de anti-PD-1 y Ab6 a 3 niveles de dosificación (3, 10 y 30 mg/kg). Se muestran efectos antitumorales duraderos después del tratamiento.

FIG. 14E proporciona un gráfico que resume los datos, expresados como volumen tumoral medio, de la FIG. 14C.

FIG. 14F proporciona un gráfico que muestra la supervivencia de los animales en cada grupo de tratamiento en el tiempo de la FIG. 14C.

FIG. 15 es un gráfico que muestra las proporciones de SMAD2/3 fosforilado a total (pSMAD/SMAD) en el modelo de cáncer de vejiga MBT2. Los animales se trataron como sigue: (1) anticuerpo anti-PD-1 solo; (2) Ab5 (3mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1; (3) Ab5 (10 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1; (4) Ab3 (10 mg/kg) en combinación con anticuerpo antiPD-1; (5) Ab3 (30 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1.

FIGS. 16A y 16B proporcionan dos conjuntos de cinco gráficos que muestran el cambio en el crecimiento del tumor MBT2 (volumen del tumor mm³) medido a lo largo del tiempo (días) después de la administración de Ab3 a 30 mg/kg o 10 mg/kg, o Ab6 a 3 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD-1. Se usó anti-PD-1 solo como

control. Los cambios en el volumen del tumor en función del tiempo se representan en una escala logarítmica (**FIG. 16A**) y en una escala lineal (**FIG. 16B**). Las líneas discontinuas representan animales que tuvieron que ser sacrificados antes de alcanzar el criterio de punto final de 1200 mm³ debido a la ulceración del tumor.

FIG. 16C proporciona gráficos que muestran la mediana de los volúmenes tumorales en función del tiempo después de la administración de Ab3 (arriba a la izquierda) a 30 mg/kg o 10 mg/kg o Ab6 (arriba a la derecha) a 10 mg/kg o 3 mg/kg, en combinación con anti-PD-1 en un modelo de cáncer de vejiga singénico MBT2. Se utilizaron como controles anti-PD-1 solo, Ab3 solo, Ab6 solo e IgG solo. El volumen medio del tumor el día 15 se resume en el gráfico inferior.

FIG. 16D proporciona cinco gráficos que muestran los efectos de Ab6 en combinación con anti-PD-1 en el modelo de cáncer de vejiga singénico MBT2. Los respondedores se definen como aquellos que lograron un tamaño tumoral de menos del 25% del volumen del punto final al final del estudio.

FIG. 17 es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia en el tiempo (días) después de la administración de Ab3 a 10 mg/kg o Ab6 a 3 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD-1, en un modelo de cáncer de vejiga singénico MBT2. Se usó anti-PD-1 solo como control.

FIG. 18 proporciona un conjunto de gráficos que muestra el cambio en el crecimiento del tumor (volumen del tumor mm³) medido a lo largo del tiempo (días) en un estudio de reexposición del tumor. Los animales tratados previamente con anti-PD-1/Ab3 o anti-PD-1/Ab6 que habían eliminado los tumores (respondedores completos que lograron una regresión completa) se volvieron a desafiar con células tumorales MBT2. Se utilizaron animales ingenuos, sin tratar, como control. Las líneas discontinuas representan los animales que tenían que ser sacrificados antes de alcanzar los criterios de punto final de 1200 mm³ debido a ulceración tumoral.

FIG. 19A proporciona un conjunto de gráficos que muestra el cambio en el crecimiento tumoral (volumen tumoral mm³) medido a lo largo del tiempo (días) después de la administración de Ab3 a 30 mg/kg o 10 mg/kg o Ab2 a 3 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD1 (P < 0,05, prueba U de Mann-Whitney) en el modelo de tumor MBT-2. Se usó anti-PD1 solo como control.

FIG. 19B es un gráfico que muestra la mediana del volumen tumoral (mm³) el día 15 en ratones a los que se les administró Ab3 a 30 mg/kg o 10 mg/kg o Ab2 a 3 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD1 (P < 0,05, prueba U de Mann-Whitney) en el modelo de tumor MBT-2.

FIG. 20A es un mapa de calor que muestra que la unión de Fab de Ab5 da como resultado la protección de HDX en las regiones (Región 1 y Región 2) de proTGFβ1. **FIG. 20B** ilustra las regiones del complejo proTGFβ1 que están protegidas del intercambio de disolvente según lo medido por HDX (véase la FIG. 20A) tras la unión de Ab5.

FIG. 21A es un mapa de calor que muestra los efectos de protección de la unión de Ab6 Fab a proTGFβ1 (C4S). Las regiones afectadas por la interacción anticuerpo-antígeno se indican mediante cajas rojas (1, 2a, 2b, 2c, 3, 4, 5a, 5b, 6a y 6b). **FIG. 21B** proporciona datos HDX superpuestos a la estructura cristalina del TGFβ1. Se muestran las regiones identificadas en la FIG. 21A.

FIG. 22A ilustra la identificación de tres regiones de unión (Región 1, Región 2 y Región 3) después de análisis estadísticos. La Región 1 se superpone con el denominado "lazo de latencia" dentro del prodominio de proTGFβ1, mientras que las Regiones 2 y 3 están dentro del dominio del factor de crecimiento. **FIG. 22B** representa varios dominios y motivos de proTGFβ1, en relación con las tres regiones de unión implicadas en la unión de Ab6. También se proporciona la alineación de secuencia entre las tres isoformas.

FIG. 23A proporciona un mapa de calor HDX-MS para el complejo Ab2 Fab-proTGFβ1 C4S. **FIG. 23B** muestra las regiones protegidas por Ab2 en la superficie y las estructuras de cinta de proTGFβ1. La región 1 se superpone con el llamado "lazo de latencia" dentro del prodominio de proTGFβ1, mientras que la Región 3 está dentro del dominio del factor de crecimiento. También se proporciona la alineación de secuencia entre las tres isoformas.

FIG. 24 proporciona la estructura cristalina de Ab2 Fab unido a proTGFβ1 y muestra residuos de contacto en TGFβ1 y Ab2.

FIGS. 25A-25D muestran expresión relativa de ARN de isoformas de TGFβ en varios tejidos y células. **FIG. 25A** muestra la expresión de la isoforma de TGFβ en varios tejidos cancerosos humanos frente al comparador normal (por tipo de cáncer). **FIG. 25B** muestra la frecuencia de expresión de isoformas de TGFβ por tipo de cáncer humano basándose en análisis de más de 10.000 muestras de 33 tipos de tumores. **FIG. 25C** muestra la expresión de isoformas de TGFβ en muestras de tumores individuales, por tipo de cáncer. **FIG. 25D** muestra la expresión de isoformas de TGFβ en líneas modelo de células cancerosas singénicas de ratón.

FIG. 25E proporciona 4 paneles de expresión génica que muestran que todas las moléculas presentadoras

(LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33) están altamente expresadas en la mayoría de los tipos de cáncer humanos.

FIG. 25F proporciona análisis de expresión de TGFβ y genes de la vía de señalización relacionados de los modelos de tumores de ratón singénicos, Cloudman S91, MBT-2 y EMT-6.

FIG. 25G proporciona tres gráficos que comparan expresiones de proteínas mediante ELISA de 3 isoformas de TGFβ en los modelos de tumores Cloudman S91, MBT-2 y EMT-6.

FIG. 25H proporciona un gráfico que compara el nivel de expresión de ARN por qPCR del lisado tumoral completo de las moléculas presentadoras en los modelos tumorales Cloudman S91, MBT-2 y EMT-6.

FIG. 26A representa resultados cardíacos microscópicos de un anticuerpo pan-TGFβ de un estudio de toxicología de 1 semana. **FIG. 26B** representa resultados cardíacos microscópicos de Ab3 en comparación con un inhibidor de ALK5 o un anticuerpo pan-TGFβ de un estudio de toxicología en ratas de 4 semanas. **FIG. 26C** representa resultados microscópicos de Ab6 en comparación con un inhibidor de ALK5 o un anticuerpo pan-TGFβ de un estudio de toxicología en ratas de 4 semanas. **FIGS. 26D y 26E** representan resultados microscópicos de corazón, hueso y pulmón de Ab3 y Ab2 en comparación con un inhibidor de ALK5 o un anticuerpo pan-TGFβ de un estudio de toxicología en ratas de 4 semanas.

FIG. 27 proporciona un gráfico que muestra los volúmenes tumorales medios de S91 en función del tiempo. Los brazos de combinación representan cuatro inhibidores de TGFβ1 independientes del contexto, selectivos de isoformas diferentes a dos niveles de dosis, cada uno en combinación con el tratamiento anti-P_D-1.

FIG. 28 proporciona un gráfico que muestra los volúmenes tumorales medios de S91 en función del tiempo. Los brazos de combinación representan dos inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas diferentes (Ab3 y Ab2) a dos niveles de dosis, cada uno en combinación con el tratamiento anti-P_D-1.

FIGS. 29A y 29B proporcionan secciones de inmunohistoquímica representativas de tumores S91, teñidas con un marcador de células CD8+. **FIG. 29A** es una sección de tumor de un animal tratado con anti-P_D-1 solo. **FIG. 29B** es una sección de tumor de un animal tratado tanto con anti-P_D-1 como con un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto representativo.

FIGS. 30A-30D proporcionan secciones de inmunohistoquímica representativas de tumores S91, teñidas con marcadores de macrófagos. **FIG. 30A** es una sección de tumor de un animal tratado con anti-P_D-1 solo. **FIG. 30B** es una sección de tumor de un animal tratado tanto con anti-P_D-1 como con un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto representativo. **FIG. 30C** es una sección de tumor de un animal tratado con anti-P_D-1 y Ab3 (30 mg/kg), usando anti-F4/80 como marcador de macrófagos. **FIG. 30D** es una sección que usa anti-CD163 como marcador de macrófagos M2, que muestra que la mayoría de las células son negativas para CD163.

FIG. 31 es un gráfico que muestra un cambio de pliegues log2 en los genes de linfocitos T CD8+ (CD8α, Perforina y Granzima B) después de 1 semana de tratamiento con anti-P_D-1/Ab3 en tumores MBT2, en comparación con los animales tratados con anti-P_D-1 solos.

FIG. 32A proporciona datos de FACS que muestran la regulación positiva de GARP inducida por CD3/CD28 en células T reguladoras humanas periféricas.

FIG. 32B es un gráfico que muestra los efectos de Ab3 o Ab6 sobre la inhibición de la proliferación de Teff mediada por Treg. Se utilizó IgG como control.

FIG. 33A muestra la estrategia de activación para clasificar subpoblaciones de células T en tumores MBT2.

FIG. 33B proporciona un conjunto de gráficos que muestran subpoblaciones de células T en el día 13, expresadas como porcentaje de células CD45+.

FIG. 34A proporciona una estrategia de activación para clasificar subpoblaciones mieloides en tumores MBT2.

FIG. 34B proporciona un conjunto de gráficos que muestran subpoblaciones de células mieloides en el día 13.

FIG. 34C proporciona datos de FACS que muestran que los macrófagos asociados a tumores en MBT-2 expresan LRRC33 de la superficie celular.

FIG. 34D muestra que las MDSC que infiltran el tumor MBT-2 expresan LRRC33 de la superficie celular.

FIGS. 35A-35C proporcionan análisis de datos FACS adicionales, que muestran los efectos del tratamiento con Ab6 y anti-P_D-1 en tumores MBT2.

FIGS. 36A-36D proporcionan imágenes IHC de secciones tumorales MBT2 representativas que muestran células T CD8 positivas intratumorales.

FIG. 36E proporciona la cuantificación de los datos de IHC de las FIGS. 36A-36D, expresada como fracción de células positivas para CD8 en cada grupo tratado. Las regiones necróticas de las secciones se excluyeron del análisis.

FIG. 36F proporciona análisis inmunohistoquímicos del efecto del tratamiento con Ab6 y anti-PD-1 en tumores MBT2. Se visualizaron secciones de tumor para fosfo-SMAD3 (paneles superiores) o CD8 y CD31 (paneles inferiores) en animales de tres grupos de tratamiento como se muestra.

FIG. 36G proporciona datos que demuestran que Ab6 y anti-PD-1 en combinación parecen desencadenar la movilización de células T CD8+ y la infiltración en tumores MBT2 desde el vaso CD31+.

FIGS. 37A-37D proporcionan expresión génica de marcadores de respuesta inmunitaria, Ptpcr (**FIG. 37A**); CD8a (**FIG. 37B**); CD4 (**FIG. 37C**) y Foxp3 (**FIG. 37D**) recogidos de tumores MBT2 de los 4 grupos de tratamiento como se muestra.

FIGS. 38A-38C proporcionan expresión génica de marcadores de función efectora, Ifng (**FIG. 38A**); Gzmb (**FIG. 38B**); y Prf1 (**FIG. 38C**) el día 10 y/o el día 13, como se indica.

FIG. 38D proporciona un conjunto de gráficos que muestran la expresión de cuatro marcadores genéticos (Granzima B, Perforina, IFN γ y Klrk1) medidos por qPCR en muestras de tumor MBT2 en el día 10. Cada gráfico proporciona un cambio de expresión en los tres grupos de tratamiento: anti-PD-1 solo (izquierda); Ab6 solo (centro); y combinación de anti-PD-1 y Ab6 (derecha).

FIG. 39A muestra la unión in vitro de Ab6 hacia cuatro grandes complejos latentes como se muestra, medidos por un ensayo basado en valoración en equilibrio de solución (MSD-SET). Los valores de K_D medidos (en picomolar) se muestran a la derecha.

FIG. 39B ilustra el ensayo de potencia basado en células LN229 y proporciona un gráfico que muestra la potencia dependiente de la concentración de Ab6 hacia cuatro grandes complejos latentes como se indica. También muestra que Ab6 no inhibe proTGF β 3.

FIG. 40A proporciona un conjunto de nueve gráficos que muestran el efecto de Ab6 en combinación con o sin anti-PD1 y/o anti-TGF β 3 sobre el crecimiento/regresión tumoral a lo largo del tiempo en EMT6 (Estudio 1). La línea de puntos superior dentro de cada gráfico representa el volumen del tumor de punto final de 2000 mm³, mientras que la línea de puntos inferior en cada gráfico representa el 25% del volumen de punto final (es decir, 500 mm³).

FIG. 40B proporciona un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo (días después del inicio del tratamiento) en EMT6 (Estudio 1). Los grupos de tratamiento que incluían tanto anti-PD-1 como Ab6 mostraron un beneficio de supervivencia significativo en comparación con antiPD-1 solo.

FIG. 40C proporciona datos que muestran el porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo (días después del inicio del tratamiento) en EMT6 (Estudio 2). Los grupos de tratamiento que incluyen tanto anti-PD-1 como Ab6 han mostrado un beneficio de supervivencia significativo en comparación con el antiPD-1 solo, y los efectos antitumorales son duraderos una vez finalizado el tratamiento.

FIG. 40D proporciona efectos de la combinación de anti-PD-1 y Ab6 sobre la supervivencia en el modelo de cáncer de mama EMT6.

FIG. 41 proporciona dos gráficos que muestran la expresión relativa de las tres isoformas de TGF β en tumores EMT6 según se mide en niveles de ARNm (izquierda) y niveles de proteína (derecha).

FIG. 42A proporciona un conjunto de imágenes histológicas que muestran tinción plateada de reticulina como marcador de un fenotipo fibrótico de la médula ósea en un modelo de trastorno mieloproliferativo murino.

FIG. 42B proporciona dos gráficos que muestran el análisis histopatológico de la fibrosis de la médula ósea y el efecto de la inhibición de TGF β 1 en ratones MPL W515L con alta carga de enfermedad de dos estudios repetidos separados.

FIG. 42C proporciona un conjunto de gráficos que muestran parámetros hematológicos en ratones MPL W515L tratados con Ab6 o IgG de control.

FIG. 42D proporciona un conjunto de gráficos que muestran parámetros hematológicos adicionales en ratones MPL W515L tratados con Ab6 o IgG de control.

FIG. 43A proporciona un análisis de variación del conjunto de genes (GSVA) que muestra la correlación entre la expresión de la isoforma de TGFβ y el conjunto de genes IPRES.

FIG. 43B proporciona un análisis de variación del conjunto de genes (GSVA) que muestra la correlación entre la expresión de la isoforma de TGFβ y el conjunto de genes Plasari. La expresión de la isoforma de TGFβ1 se correlaciona con la activación de la vía del TGFβ. El conjunto de genes Plasari de genes que responden a TGFβ se correlaciona de manera significativa y fuerte con la expresión de la isoforma de ARN de TGFβ1 en muchos tipos de tumores anotados en TCGA. Correlación del ARNm de TGFβ1 y la firma de señalización de TGFβ.

FIG. 44 proporciona un gráfico que muestra la asociación y disociación de Ab2 contra TGFβ1 C4S a diferentes pH.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTOS ASPECTOS

Definiciones

[0035] Para que la descripción pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Estas definiciones deben leerse a la luz del resto de la descripción y según entienda un experto en la materia. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

[0036] *Cáncer avanzado, enfermedad maligna avanzada:* El término "cáncer avanzado" o "enfermedad maligna avanzada" como se usa en el presente documento tiene el significado entendido en la técnica pertinente, por ejemplo, tal como se entiende por los oncólogos en el contexto de diagnóstico o tratamiento de sujetos/pacientes con cáncer. La enfermedad maligna avanzada con un tumor sólido puede ser *localmente avanzada* o *metastásica*. El término "cáncer localmente avanzado" se utiliza para describir un cáncer (p. ej., un tumor) que ha crecido fuera del órgano en donde se originó, pero que aún no se ha diseminado a partes distantes del cuerpo. Por lo tanto, el término incluye el cáncer que se ha diseminado desde donde comenzó hasta los tejidos o los ganglios linfáticos cercanos. Por el contrario, el "cáncer metastásico" es un cáncer que se ha diseminado desde la parte del cuerpo donde se originó (el sitio primario) a otras partes (p. ej., partes distantes) del cuerpo.

[0037] *Afinidad:* La afinidad es la fuerza de unión de una molécula (tal como un anticuerpo) a su ligando (tal como un antígeno). Por lo general, se mide y se informa mediante la constante de disociación de equilibrio (K_D). En el contexto de las interacciones anticuerpo-antígeno, K_D es la relación entre la tasa de disociación del anticuerpo ("tasa inactiva" o K_{off}), la rapidez con la que se disocia de su antígeno y la tasa de asociación del anticuerpo ("tasa activa" o K_{on}) del anticuerpo, con qué rapidez se une a su antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo con una afinidad ≤ 5 nM tiene un valor K_D que es 5 nM o menor (es decir, afinidad 5 nM o mayor) determinado por un ensayo de unión in vitro adecuado. Pueden usarse ensayos in vitro adecuados para medir los valores de K_D de un anticuerpo para su antígeno, tales como interferometría de biocapa (BLI) y valoración de equilibrio de solución (p. ej., MSD-SET).

[0038] *Anticuerpo:* El término "anticuerpo" abarca cualquier inmunoglobulina de origen natural, recombinante, modificada o diseñada o estructura similar a inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno o porción del mismo, o derivado del mismo, como se describe adicionalmente en este documento. Por tanto, el término se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno diana e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un anticuerpo intacto comprenderá generalmente al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, pero en algunos casos puede incluir menos cadenas tales como anticuerpos que se encuentran naturalmente en los camélidos que pueden comprender solo cadenas pesadas. Los anticuerpos pueden derivarse únicamente de una única fuente, o pueden ser "quiméricos", es decir, diferentes porciones del anticuerpo pueden derivarse de dos anticuerpos diferentes. Los anticuerpos, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden producir en hibridomas, mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. El término anticuerpos, como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en el presente documento "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces denominadas en el presente documento) como "conjugados de anticuerpos", respectivamente. En algunas formas de realización, el término también incluye peptidocuerpos.

[0039] *Antígeno:* El término "antígeno" incluye ampliamente cualesquiera moléculas que comprenden un determinante antigénico dentro de una región de unión a la que un anticuerpo o un fragmento se une específicamente. Un antígeno puede ser una molécula de una sola unidad (como un monómero de proteína o un fragmento) o un complejo compuesto por múltiples componentes. Un antígeno proporciona un epítipo, por ejemplo, una molécula o una porción de una molécula, o un complejo de moléculas o porciones de moléculas, capaz de unirse mediante

un agente de unión selectiva, como una proteína de unión a antígeno (que incluye, por ejemplo, un anticuerpo). Por tanto, un agente de unión selectiva puede unirse específicamente a un antígeno que está formado por dos o más componentes en un complejo. En algunas formas de realización, el antígeno puede usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a ese antígeno. Un antígeno puede poseer uno o más epítomos que son capaces de interactuar con diferentes proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos. En el contexto de la presente divulgación, un antígeno adecuado es un complejo (p. ej., complejo multimérico compuesto por múltiples componentes en asociación) que contiene un dímero de proTGF en asociación con una molécula de presentación. Cada monómero del dímero de proTGF comprende un prodominio y un dominio de factor de crecimiento, separados por una secuencia de escisión de furina. Dos de tales monómeros forman el complejo dímero de proTGF (véase, por ejemplo, la FIG. 18B y 22B). Esto, a su vez, está asociado covalentemente con una molécula presentadora a través de enlaces disulfuro, que implican un residuo de cisteína presente cerca del extremo N de cada uno de los monómeros proTGF. Este multicomplejo formado por un dímero de proTGF unido a una molécula de presentación se denomina generalmente complejo latente grande. Un complejo de antígeno adecuado para cribar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, incluye un componente de molécula presentadora de un complejo latente grande. Tal componente de la molécula presentadora puede ser una molécula presentadora de longitud completa o un fragmento de la misma. Las porciones mínimas requeridas de la molécula de presentación contienen típicamente al menos 50 aminoácidos, pero más preferiblemente al menos 100 aminoácidos del polipéptido de la molécula de presentación, que comprende dos residuos de cisteína capaces de formar enlaces covalentes con el dímero de proTGFβ1.

[0040] El porción/fragmento de unión a antígeno: Los términos "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., TGFβ1). Las porciones de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. En algunas formas de realización, una parte de un anticuerpo que se une al antígeno se puede derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas utilizando cualquier técnica estándar adecuada, como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión del ADN que codifica el anticuerpo variable y opcionalmente dominios constantes. Los ejemplos no limitantes de porciones de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH1; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) moléculas Fv monocaténarias (scFv) (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) SCIENCE 242:423-426; y Huston et al. (1988) PROC. NAT'L. ACAD. Sci. EE. UU. 85: 5879-5883); (vi) fragmentos de dAb (véase, por ejemplo, Ward et al. (1989) NATURE 341: 544-546); y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (p. ej., una región determinante de complementariedad aislada (CDR)). También se incluyen otras formas de anticuerpos monocaténarios, como los diacuerpos. El término porción de unión a antígeno de un anticuerpo incluye un "fragmento Fab de cadena única" también conocido como "scFab", que comprende un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante de anticuerpo 1 (CH1), un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo (CL) y un enlazador, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazador tienen uno de los siguientes órdenes en la dirección N-terminal a C-terminal: a) VH-CH1-enlazador-VL-CL, b) VL-CL-enlazador-VH-CH1, c) VH-CL-enlazador-VL-CH1 o d) VL-CH1-enlazador-VH-CL; y en donde dicho enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferiblemente entre 32 y 50 aminoácidos.

[0041] Sesgo: En el contexto de la presente descripción, el término "sesgo" se refiere a la afinidad sesgada o desigual hacia o contra un subconjunto de antígenos a los que un anticuerpo es capaz de unirse específicamente. Por ejemplo, se dice que un anticuerpo tiene sesgo cuando la afinidad por un complejo de antígeno y la afinidad por otro complejo de antígeno no son equivalentes. Los anticuerpos independientes del contexto de acuerdo con la presente divulgación tienen afinidades equivalentes hacia dichos complejos de antígenos (es decir, insesgados).

[0042] Región de unión: Como se usa aquí, una "región de unión" es una porción de un antígeno que, cuando se une a un anticuerpo o un fragmento del mismo, puede formar una interfaz de la interacción anticuerpo-antígeno. Tras la unión del anticuerpo, una región de unión se protege de la exposición de la superficie, que puede detectarse mediante técnicas adecuadas, como HDX-MS. La interacción anticuerpo-antígeno puede estar mediada por múltiples (p. ej., dos o más) regiones de unión. Una región de unión puede comprender un determinante antigénico o epítipo.

[0043] Interferometría de dos capas (BLI): BLI es una tecnología libre de etiqueta para medir ópticamente interacciones biomoleculares, por ejemplo, entre un ligando inmovilizado sobre la superficie de la punta biosensor y un analito en solución. BLI brinda la capacidad de monitorear la especificidad de unión, las tasas de asociación y disociación, o la concentración, con precisión y exactitud. Los instrumentos de la plataforma BLI están disponibles comercialmente, por ejemplo, en ForteBio y se conocen comúnmente como el sistema Octet®.

[0044] Cáncer: El término "cáncer" como se usa aquí se refiere a la condición fisiológica en los eucariotas multicelulares que se caracteriza típicamente por una proliferación celular no regulada y enfermedad maligna. El término abarca de manera amplia, neoplasias malignas sólidas y líquidas, que incluyen tumores, cánceres de la sangre (p. ej., leucemias, linfomas y mielomas), así como mielofibrosis.

[0045] *proTGFβ1 asociados a células*: El término se refiere a TGFβ1 o su complejo de señalización (p. ej., TGFβ1 pro/latente) que es unido a la membrana (p. ej., atado a la superficie celular). Normalmente, dicha célula es una célula inmunitaria. TGFβ1 que es presentado por GARP o LRRC33 es un TGFβ1 asociado a células. GARP y LRRC33 son moléculas presentadoras de transmembrana que se expresan en la superficie celular de ciertas células. GARP-proTGFβ1 y LRRC33- puede ser denominado colectivamente como complejos proTGFβ1 "asociados a células" (o "superficie celular"), que median activación/señalización de TGFβ1 asociada a célula proTGFβ1 (p. ej., asociada a células inmunitarias). El término también incluye complejos GARP-proTGFβ1 recombinantes purificados y LRRC33-proTGFβ1 en solución (p. ej., ensayos in vitro) que no están unidos físicamente a las membranas celulares. Los valores promedio de K_D de un anticuerpo (o su fragmento) a un complejo de GARP-proTGFβ1 y un complejo de LRRC33-proTGFβ1 se puede calcular para representar colectivamente afinidades para complejos proTGFβ1 asociados a células (p. ej., asociados a células inmunitarias). Ver, por ejemplo, Tabla 8, columna (G). La contraparte humana de una molécula presentadora o un complejo de moléculas presentadoras puede estar indicada por una "h" que precede a la proteína o complejo proteico, por ejemplo, "hGARP", "hGARP-proTGFβ1", "hLRRC33" y "hLRRC33-proTGFβ1". Además de bloquear la liberación del factor de crecimiento TGFβ1 activo de los complejos unidos a las células, el proTGFβ1 asociado a las células puede ser un objetivo para la internalización (p. ej., endocitosis) y/o la muerte celular como el agotamiento mediado por ADCC, ADCP, o ADC de las células diana que expresan dichos complejos de la superficie celular.

[0046] *Inhibidor de punto de control*: En el contexto de esta descripción, los inhibidores de punto de control se refieren a inhibidores de punto de control inmunológico y llevan el significado tal como se entiende en la técnica. Típicamente, el objetivo es una molécula receptora en células T o células NK, o el ligando de superficie celular correspondiente en células presentadoras de antígeno (APC) o células tumorales. Los puntos de control inmunológico se activan en las células inmunitarias para evitar que se desarrolle inmunidad inflamatoria contra el "yo". Por lo tanto, cambiar el equilibrio del sistema inmunológico a través de la inhibición de los puntos de control debe permitir que se active por completo para detectar y eliminar el cáncer. Los receptores inhibidores más conocidos implicados en el control de la respuesta inmunitaria son el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), la proteína de muerte celular programada 1 (P_D-1), P_D-L1 , el dominio de inmunoglobulina de células T y el dominio de mucina 3 (TIM3), gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas (KIR), receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR) y supresor de la activación de células T que contiene inmunoglobulina (Ig) de dominio V (VISTA). Los ejemplos no limitantes de inhibidores de puntos de control incluyen: Nivolumab, Pembrolizumab, BMS-936559, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Ipilimumab, Tremelimumab, IMP-321, BMS-986016 y Lirilumab. Keytruda® es un ejemplo de inhibidores de P_D-1 . Las terapias que emplean uno o más de los inhibidores de puntos de control inmunitarios pueden denominarse terapia de bloqueo de puntos de control (TCC).

[0047] *Beneficio clínico*: Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "beneficios clínicos" incluya tanto la eficacia como la seguridad de una terapia. Por tanto, el tratamiento terapéutico que logra un beneficio clínico deseable es tanto eficaz (p. ej., logra efectos terapéuticamente beneficiosos) como seguro (p. ej., con niveles tolerables o aceptables de toxicidades o eventos adversos).

[0048] *Terapia de combinación*: "Terapia de combinación" se refiere a los regímenes de tratamiento para una indicación clínica que comprenden dos o más agentes terapéuticos. Por tanto, el término se refiere a un régimen terapéutico en donde se administra una primera terapia que comprende una primera composición (p. ej., Ingrediente activo) junto con una segunda terapia que comprende una segunda composición (ingrediente activo) a un paciente, destinada a tratar la misma o enfermedad o condición clínica superpuesta. Las composiciones primera y segunda pueden actuar ambas sobre el mismo objetivo celular o sobre objetivos celulares discretos. La frase "junto con", en el contexto de las terapias de combinación, significa que los efectos terapéuticos de una primera terapia se superponen temporal y/o espacialmente con los efectos terapéuticos de una segunda terapia en el sujeto que recibe la terapia de combinación. Por tanto, las terapias de combinación se pueden formular como una única formulación para la administración concurrente, o como formulaciones separadas, para la administración secuencial de las terapias. Cuando un sujeto que ha sido tratado con una primera terapia para tratar una enfermedad se administra con una segunda terapia para tratar la misma enfermedad, la segunda terapia puede ser referida como un *complemento de la terapia o terapia adyuvante*.

[0049] *Epítipo combinatorio*: Un epítipo combinatorio es un epítipo que es reconocido y unido por un anticuerpo combinatorio en un sitio (es decir, determinante antigénico) formado por porciones no contiguas de un componente o componentes de un antígeno, que, en una estructura tridimensional, se unen en estrecha proximidad para formar el epítipo. Por tanto, los anticuerpos de la invención pueden unirse a un epítipo formado por dos o más componentes (p. ej., porciones o segmentos) de un complejo de TGFβ1 pro/latente. Un epítipo combinatorio puede comprender residuo(s) de aminoácido de un primer componente del complejo y residuo(s) de aminoácido de un segundo componente del complejo, y así sucesivamente. Cada componente puede ser de una sola proteína o de dos o más proteínas de un complejo antigénico. Se forma un epítipo combinatorio con contribuciones estructurales de dos o más componentes (p. ej., porciones o segmentos, tales como residuos de aminoácidos) de un antígeno o complejo de antígeno.

[0050] *Competir o competir de forma cruzada; bloqueo cruzado*: el término "competir" cuando se usa en el contexto de proteínas de unión a antígeno (p. ej., un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo) que compiten por el mismo epítipo significa competencia entre proteínas de unión a antígeno según lo determinado por un ensayo en donde la proteína de unión a antígeno que se está probando previene o inhibe (p. ej., reduce) la unión específica de una proteína de unión al antígeno de referencia a un antígeno común (p. ej., TGFβ1 o un fragmento del mismo). Se pueden usar

numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si una proteína de unión a antígeno compete con otra, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competencia en sándwich; EIA biotina-avidina directo en fase sólida; ensayo de marcación directa en fase sólida y ensayo sándwich de marcación directa en fase sólida. Por lo general, cuando una proteína de unión a antígeno competidora está presente en exceso, inhibirá (p. ej., reducirá) la unión específica de una proteína de unión a antígeno de referencia a un antígeno común en al menos 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% o 75% o más. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos un 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% o 97% o más.

[0051] En algunas formas de realización, un primer anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo y un segundo anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo "*bloque cruzado*" entre sí con respecto al mismo antígeno, por ejemplo, como se ensayó por Biacor o Octet®, utilizando condiciones de prueba estándar, por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (p. ej., unión ensayada a temperatura ambiente, ~20-25°C). En algunas formas de realización, el primer anticuerpo o fragmento del mismo y el segundo anticuerpo o fragmento del mismo pueden tener el mismo epítipo. En otras formas de realización, el primer anticuerpo o fragmento del mismo y el segundo anticuerpo o fragmento del mismo pueden tener epítopos no idénticos pero superpuestos. En otras formas de realización más, el primer anticuerpo o fragmento del mismo y el segundo anticuerpo o fragmento del mismo pueden tener epítopos separados (diferentes) que están muy próximos en un espacio tridimensional, de modo que la unión del anticuerpo se bloquea de forma cruzada mediante impedimento estérico. "Bloqueo cruzado" significa que la unión del primer anticuerpo a un antígeno evita la unión del segundo anticuerpo al mismo antígeno y, de manera similar, la unión del segundo anticuerpo a un antígeno evita la unión del primer anticuerpo al mismo antígeno.

[0052] La agrupación de anticuerpos (a veces denominada agrupación de epítopos o mapeo de epítopos) se puede llevar a cabo para caracterizar y clasificar un conjunto (p. ej., "una biblioteca") de anticuerpos monoclonales elaborados contra una proteína diana o un complejo proteico (es decir, un antígeno). Dichos anticuerpos contra la misma diana se prueban contra todos los demás anticuerpos de la biblioteca por pares para evaluar si los anticuerpos bloquean la unión de los demás al antígeno. Los perfiles de agrupamiento estrechamente relacionados indican que los anticuerpos tienen el mismo epítipo o un epítipo estrechamente relacionado (p. ej., superpuesto) y están agrupados juntos. El binning proporciona perfiles de estructura-función útiles de anticuerpos que comparten regiones de unión similares dentro del mismo antígeno porque es probable que las actividades biológicas (p. ej., intervención, potencia) efectuadas por la unión de un anticuerpo a su diana se transfieran a otro anticuerpo en el mismo bin. Por tanto, entre los anticuerpos dentro del mismo grupo de epítopos, aquellos con afinidades más altas (KD más bajo) típicamente tienen mayor potencia.

[0053] *Región determinante de complementariedad:* Como se usa aquí, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de anticuerpos. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una única región variable que puede unirse al antígeno. Los límites exactos de estos CDR se han definido de manera diferente según los diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al. (1987; 1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md.)) no solo proporciona un sistema inequívoco de numeración de residuos aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y col. (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; y Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883) encontró que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, o L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 o H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3, donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Padlan (1995) *FASEB J.* 9: 133-139 y MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* han descrito los límites que definen las CDR que se solapan con las CDR de Kabat. *Biol.* 262 (5): 732-45. Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas de este documento, pero no obstante se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o resultados experimentales de que residuos particulares o grupos de residuos o incluso CDR completos no impactan significativamente en la unión del antígeno (ver, por ejemplo: Lu X et al, *MAbs.* 2019 enero; 11 (1): 45-57). Los métodos usados en este documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas formas de realización usan CDR definidas por Kabat o Chothia.

[0054] *Epítipo conformacional:* Un epítipo conformacional es un epítipo que es reconocido y unido por un anticuerpo conformacional en una conformación tridimensional, pero no en un péptido desplegado de la misma secuencia de aminoácidos. Un epítipo conformacional puede denominarse epítipo específico de la conformación, epítipo dependiente de la conformación o epítipo sensible a la conformación. Un anticuerpo correspondiente o fragmento del mismo que se une específicamente a dicho epítipo puede denominarse anticuerpo específico de conformación, anticuerpo selectivo de conformación o anticuerpo dependiente de conformación. La unión de un antígeno a un epítipo conformacional depende de la estructura tridimensional (conformación) del antígeno o complejo de antígeno.

[0055] *Región constante:* Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena ligera o pesada. Las secuencias de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humana son

conocidas en la técnica.

[0056] Sesgado por contexto: Como se usa en este documento, "anticuerpos sesgados por contexto" se refiere a un tipo de anticuerpos conformacionales que se une a un antígeno con afinidades diferenciales cuando el antígeno está asociado con (es decir, unido a o enlazado a) una proteína de interacción o un fragmento de la misma. Por tanto, un anticuerpo de contexto sesgado que se une específicamente a un epítipo dentro de proTGFβ1 puede unirse a LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1 con diferentes afinidades. Por ejemplo, se dice que un anticuerpo está "sesgado por la matriz" si tiene mayores afinidades por los complejos de proTGFβ1 asociados a la matriz (p. ej., LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1) que para complejos de proTGFβ1 asociados a células (p. ej., GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1). Las afinidades relativas de [complejos asociados a matriz]: [complejos asociados a células] pueden obtenerse tomando los valores K_D promedio del primero, tomando los valores K_D promedio del último y calculando la relación de los dos, como se ejemplifica en el presente documento.

[0057] Independientes del contexto: De acuerdo con la presente descripción, "un anticuerpo independiente del contexto" que se une proTGFβ1 tiene afinidades equivalentes en todos los cuatro complejos conocidos de molécula-proTGFβ1 que se presentan, a saber, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1. Los anticuerpos independientes del contexto descritos en la presente solicitud también pueden caracterizarse como *insesgados*. Por lo general, los anticuerpos independientes del contexto muestran afinidades equivalentes (es decir, sesgo de no más de cinco veces), de modo que las proporciones relativas de los valores de K_D medidos entre los complejos asociados a la matriz y los complejos asociados a las células no son superiores a 5 según lo medido por un ensayo de unión in vitro adecuado, como resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa (BLI) y/o valoración en equilibrio de solución (p. ej., MSD-SET).

[0058] TGFβ1/proTGFβ1 asociado a ECM: El término se refiere a TGFβ1 o su complejo de señalización (p. ej., TGFβ1 prolatente) que es un componente de (p. ej., depositado en) la matriz extracelular. El TGFβ1 que se presenta por LTBP1 o LTBP3 es un TGFβ1 asociado a ECM, a saber, LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1, respectivamente. Las LTBP son críticas para el depósito correcto y la posterior biodisponibilidad de TGFβ en la ECM, donde se cree que la fibrilina (Fbn) y la fibronectina (FN) son las principales proteínas de la matriz responsables de la asociación de las LTBP con la ECM. Dichos complejos latentes asociados a la matriz están enriquecidos en tejidos conectivos, así como en ciertos tejidos asociados a enfermedades, como el estroma tumoral y los tejidos fibróticos. La contraparte humana de una molécula de presentación o complejo de moléculas de presentación puede estar indicada por una "h" que precede a la proteína o complejo de proteína, por ejemplo, "hLTBP1", "hLTBP1-proTGFβ1", "hLTBP3" y "hLTBP3-proTGFβ1."

[0059] Cantidad eficaz: una 'cantidad eficaz' (o cantidad terapéuticamente eficaz o dosis terapéutica) es una dosis o un régimen de dosificación que logre beneficios clínicos estadísticamente significativos (p. ej., eficacia) en una población de pacientes, por ejemplo, se ha demostrado que el Ab6 es eficaz a dosis tan bajas como 3 mg/kg y tan altas como 30 mg/kg en modelos preclínicos, por lo que se puede decir que una cantidad eficaz de Ab6 está entre aproximadamente 3-30 mg/kg.

[0060] Control del tumor eficaz: El término "control del tumor eficaz" puede usarse para referirse a un grado de regresión del tumor logrado en respuesta al tratamiento, donde, por ejemplo, el tumor es retrocedido por una fracción definida (como <25%) de un volumen de tumor de punto final. Por ejemplo, en un modelo particular, si el volumen de tumor de punto final se establece en 2.000 mm³, se logra un control tumoral eficaz si el tumor se reduce a menos de 500 mm³ asumiendo el umbral de <25%. Por tanto, un control tumoral eficaz comprende una regresión completa. Clínicamente, el control tumoral eficaz incluye la respuesta parcial (RP) y la respuesta completa (CR) según los criterios reconocidos en la técnica, como RECIST 1.1 y el iRECIST correspondiente. En algunas formas de realización, el control eficaz de tumores en entornos clínicos también incluye enfermedad estable, en donde los tumores que típicamente se espera que crezcan a ciertas velocidades se previenen de tal crecimiento mediante el tratamiento, incluso aunque no se consiga el encogimiento.

[0061] Células T efectoras: Células T efectoras, como se usa en este documento, son los linfocitos T que responden activamente inmediatamente a un estímulo, como co-estimulación e incluyen, pero no se limitan a células T CD4⁺ (también denominadas como células auxiliares T o Th) y células T CD8⁺ (también denominadas células T citotóxicas). Las células Th ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluida la maduración de las células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Estas células también se conocen como células T CD4⁺ porque expresan la glicoproteína CD4 en sus superficies. Las células T colaboradoras se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos mediante moléculas MHC de clase II, que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez activados, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citoquinas que regulan o ayudan en la respuesta inmunitaria activa. Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, que incluyen Th1, Th2, Th3, Th17, Th9 o TFh, que secretan diferentes citoquinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunes. La señalización de APC dirige a las células T a subtipos particulares. Citotóxico (Asesino). Las células T citotóxicas (células TC, CTL, células T asesinas, células asesinas T), por otro lado, destruyen las células infectadas por virus y las células cancerosas, y también están implicadas en el rechazo de los trasplantes. Estas células también se conocen como células T CD8⁺, ya que expresan la glicoproteína CD8 en sus superficies. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con las moléculas del MHC de clase I, que están presentes en la superficie de todas las células nucleadas. Células efectoras citotóxicas (p. ej., células CD8⁺) incluyen, por ejemplo, perforina y granzima B.

- [0062] Epítopo:** El término "epítopo" puede ser también referido como un determinante antigénico, es un determinante molecular (p. ej., polipéptido determinante) que puede estar unido específicamente por un agente de unión, inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes de epítopo incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo reconocido por un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es un elemento estructural de un antígeno que interactúa con las CDR (p. ej., el sitio complementario) del anticuerpo o el fragmento. Un epítopo puede formarse mediante contribuciones de varios residuos de aminoácidos, que interactúan con las CDR del anticuerpo para producir especificidad. Un fragmento antigénico puede contener más de un epítopo. En determinadas formas de realización, un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Por ejemplo, se dice que los anticuerpos "se unen al mismo epítopo" si los anticuerpos compiten de forma cruzada (uno evita el efecto de unión o modulación del otro).
- [0063] Afinidad equivalente:** En el contexto de la presente descripción, se entiende que el término "afinidad/afinidades equivalente(s)" significa: i) el anticuerpo se une los complejos proTGFb1 asociados a matriz y complejos de proTGFb1 asociados a células con sesgo de menos de cinco veces en afinidad, medida mediante ensayos de unión in vitro adecuados, como titulación en equilibrio de solución (como MSD-SET), interferometría de biocapa (como Octet®) o resonancia de plasmón superficial (como Biacore System; y/o, ii) afinidades relativas del anticuerpo por los cuatro complejos son uniformes en que: o bien, la afinidad más baja (valor numérico de KD más alto) que muestra el anticuerpo entre los cuatro complejos de antígeno no es más de cinco veces menor que el valor promedio calculado a partir de las tres afinidades restantes; o, la afinidad más alta (valor numérico de KD más bajo) que muestra el anticuerpo entre los cuatro complejos de antígeno no es más de cinco veces mayor que el promedio calculado a partir de las tres afinidades restantes. Los anticuerpos con afinidades equivalentes pueden lograr efectos inhibidores más uniformes, independientemente de la molécula de presentación particular asociada con el complejo proTGFβ1 (por lo tanto, "independiente del contexto"). En formas de realización particularmente preferidas, el sesgo observado en las afinidades promedio entre los complejos asociados a la matriz y los complejos asociados a las células no es más de tres veces.
- [0064] Lazo de latencia extendido:** El término "lazo de latencia extendido" tal como se utiliza aquí se refiere a una porción del prodominio que comprende lazo de latencia y hélice alfa-2, por ejemplo, LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (SEQ ID NO: 154). En algunas formas de realización, el lazo de latencia extendido comprende además una parte de hélice alfa-1, por ejemplo, LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159) o una parte de la misma.
- [0065] Fibrosis:** El término "fibrosis" o "condición/trastorno fibrótico" se refiere al proceso o manifestación caracterizada por la acumulación patológica de componentes de la matriz extracelular (ECM), tales como colágenos, dentro de un tejido u órgano.
- [0066] Microambiente fibrótico:** El término "microambiente fibrótico" se refiere a un nicho local de la enfermedad dentro de un tejido, en donde la fibrosis se produce in vivo. El microambiente fibrótico puede comprender la firma molecular asociada a la enfermedad (un conjunto de quimiocinas, citoquinas, etc.), poblaciones de células asociadas a la enfermedad (como macrófagos activados, MDSC, etc.) así como entornos ECM asociados a la enfermedad (alteraciones en componentes y/o estructura ECM). Se cree que el microambiente fibrótico apoya la transición de fibroblasto a miofibroblasto positivo de actina de músculo liso α de una manera dependiente de TGFβ. El microambiente fibrótico puede caracterizarse además por la infiltración de ciertas células inmunitarias (como macrófagos y MDSC).
- [0067] Dedo-1 (de Factor de Crecimiento TGFβ1):** Como se usa en este documento, "Dedo-1" es un dominio dentro del dominio del factor de crecimiento TGFβ1. En su forma no mutada, Dedo-1 del proTGFβ1 humano contiene la siguiente secuencia de aminoácidos: CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC (SEQ ID NO: 151). En la estructura 3D, el dominio Dedo-1 (una parte se muestra como región "5a" en las FIGS. 21A y 21B) se encuentra muy cerca de Lazo de Latencia.
- [0068] Dedo-2 (de Factor de Crecimiento TGFβ1):** Como se usa en este documento, "Dedo-2" es un dominio dentro de la dominio del factor de crecimiento TGFβ1. En su forma no mutada, Dedo-2 del proTGFβ1 humano contiene la siguiente secuencia de aminoácidos: CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 152). El Dedo-2 incluye la "región de unión 6" (es decir, "6a" y "6b") representada en las FIGS. 21A y 21B, que se encuentran espacialmente muy cerca del Lazo de Latencia.
- [0069] Complejo de GARP-proTGFβ1:** Como se usa aquí, el término "complejo de GARP-TGFβ1" se refiere a una proteína compleja que comprende una forma pro-proteína o forma latente de una proteína de crecimiento transformante de factor β1 (TGFβ1) y una proteína predominante de repeticiones de glicoproteína A (GARP) o fragmento o variante del mismo. En algunas formas de realización, una forma pro-proteína o una forma latente de la proteína TGFβ1 puede denominarse "proteína TGFβ1 pro/latente". En algunas formas de realización, un complejo de GARP-TGFβ1 comprende GARP unido covalentemente con TGFβ1 pro/latente mediante uno o más enlaces disulfuro. En la naturaleza, tales enlaces covalentes se forman con residuos de cisteína presentes cerca del extremo N-terminal (p. ej., aminoácido en la posición 4) de un complejo dímero de proTGFβ1. En otras formas de realización, un complejo de GARP-TGFβ1 comprende GARP unido de forma no covalente con TGFβ1 pro/latente. En algunas formas de realización, un complejo de GARP-TGFβ1 es un

complejo de origen natural, por ejemplo, complejo de GARP-TGFβ1 en una célula. El término "hGARP" denota GARP humano.

[0070] Afinidad alta: Como se usa aquí, el término "alta afinidad" como en "un anticuerpo proTGFβ1 de alta afinidad" se refiere a actividades in vitro de unión que tienen un valor K_D de ≤ 5 nM, más preferiblemente ≤ 1 nM. Por lo tanto, un anticuerpo proTGFβ1 de alta afinidad es independiente del contexto incluido en la presente invención tiene un valor K_D de ≤ 1 nM, hacia cada uno de los siguientes complejos antigénicos: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1.

[0071] Anticuerpo humano: El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas. Los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, en secuencias marco humanas.

[0072] Anticuerpo humanizado: El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos, que comprenden secuencias pesadas y ligeras de la región variable de la cadena de una especie no humana (p. ej., un ratón) pero en donde al menos una porción de secuencia de VH y/o VL se ha alterado para que sea más "similar a la humana", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en donde las secuencias de CDR humanas se introducen en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas. También "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo, o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo, que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región FR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en este documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En formas de realización específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

[0073] Espectrometría de masas de cambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS): HDX-MS es una técnica bien conocida empleada para interrogar la confirmación de proteína e interacciones de proteína-proteína en solución mediante la medición del grado de accesibilidad al disolvente. Véase, por ejemplo, Wei et al, (2014) Drug Discov Today 19 (1): 95-102. "Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications". La técnica HDX-MS puede emplearse para determinar una región o regiones de un antígeno unido por un anticuerpo (es decir, "región(es) de unión"). Por tanto, dicha región o regiones de unión puede(n) contener o formar un epítipo.

[0074] Tumor inmune-excluido o inmunológicamente excluido: Como se usa en este documento, tumores caracterizados como "inmune excluidos" están desprovistos de o sustancialmente desprovistos de los linfocitos anti-tumorales intratumorales. Por ejemplo, los tumores con células T poco infiltradas pueden tener células T que rodean al tumor, por ejemplo, los perímetros externos de una masa tumoral y/o cerca de la vecindad de vasculaturas ("perivasculares") de un tumor, que sin embargo no logran enjamburar de manera efectiva en el tumor para ejercer una función citotóxica contra las células cancerosas. En otras situaciones, los tumores no provocan una fuerte respuesta inmunitaria (los denominados tumores "fríos" o "con ausencia de inmunidad") de modo que hay pocas células T presentes cerca y en el entorno del tumor. A diferencia de los tumores inmunoexcluidos, los tumores que están infiltrados con linfocitos antitumorales se caracterizan a veces como tumores "calientes" o "inflamados"; tales tumores tienden a responder más y, por lo tanto, son el objetivo de las terapias de bloqueo de puntos de control inmunológico ("TCC"). Sin embargo, por lo general, solo una fracción de los pacientes responde a una TCC debido a la exclusión inmunitaria que hace que el tumor sea resistente a la TCC.

[0075] Inmunosupresión, inmunosupresor: Los términos se refieren a la capacidad de suprimir las células inmunitarias, tales como células T, células NK y células B. El estándar de oro para evaluar la función inmunosupresora es la inhibición de la actividad de las células T, que puede incluir supresión específica de antígeno y supresión inespecífica. Las células T reguladoras (Tregs) y las MDSC pueden considerarse células inmunosupresoras. Los macrófagos polarizados M2 (p.

ej., macrófagos localizados en enfermedades tales como TAM y FAM) también pueden caracterizarse como inmunosupresores.

[0076] Memoria inmunológica: La memoria inmunológica se refiere a la capacidad del sistema inmunitario para reconocer de forma rápida y específicamente un antígeno que el cuerpo ha encontrado previamente e iniciar una respuesta inmunitaria correspondiente. Generalmente, estas son respuestas inmunes secundarias, terciarias y otras posteriores al mismo antígeno. La memoria inmunológica es responsable del componente de adaptación del sistema inmunitario, células T y B especiales –las llamadas células T y B de memoria. Las células T sin antígeno se expanden y se diferencian en células T de memoria y efectoras después de encontrar sus antígenos afines en el contexto de una molécula de MHC en la superficie de una célula presentadora de antígeno profesional (p. ej., una célula dendrítica). El único tema unificador para todos los subtipos de células T de memoria es que tienen una vida larga y pueden expandirse rápidamente a un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno afín. Mediante este mecanismo, proporcionan al sistema inmunológico "memoria" contra patógenos encontrados previamente. Las células T de memoria pueden ser CD4+ o CD8+ y normalmente expresan CD45RO. En un entorno preclínico, la memoria inmunológica puede probarse en un paradigma de reexposición al tumor.

[0077] Específico a isoforma: El término "especificidad de isoformas" se refiere a la capacidad de un agente para discriminar una isoforma sobre otras isoformas estructuralmente relacionadas (es decir, la selectividad). Un inhibidor de TGFβ específico de isoforma ejerce su actividad inhibidora hacia una isoforma de TGFβ pero no las otras isoformas de TGFβ a una concentración dada. Por ejemplo, un anticuerpo de TGFβ1 específico de isoforma se une selectivamente al TGFβ1. Un inhibidor específico de TGFβ1 (anticuerpo) se dirige preferentemente a (se une y así inhibe) la isoforma de TGFβ1 sobre TGFβ2 o TGFβ3 con sustancialmente mayor afinidad. Por ejemplo, la selectividad en este contexto puede referirse a una diferencia de al menos 500-1000 veces en las afinidades respectivas medidas mediante un ensayo de unión in vitro como Octet® y Biacor. En algunas formas de realización, la selectividad es tal que el inhibidor cuando se usa en una dosis eficaz para inhibir TGFβ1 in vivo no inhibe TGFβ2 y TGFβ3. Para que este inhibidor sea útil para propósitos terapéuticos, la dosis para lograr los efectos deseados (p. ej., cantidades terapéuticamente eficaces) debe ubicarse dentro de la ventana dentro de la cual el inhibidor puede inhibir eficazmente la isoforma de TGFβ1 sin inhibir TGFβ2 o TGFβ3.

[0078] Aislado: Un anticuerpo "aislado" como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. En algunas formas de realización, un anticuerpo aislado está sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos no deseados.

[0079] Complejo latente grande: El término "complejo latente grande" ("LLC") en el contexto de la presente descripción se refiere a un complejo que consta de un dímero de proTGFβ1 unido a la llamada molécula de presentación. Por tanto, un complejo latente grande es un complejo de molécula proTGFβ1 presentadora, como LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1. Dichos complejos pueden formarse in vitro usando componentes purificados recombinantes capaces de formar el complejo. Para fines de cribado, las moléculas de presentación utilizadas para formar tales LLC no necesitan ser polipéptidos de longitud completa; sin embargo, típicamente se requiere la porción de la proteína capaz de formar enlaces disulfuro con el complejo dímero proTGFβ1 a través de los residuos de cisteína cerca de sus regiones N-terminales.

[0080] Péptido asociado a latencia (LAP): LAP es el llamado "prodominio" de proTGFβ1. Como se describe en más detalle en este documento, LAP está compuesta del dominio "Camisa de Fuerza" y el dominio "brazo". Camisa de Fuerza en sí se divide en los dominios de Hélice Alfa-1 y Lazo de Latencia.

[0081] Lazo de Latencia: Como se usa en este documento, "Lazo de Latencia," a veces también denominado *Lazo de Latencia*, es un dominio flanqueado por Hélice de Alfa-1 y el Brazo dentro del prodominio de proTGFβ1. En su forma no mutada, Lazo de Latencia del proTGFβ1 humano comprende la secuencia de aminoácidos: LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153) y corresponde sustancialmente a las regiones "2a" y "2b" mostradas en la FIG. 21A y se extiende por la Región 1 identificada en la FIG. 22A. Como se usa en este documento, el término región de lazo de latencia extendida "se refiere al lazo de latencia junto con su motivo C-terminal inmediato denominado hélice alfa-2 (hélice α2) del prodominio. El residuo de prolina que está en el extremo C del lazo de latencia proporciona el "giro" perpendicular como un "codo" que conecta el bucle de lazo a la hélice α2. El lazo de latencia extendido comprende las regiones que se muestran como "2a", "2b" y "2c" en las FIGS. 21A y 21B y tiene la secuencia de aminoácidos LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (SEQ ID NO: 154). Ciertos inhibidores de activación de TGFβ1 de alta afinidad se unen al menos en parte al Lazo de Latencia o una parte del mismo para conferir la potencia inhibidora (p. ej., la capacidad de bloquear la activación), donde opcionalmente la parte del lazo de latencia es ASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 266) en algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente divulgación se unen a un complejo de proTGFβ1 en ASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 266) o una parte del mismo. Ciertos inhibidores de la activación de TGFβ1 de alta afinidad se unen en parte al Lazo de Latencia extendido o una parte del mismo para conferir la potencia inhibitoria (p. ej., la capacidad de bloquear la activación), donde opcionalmente la porción del Lazo de latencia extendido es KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 169).

[0082] Localizado: En el contexto de la presente descripción, el término "localizado" (como en "tumor localizado", "de enfermedad localizada", etc.) se refiere a aislado anatómicamente o anomalías aislables, tales como tumores malignos

sólidos, en contraposición a enfermedad sistémica. Cierta leucemia, por ejemplo, puede tener un componente localizado (p. ej., la médula ósea) y un componente sistémico (p. ej., células sanguíneas circulantes) de la enfermedad.

[0083] Complejo de LRRC33-proTGFβ1: Como se usa aquí, el término "LRRC33-TGFβ1 complejo" se refiere a un complejo entre una forma pro-proteína o forma latente de proteína de factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1) y una proteína 33 que contiene repetición rica en leucina (LRRC33; también conocida como regulador negativo de especies reactivas de oxígeno o NRROS) o un fragmento o variante del mismo. En algunas formas de realización, un complejo de LRRC33-TGFβ1 comprende LRRC33 unido covalentemente con TGFβ1 pro/latente mediante uno o más enlaces disulfuro. En la naturaleza, tales enlaces covalentes se forman con residuos de cisteína presentes cerca del N-terminal (p. ej., posición de aminoácido 4) de un complejo dímero de proTGFβ1. En otras formas de realización, un complejo de LRRC33-TGFβ1 comprende LRRC33 enlazado no covalentemente con TGFβ1 pro/latente. En algunas formas de realización, un complejo de LRRC33-TGFβ1 es un complejo de origen natural, por ejemplo un complejo de LRRC33-TGFβ1 en una célula. El término "hLRRC33" denota LRRC33 humano. In vivo, los complejos que contienen LRRC33 y LRRC33 en la superficie celular pueden internalizarse. LRRC33 se expresa en un subconjunto de células mieloides, incluidos macrófagos polarizados M2 (como TAM) y MDSC.

[0084] Complejo de LTBP1-proTGFβ1: como se usa en el presente documento, el término "complejo de LTBP1-TGFβ1" se refiere a un complejo proteico que comprende una forma pro-proteína o una forma latente de proteína de factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1) y una proteína de unión a TGF-beta latente 1 (LTBP1) o fragmento o variante de la misma. En algunas formas de realización, un complejo de LTBP1-TGFβ1 comprende LTBP1 unido covalentemente con TGFβ1 pro/latente mediante uno o más enlaces disulfuro. En la naturaleza, tales enlaces covalentes se forman con residuos de cisteína presentes cerca del extremo N-terminal (p. ej., aminoácido en la posición 4) de un complejo dímero de proTGFβ1. En otras formas de realización, un complejo de LTBP1-TGFβ1 comprende LTBP1 enlazado no covalentemente con TGFβ1 pro/latente. En algunas formas de realización, un complejo de LTBP1-TGFβ1 es un complejo de origen natural, por ejemplo un complejo de LTBP1-TGFβ1 en una célula. El término "hLTBP1" denota LTBP1 humana.

[0085] Complejo de LTBP3-proTGFβ1: Como se usa aquí, el término "complejo de LTBP3-TGFβ1" se refiere a una proteína compleja que comprende una forma pro-proteína o forma latente de factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1) proteína y una proteína de unión a TGF-beta latente 3 (LTBP3) o fragmento o variante de la misma. En algunas formas de realización, un complejo de LTBP3-TGFβ1 comprende LTBP3 unido covalentemente con TGFβ1 pro/latente mediante uno o más enlaces disulfuro. En la naturaleza, tales enlaces covalentes se forman con residuos de cisteína presentes cerca del extremo N-terminal (p. ej., aminoácido en la posición 4) de un complejo dímero de proTGFβ1. En otras formas de realización, un complejo de LTBP3-TGFβ1 comprende LTBP1 enlazado no covalentemente con TGFβ1 pro/latente. En algunas formas de realización, un complejo de LTBP3-TGFβ1 es un complejo de origen natural, por ejemplo, un complejo de LTBP3-TGFβ1 en una célula. El término "hLTBP3" denota LTBP3 humana.

[0086] Macrófagos M2 o similares a M2: Los macrófagos M2 representan un subconjunto de macrófagos activados o polarizados e incluyen macrófagos asociados a enfermedades en microambientes tanto fibróticos como tumorales. Los marcadores de superficie celular para macrófagos polarizados M2 incluyen típicamente CD206 y CD163 (es decir, CD206+/CD163+). Los macrófagos polarizados M2 también pueden expresar LRRC33 de la superficie celular. La activación de los macrófagos M2 es promovida principalmente por IL-4, IL-13, IL-10 y TGFβ; secretan las mismas citoquinas que las activan (IL-4, IL-13, IL-10 y TGFβ). Estas células tienen una alta capacidad fagocítica y producen componentes de ECM, factores angiogénicos y quimiotácticos. La liberación de TGFβ por los macrófagos puede perpetuar la activación de miofibroblasto, la inducción de EMT y EndMT en los tejidos de la enfermedad, como el tejido fibrótico y el estroma tumoral. Por ejemplo, los macrófagos M2 son esenciales para la fibrosis pulmonar inducida por TGFβ y están enriquecidos en varios tumores.

[0087] proTGFβ1 asociado a matriz: LTBP1 y LTBP3 están presentando moléculas que son componentes de la matriz extracelular (ECM). LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1 pueden ser denominados colectivamente como complejos proTGFβ1 "asociados a ECM" (o "asociados a matriz"), que median activación/de señalización de TGFβ1 asociado a ECM. El término también incluye complejos de LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1 purificados y recombinantes en solución (p. ej., ensayos in vitro) que no están unidos físicamente a una matriz o sustrato.

[0088] Dosis máximamente tolerada (MTD): El término MTD generalmente se refiere, en el contexto de las consideraciones de seguridad/toxicología, a la cantidad más alta de un artículo de prueba (tal como un inhibidor de TGFβ1) evaluado sin un nivel de efecto adverso observado (NOAEL). Por ejemplo, el NOAEL para Ab6 en ratas fue la dosis más alta evaluada (100 mg/kg), lo que sugiere que la MTD para Ab6 es >100 mg/kg, según un estudio de toxicología de cuatro semanas. El NOAEL para Ab6 en primates no humanos fue la dosis más alta evaluada (300 mg/kg), lo que sugiere que la MTD para Ab6 en primates no humanos es >300 mg/kg, según un estudio de toxicología de cuatro semanas.

[0089] Descubrimiento de Escala Meso: "Descubrimiento de Escala Meso" o "MSD" es un tipo de inmunoensayos que emplea electroquimioluminiscencia (ECL) como una técnica de detección. Normalmente, se utilizan electrodos de carbono de alta unión para capturar proteínas (p. ej., anticuerpos). Los anticuerpos se pueden incubar con antígenos particulares, cuya unión se puede detectar con anticuerpos secundarios que se conjugan con marcadores electroquimioluminiscentes. Tras una señal eléctrica, se puede medir la intensidad de la luz para cuantificar los analitos en la muestra.

- 5 **[0090] Mielofibrosis:** "Mielofibrosis," también conocida como osteomielofibrosis, es un trastorno proliferativo relativamente raro de médula ósea (p. ej., cáncer), que pertenece a un grupo de enfermedades denominadas trastornos mieloproliferativos. La mielofibrosis se clasifica en la rama de neoplasias mieloproliferativas con cromosoma Filadelfia negativo (-). La mielofibrosis se caracteriza por la proliferación de un clon anormal de células madre hematopoyéticas en la médula ósea y otros sitios dan como resultado fibrosis o el reemplazo de la médula con tejido cicatricial. El término mielofibrosis engloba la mielofibrosis primaria (PMF), también denominada mielofibrosis idiopática crónica (cIMF) (los términos idiopática y primaria significan que en estos casos la enfermedad es de origen desconocido o espontáneo), así como los tipos secundarios de mielofibrosis, como la mielofibrosis secundaria a policitemia vera (PV) o trombocitemia esencial (ET). La mielofibrosis es una forma de metaplasia mieloide, que se refiere a un cambio en el tipo de células en el tejido formador de sangre de la médula ósea y, a menudo, los dos términos se utilizan como sinónimos. Los términos metaplasia mieloide agnógena y mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) también se utilizan para referirse a la mielofibrosis primaria. La mielofibrosis se caracteriza por mutaciones que provocan una regulación positiva o una sobreactivación de la vía JAK corriente abajo.
- 10
- 15 **[0091] Células mieloides:** En la hematopoyesis, las células mieloides son células sanguíneas que surgen de una célula progenitora para granulocitos, monocitos, eritrocitos o plaquetas (el progenitor mieloide común, es decir, CMP o CFU-GEMM), o en un sentido más estrecho también utilizado con frecuencia, específicamente del linaje del mieloblasto (los mielocitos, monocitos y sus tipos secundarios), a diferencia de las células linfoides, es decir, los linfocitos, que provienen de las células progenitoras linfoides comunes que dan lugar a células B y células T. Ciertos tipos de células mieloides, su morfología general, marcadores de superficie celular típicos y su capacidad inmunosupresora tanto en ratones como en humanos, se resumen a continuación.
- 20

	Células mieloides	Morfología típica	Seleccionar fenotipo de superficie	Inmunosupresión
	<i>Ratón</i>			
5	Neutrófilos	Forma redonda con núcleo segmentado	CD11b + Ly6G ^{hi} Ly6C ^{lo}	-
	Monocitos	Forma redonda con un núcleo dentado	CD11b + Ly6G ⁻ Ly6C ^{hi}	-
10	Macrófagos	Forma redonda con pseudópodos	CD11b + F4/80 ^{hi} Ly6G ⁻ Ly6C ^{lo} CD80 + (M1)	-
			F4/80 + CD206 + CD163 + (M2)	-
15	Células dendríticas	Forma dendrítica con polipodios.	CD11b + CD11c + Ly6G ⁻ Ly6C ⁻ /lo (clásico)	-
			CD11b -CD11c + Ly6G ⁻ Ly6C ⁻ (clásico)	-
			CD11b -CD11c ^{lo} Ly6G ⁻ Ly6C ⁺ + PDCA-1 + (plasmacitoide)	-
20	Fibroцитos	Forma del husillo	CD11b + Coll + Ly6G ⁻ Ly6C ⁺	-
	G-MDSC (PMN-MDSC)	Forma redonda con núcleo de bandas	CD11b + Ly6G + Ly6C ^{lo}	+
	M-MDSC	Forma redonda con un núcleo dentado	CD11b + Ly6G ⁻ Ly6C ^{hi}	+
25	<i>Humano</i>			
	Neutrófilos	Forma redonda con núcleo segmentado	CD11b + CD14-CD15 + CD66b + LOX-1-	-
30	Monocitos	Forma redonda con un núcleo dentado	CD14 + CD15- CD16- HLA-DR + (clásico)	-
			CD14 + CD15- CD16 + HLA-DR + (intermedio)	-
			CD14-CD15- CD16 + HLA-DR + (no clásico)	-
35	Macrófagos	Forma redonda con pseudópodos	CD15- CD16 + CD80 + HLA-DR + CD33+ (M1)	-
			CD11b + CD15- CD206 + CD163 + HLA-DR + (M2)	+/-
40	Células dendríticas	Forma dendrítica con polipodios.	CD14-CD16- CD1c + CD83 + (clásica)	-
			CD14-CD16- CD141 + CD83 + (clásica)	-
			CD14-CD16- CD303 + CD83 + (plasmacitoide)	-
45	Células mieloides	Morfología típica	Seleccionar fenotipo de superficie	Inmunosupresión
	<i>Humano</i>			
50	Fibroцитos	Forma del husillo	CD11b + Coll + CD13 + CD34+ CD45RO + HLA DR +	-
	G-MDSC (PMN-MDSC)	Forma redonda con núcleo anular	CD11b + CD33+ CD14-CD15 + CD66b + LOX- 1+	+
55	M-MDSC	Forma redonda con un núcleo dentado	CD11b + CD33+ CD14 + CD15- HLA-DR -/lo	+

[0092] Célula supresora derivada de mieloide: Células supresoras derivadas de mieloide (MDSCs) son una población heterogénea de células generadas durante las diversas condiciones patológicas y que se cree que representan un estado patológico de la activación de monocitos y neutrófilos relativamente inmaduros. Las MDSC incluyen al menos dos categorías de células denominadas i) "granulocíticas" (G-MDSC) o polimorfonucleares (PMN-MDSC), que son fenotípica y morfológicamente similares a los neutrófilos; y ii) monocíticas (M-MDSC) que son fenotípica y morfológicamente similares a los monocitos. Las MDSC se caracterizan por un conjunto distinto de características genómicas y bioquímicas, y pueden distinguirse por moléculas de superficie específicas. Por ejemplo, las G-MDSC/PMN-MDSC humanas expresan típicamente los marcadores de superficie celular CD11b, CD33, CD15 y CD66. Además, las G-MDSC/PMN-MDSC humanas también pueden expresar HLA-DR y/o arginasa. En comparación, las MMDSC humanas expresan típicamente los marcadores de superficie celular CD11b, CD33 y CD14. Además, las M-MDSC humanas también pueden expresar

HLA-DR. Además de dichos marcadores de superficie celular, las MDSC se caracterizan por la capacidad de suprimir las células inmunitarias, como las células T, las células NK y las células B. Las funciones inmunosupresoras de las MDSC pueden incluir la inhibición de la función no específica del antígeno y la inhibición de la función específica del antígeno. MDSCs pueden expresar la superficie LRR33 de la célula y/o LRR33-proTGFβ1.

[0093] Miofibroblastos: Los miofibroblastos son células con ciertos fenotipos de fibroblastos y células del músculo liso y generalmente expresan vimentina, músculo liso alfa-actina (α-SMA; ACTA2 gen humano) y paladín. En muchas enfermedades que implican desregulaciones de la matriz extracelular (como mayor rigidez de la matriz), las células de fibroblastos normales se desdiferencian en miofibroblastos de una manera dependiente de TGFβ. La sobreexpresión aberrante de TGFβ es común entre las patologías impulsadas por miofibroblastos. Se sabe que el TGFβ promueve la diferenciación de miofibroblastos, la proliferación celular y la producción de matriz. Los miofibroblastos o células similares a los miofibroblastos dentro del microambiente fibrótico pueden denominarse fibroblastos asociados a la fibrosis (o "FAF"), y los miofibroblastos o células similares a los miofibroblastos dentro del microambiente tumoral pueden denominarse fibroblastos asociados al cáncer (o "CAF").

[0094] Inhibidor pan-TGFβ/inhibición pan de TGFβ: El término "inhibidor pan-TGFβ" se refiere a cualquier agente que es capaz de inhibir o antagonizar las tres isoformas de TGFβ. Dicho inhibidor puede ser un inhibidor de molécula pequeña de las isoformas β del TGF, como las conocidas en la técnica. El término incluye anticuerpo pan-TGFβ que se refiere a cualquier anticuerpo capaz de unirse a cada una de las isoformas de TGFβ, es decir, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3. En algunas formas de realización, un anticuerpo pan-TGFβ se une y neutraliza las actividades de las tres isoformas, es decir, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3. El anticuerpo 1D11 (o el análogo humano Fresolimumab (GC1008)) es un ejemplo bien conocido de un anticuerpo pan-TGFβ que neutraliza las tres isoformas de TGFβ. Ejemplos de inhibidores de pan-TGFβ de molécula pequeña incluyen galunisertib (LY2157299 monohidrato), que es un antagonista del receptor quinasa I del TGFβ/ALK5 que media la señalización de las tres isoformas del TGFβ.

[0095] (Infiltración) perivascular: El prefijo "*peri*" significa "alrededor de", "que rodea" o "cerca", por lo tanto "perivascular" traduce literalmente en alrededor de los vasos sanguíneos. Como se usa en el presente documento en el contexto de infiltrados de células tumorales, el término "infiltración perivascular" se refiere a un modo de entrada para las células inmunitarias que se infiltran en el tumor (p. ej., linfocitos) a través de la vasculatura de un tumor sólido.

[0096] Potencia: El término "*potencia*" tal como se utiliza aquí, se refiere a la actividad de un fármaco, tal como un anticuerpo (o fragmento) inhibidor que tiene actividad inhibidora, con respecto a la concentración o cantidad del fármaco para producir un efecto definido. Por ejemplo, un anticuerpo capaz de producir ciertos efectos a una dosis dada es más *potente* que otro anticuerpo que requiere el doble de cantidad (dosis) para producir efectos equivalentes. La potencia puede ser medida en ensayos basados en células, tales como ensayos de activación/inhibición de TGFβ, con lo que el grado de activación de TGFβ, tal como la activación desencadenada por la integrina de unión, se puede medir en presencia o ausencia de artículo de prueba (p. ej., anticuerpos inhibidores) en un sistema basado en células. Normalmente, entre aquellos capaces de unirse a las mismas regiones de unión de un antígeno o superpuestas (p. ej., anticuerpos de bloqueo cruzado), los anticuerpos con afinidades más altas (valores de K_D más bajos) tienden a mostrar mayor potencia que los anticuerpos con afinidades más bajas (valores K_D mayores).

[0097] Molécula presentadora: Moléculas presentadoras en el contexto de la presente descripción se refieren a proteínas que forman enlaces covalentes con pro-proteínas latentes (p. ej., proTGFβ1) y sujetan ("presentan") el complejo inactivo a un nicho extracelular (tales como ECM o superficie de la célula inmunitaria) manteniendo así su latencia hasta que ocurre un evento de activación. Las moléculas presentadoras conocidas para proTGFβ1 incluyen: LTBP1, LTBP3, GARP y LRR33, cada una de las cuales puede formar un complejo de molécula presentadora-proTGFβ1 (es decir, LLC), a saber, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRR33-proTGFβ1, respectivamente. En la naturaleza, LTBP1 y LTBP3 son componentes de la matriz extracelular (ECM); por lo tanto, LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1 puede ser denominado colectivamente como complejos proTGFβ1 "asociados a ECM" (o "asociados a matriz"), que median señalización/actividades de TGFβ1 asociadas a ECM. GARP y LRR33, por otro lado, son proteínas transmembrana expresadas en la superficie celular de ciertas células; por lo tanto, GARP-proTGFβ1 y LRR33-proTGFβ1 puede ser denominado colectivamente como complejos proTGFβ1 "asociados a células" (o "superficie celular"), que median señalización/actividades de TGFβ1 asociadas a células (p. ej., asociadas a células inmunitarias).

[0098] Protección (de exposición al disolvente): En el contexto de la evaluación basada en HDX-MS de las interacciones proteína-proteína, tales como unión de anticuerpo-antígeno, el grado por el cual una proteína (p. ej., una región de una proteína que contiene un epítipo) se expone a un disolvente, lo que permite que se produzca el intercambio de protones, se correlaciona inversamente con el grado de unión/interacción. Por tanto, cuando un anticuerpo descrito en el presente documento se une a una región de un antígeno, la región de unión está "protegida" de la exposición al disolvente porque la interacción proteína-proteína impide que la región de unión sea accesible por el disolvente circundante. Por tanto, la región protegida es indicativa de un sitio de interacción. Normalmente, los disolventes adecuados son tampones fisiológicos.

[0099] ProTGFβ1: El término "proTGFβ1", como se usa en el presente documento está destinado para abarcar formas precursoras del complejo inactivo TGFβ1 que comprende una secuencia de prodominio de TGFβ1 dentro del complejo. Por tanto, el término puede incluir las formas pro, así como las formas latentes de TGFβ1. La expresión

"TGFβ1 pro/latente " puede usarse indistintamente. La forma "pro" de TGFβ1 existe antes de la escisión proteolítica en el sitio de la furina. Una vez escindida, se dice que la forma resultante es la forma "latente" de TGFβ1. El complejo "latente" permanece asociado no covalentemente hasta que se desencadena una activación adicional, tal como un evento de activación impulsado por la integrina. El complejo proTGFβ1 está compuesto por polipéptidos proproteicos de TGFβ1 diméricos, unidos con enlaces disulfuro. El complejo de dímero latente se une covalentemente a una única molécula presentadora mediante el residuo de cisteína en la posición 4 (Cys4) de cada uno de los polipéptidos de proTGFβ1. El adjetivo "latente" se puede utilizar de forma general/amplia para describir el estado "inactivo" del TGFβ1, antes de los eventos de activación mediados por integrinas u otros. El polipéptido proTGFβ1 contiene un prodominio (LAP) y un dominio de factor de crecimiento (SEQ ID NO: 146).

[0100] Regresión (regresión del tumor): La regresión de tumor o el crecimiento del tumor se puede usar como una medida de la eficacia in vivo. Por ejemplo, en entornos preclínicos, la mediana del volumen tumoral (MTV) y los criterios para la eficacia del tratamiento de respuestas de regresión pueden determinarse a partir de los volúmenes tumorales de los animales que permanecieron en el estudio el último día. La eficacia del tratamiento también se puede determinar a partir de la incidencia y la magnitud de las respuestas de regresión observadas durante el estudio. El tratamiento puede causar regresión parcial (PR) o regresión completa (CR) del tumor en un animal. La regresión completa lograda en respuesta a la terapia (p. ej., la administración de un fármaco) puede denominarse "*respuesta completa*" y el sujeto que logra la respuesta completa puede denominarse "*respondedor completo*". Por tanto, la respuesta completa excluye la regresión completa espontánea. En algunas formas de realización de modelos tumorales preclínicos, una respuesta PR se define como el volumen tumoral que es 50% o menos de su volumen del Día 1 para tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio, e igual o mayor que 13,5 mm³ para una o más de estas tres medidas. En algunas formas de realización, una respuesta CR se define como el volumen del tumor que es menor de 13,5 mm³ para tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio. En el modelo preclínico, un animal con una respuesta de CR al final de un estudio puede clasificarse adicionalmente como un superviviente libre de tumor (TFS). El término "control tumoral eficaz" puede usarse para referirse a un grado de regresión tumoral logrado en respuesta al tratamiento, donde, por ejemplo, el volumen tumoral se reduce a <25% del volumen tumoral de punto final en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, en un modelo particular, si el volumen del tumor de punto final es 2.000 mm³, se logra un control tumoral eficaz si el tumor se reduce a menos de 500 mm³. Por lo tanto, el control tumoral eficaz comprende la regresión completa, así como la regresión parcial que alcanza el umbral de reducción.

[0101] Células T reguladoras: Las "células T reguladoras", o Tregs, son un tipo de células inmunitarias caracterizadas por la expresión de los biomarcadores CD4, FOXP3 y CD25. Las Treg a veces se denominan células T supresoras y representan una subpoblación de células T que modulan el sistema inmunológico, mantienen la tolerancia a los autoantígenos y previenen las enfermedades autoinmunitarias. Las Treg son inmunosupresoras y generalmente suprimen o regulan negativamente la inducción y proliferación de las células efectoras T (Teff). Las Treg pueden desarrollarse en el timo (las denominadas Treg CD4+ Foxp3 + "naturales") o diferenciarse de las células T CD4+ naive en la periferia, por ejemplo, tras la exposición a TGFβ o ácido retinoico. Tregs pueden expresar superficie celular GARP-proTGFβ1.

[0102] Resistencia (a la terapia): La resistencia a una terapia particular (p. ej., CBT) puede ser debido a las características innatas de la enfermedad como el cáncer ("resistencia primaria"), o debido a fenotipos adquiridos que se desarrollan con el tiempo después del tratamiento ("resistencia adquirida"). Se dice que los pacientes que no muestran una respuesta terapéutica a una terapia (p. ej., los que no responden o responden mal a la terapia) tienen una resistencia primaria a la terapia. Se dice que los pacientes que inicialmente muestran una respuesta terapéutica a una terapia pero luego pierden efectos (p. ej., progresión o recurrencia a pesar de la terapia continua) han adquirido resistencia a la terapia.

[0103] Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) e iRECIST: RECIST es un conjunto de reglas publicadas que definen cuando mejoran los tumores en pacientes con cáncer ("responden"), se mantienen iguales ("estabilizan"), o empeoran ("progresan") durante el tratamiento. Los criterios fueron publicados en febrero de 2000 por una colaboración internacional que incluye la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC), el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos y el Grupo de Ensayos Clínicos del Instituto Nacional del Cáncer de Canadá. Posteriormente, se ha adaptado ampliamente una versión revisada de la guía RECIST (RECIST v 1.1) (ver: Eisenhauer et al. (2009), "New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)" Eur J Cancer 45: 228-247).

[0104] Los criterios de respuesta son los siguientes: Respuesta completa (CR): Desaparición de todas las lesiones diana; Respuesta parcial (RP): Al menos un 30% de disminución en la suma de la LD de las lesiones diana, tomando como referencia la LD suma de la línea de base; Enfermedad estable (DS): Ni suficiente contracción para calificar para PR ni aumento suficiente para calificar para PD, tomando como referencia la menor suma LD desde que comenzó el tratamiento; Enfermedad progresiva (EP): Incremento de al menos un 20% en la suma de la LD de las lesiones diana, tomando como referencia la menor suma LD registrada desde el inicio del tratamiento o la aparición de una o más lesiones nuevas.

[0105] Por otro lado, iRECIST proporciona un conjunto modificado de criterios que tiene en cuenta la respuesta inmunitaria (ver: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5648544/). Los criterios RECIST e iRECIST están estandarizados, pueden ser revisados de vez en cuando a medida que se disponga de más datos y se entienden bien en la técnica.

[0106] Tumor sólido: el término "tumor sólido" se refiere a trastornos proliferativos que dan como resultado un crecimiento

anormal o una masa de tejido que normalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los tumores sólidos incluyen tumores de neoplasias malignas avanzadas, como tumores sólidos localmente avanzados y cáncer metastásico. Los tumores sólidos se componen típicamente de múltiples tipos de células, que incluyen, sin limitación, células cancerosas (malignas), células estromales como las CAF y leucocitos infiltrantes, como macrófagos, MDSC y linfocitos. Los tumores sólidos que se van a tratar con un inhibidor selectivo de isoformas de TGFβ1, como los descritos en este documento, son típicamente tumores TGFβ1 positivos (TGFβ1+), que pueden incluir múltiples tipos de células que producen TGFβ1. En ciertas formas de realización, el tumor TGFβ1+ también puede coexpresar TGFβ3 (es decir, TGFβ3 positivo). Por ejemplo, ciertos tumores son codominantes de TGFβ1/3. En algunas formas de realización, tales tumores son causados por cáncer de células epiteliales, por ejemplo, carcinoma.

[0107] Valoración de equilibrio en solución (SET): El SET es un ensayo mediante el cual la unión entre dos moléculas (como un antígeno y un anticuerpo que se une al antígeno) se puede medir en equilibrio en una solución. Por ejemplo, SET basado en *Descubrimiento de Escala Meso* ("MSD"), o MSD-SET, es un modo útil de determinar constantes de disociación para interacciones proteína-proteína de alta afinidad en equilibrio, como anticuerpos de afinidad picomolar que se unen a sus antígenos (ver, por ejemplo: Ducata et al. (2015) J Biomolecular Screening 20 (10): 1256-1267). Los ensayos basados en SET son particularmente útiles para determinar los valores K_D de anticuerpos con afinidades subnanomolares (p. ej., picomolares).

[0108] Unión específica: como se usa en el presente documento, el término "unión específica" o "se une específicamente" significa que la interacción del anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, con un antígeno depende de la presencia de una estructura particular (p. ej., un determinante o epítipo antigénico). Por ejemplo, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, se une a una proteína específica en lugar de a proteínas en general. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o su porción de unión a antígeno, se une específicamente a una diana, por ejemplo, TGFβ1, si el anticuerpo tiene una K_D para la diana de al menos aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o menos. En algunas formas de realización, el término "unión específica a un epítipo de proTGFβ1", "se une específicamente a un epítipo de proTGFβ1", "unión específica a proTGFβ1" o "se une específicamente a proTGFβ1" como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a proTGFβ1 y tiene una constante de disociación (K_D) de $1,0 \times 10^{-8}$ M o menos, según lo determinado por ensayos de unión in vitro adecuados, tales como resonancia de plasmón superficial e interferometría de biocapa (BLI). En una forma de realización, un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, puede unirse específicamente a ortólogos de proTGFβ1 tanto humanos como no humanos (p. ej., de ratón).

[0109] Asunto: El término "sujeto" en el contexto de aplicaciones terapéuticas se refiere a un individuo que recibe atención o intervención clínica, como tratamiento, diagnóstico, etc. Los sujetos adecuados incluyen vertebrados, incluidos, entre otros, mamíferos (p. ej., mamíferos humanos y no humanos). Cuando el sujeto es un sujeto humano, el término "paciente" puede usarse indistintamente. En un contexto clínico, el término "una población de pacientes" o "subpoblación de pacientes" se utiliza para referirse a un grupo de individuos que se encuentra dentro de un conjunto de criterios, como los criterios clínicos (p. ej., presentaciones de la enfermedad, estadios de la enfermedad, susceptibilidad a ciertas condiciones, capacidad de respuesta a la terapia, etc.), historial médico, estado de salud, sexo, grupo de edad, criterios genéticos (p. ej., portador de cierta mutación, polimorfismo, duplicaciones de genes, repeticiones de secuencias de ADN, etc.) y factores de estilo de vida (p. ej., fumar, consumo de alcohol, ejercicio, etc.).

[0110] Resonancia de plasmón superficial (SPR): Resonancia de plasmón superficial es un fenómeno óptico que permite la detección de interactuantes no etiquetados en tiempo real. Los biosensores basados en SPR, como los disponibles comercialmente de Biacore, se pueden emplear para medir interacciones biomoleculares, incluidas interacciones proteína-proteína, como la unión de antígenos-anticuerpos. La tecnología es ampliamente conocida en la técnica y es útil para la determinación de parámetros tales como afinidades de unión, constantes de velocidad cinética y termodinámica.

[0111] Indicación relacionada con TGFβ1: Una "indicación relacionada a TGFβ1" es un trastorno asociado a TGFβ1 y medios de cualquier enfermedad o trastorno, y/o condición, en donde al menos parte de la patogénesis y/o la progresión es atribuible a la señalización de TGFβ1 o su desregulación. Ciertos trastornos asociados a TGFβ1 son impulsados predominantemente por la isoforma TGFβ1. Los sujetos que tienen una indicación relacionada con TGFβ1 pueden beneficiarse de la inhibición de la actividad y/o los niveles de TGFβ1. Ciertas indicaciones relacionadas con TGFβ1 son impulsadas predominantemente por la isoforma TGFβ1. Las indicaciones relacionadas con TGFβ1 incluyen, pero no se limitan a: afecciones fibróticas (como fibrosis de órganos y fibrosis de tejidos que implican inflamación crónica), trastornos proliferativos (como cáncer, por ejemplo, tumores sólidos y mielofibrosis), enfermedad asociada con desregulación de ECM (tales como afecciones que implican endurecimiento y remodelación de la matriz), enfermedad que implica la transición mesenquimatosa (p. ej., EndMT y/o EMT), enfermedad que implica proteasas, enfermedad con expresión génica aberrante de ciertos marcadores descritos en el presente documento. Estas categorías de enfermedades no pretenden excluirse mutuamente.

[0112] Inhibidor de TGFβ: El término "inhibidor de TGFβ" se refiere a cualquier agente capaz de antagonizar las actividades biológicas, de señalización o la función de factor de crecimiento de TGFβ (p. ej., TGFβ1, TGFβ2 y/o TGFβ3). El término no pretende limitar su mecanismo de acción e incluye, por ejemplo, inhibidores neutralizantes, antagonistas de receptores, trampas de ligandos solubles e inhibidores de activación de TGFβ. Los inhibidores de TGFβ también incluyen

anticuerpos que son capaces de reducir la disponibilidad de proTGFβ latente que puede activarse en el nicho, por ejemplo, induciendo citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADPC), así como anticuerpos que dan como resultado la internalización del complejo de la superficie celular que comprende proTGFβ latente, eliminando así el precursor de la membrana plasmática sin agotar las propias células. La internalización puede ser un mecanismo de acción adecuado para complejos de proteínas que contienen LRRC33 (tales como LRRC33-proTGFβ1 humano) que da como resultado niveles reducidos de células que expresan complejos de proteínas que contienen LRRC33 en la superficie celular.

[0113] La "*familia TGFβ*" es una clase dentro de la superfamilia TGFβ y en humanos contiene tres miembros: TGFβ1, TGF beta 2 y TGFβ3, que son estructuralmente similares. Se sabe que los tres factores de crecimiento emiten señales a través de los mismos receptores.

[0114] *Cáncer/tumor TGFβ1 positivo*: El término, como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer/tumor con expresión TGFβ1 aberrante (sobreexpresión). Muchos tipos de cáncer/tumores humanos muestran una expresión predominante de la isoforma TGFβ1 (obsérvese que "TGFB" se usa a veces para referirse al gen en oposición a la proteína). En algunos casos, como el cáncer/tumor puede mostrar expresión co-dominante de otra isoforma, tal como TGFβ3. Un número de cánceres epiteliales (p. ej., carcinoma) pueden coexpresar TGFβ1 y TGFβ3. Dentro del ambiente del tumor de tumores TGFβ1 positivos, TGFβ1 puede surgir a partir de múltiples fuentes, incluyendo, por ejemplo, células de cáncer, los macrófagos asociados al tumor (TAM), los fibroblastos asociados con el cáncer (CAF), células T reguladoras (Treg), células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y la matriz extracelular circundante (ECM). En el contexto de la presente divulgación, los modelos preclínicos de cáncer/tumor que recapitulan las condiciones humanas son cáncer/tumor TGFβ1 positivo.

[0115] *Ventana terapéutica*: El término "ventana terapéutica" se refiere a un intervalo de dosificación que produce la respuesta terapéutica sin causar efecto adverso observable/significativo/inaceptable (p. ej., dentro de los efectos adversos que son aceptables o tolerables) en sujetos. La ventana terapéutica se puede calcular como una relación entre las concentraciones mínimas efectivas (MEC) y las concentraciones mínimas tóxicas (MTC). Para ilustrar, un inhibidor de TGFβ1 que logra eficacia in vivo a una dosis de 10 mg/kg y muestra tolerabilidad o toxicidades aceptables a 100 mg/kg proporciona al menos una ventana terapéutica de 10 veces (p. ej., 10x). Por el contrario, un inhibidor pan de TGFβ que es eficaz a 10 mg/kg pero causa efectos adversos a una dosis menor que la efectiva y se dice que tiene "*toxicidades limitantes de la dosis*". Generalmente, la dosis máxima tolerada (MTD) puede establecerse el límite superior de la ventana terapéutica.

[0116] Por ejemplo, se demostró que el Ab6 es eficaz a dosis que oscilan entre aproximadamente 3-30 mg/kg/sem y también se demostró que está libre de toxicidades observables asociadas con la inhibición de TGFβ en dosis de al menos 100 o 300 mg/kg/sem durante 4 semanas en ratas o primates no humanos. En base a esto, Ab6 muestra como mínimo una ventana terapéutica de 3,3 veces y hasta 100 veces.

[0117] *Toxicidad*: Como se usa aquí, el término "toxicidad" o "toxicidades" se refiere a efectos no deseados in vivo en sujetos (p. ej., pacientes) asociados con una terapia administrada a los sujetos (p. ej., pacientes), tales como efectos secundarios indeseables y eventos adversos. "Tolerabilidad" se refiere a un nivel de toxicidades asociado con una terapia o régimen terapéutico, que los pacientes pueden tolerar razonablemente, sin interrumpir la terapia debido a las toxicidades. Normalmente, los estudios de toxicidad/toxicología se llevan a cabo en uno o más modelos preclínicos antes del desarrollo clínico para evaluar los perfiles de seguridad de un fármaco candidato (p. ej., terapia con anticuerpos monoclonales). Los estudios de toxicidad/toxicología pueden ayudar a determinar el "*nivel sin efectos adversos observados (NOAEL)*" y la "*dosis máxima tolerada (MTD)*" de un artículo de prueba, a partir de la cual se puede deducir una ventana terapéutica. Preferiblemente, se debe elegir una especie que se muestre sensible a la intervención particular como modelo animal preclínico en donde se llevará a cabo un estudio de seguridad/toxicidad. En caso de inhibición de TGFβ, las especies adecuadas incluyen ratas, perros y cynos. Se informa que los ratones son menos sensibles a la inhibición farmacológica de TGFβ y es posible que no revelen toxicidades que sean potencialmente peligrosas en otras especies, incluida la humana, aunque ciertos estudios informan toxicidades observadas con la inhibición pan de TGFβ en ratones. Para ilustrar en el contexto de la presente divulgación, el NOAEL para Ab6 en ratas fue la dosis más alta evaluada (100 mg/kg), lo que sugiere que la MTD es >100 mg/kg, según un estudio de toxicología de cuatro semanas. La MTD de Ab6 en primates no humanos es >300 mg/kg según un estudio de toxicología de cuatro semanas.

[0118] Para la determinación de NOAEL y MTD, preferiblemente, una especie que se demuestra que es sensible a la intervención en particular debe ser elegida como un modelo animal preclínico en el que se realiza el estudio de seguridad/toxicología. En el caso de inhibición de TGFβ, las especies adecuadas incluyen, pero no se limitan a ratas, perros y cynos. Se informa que los ratones son menos sensibles a la inhibición farmacológica del TGFβ y es posible que no revelen toxicidades que sean potencialmente graves o peligrosas en otras especies, incluido el ser humano.

[0119] *Traducibilidad*: En el contexto del descubrimiento y desarrollo de fármacos, el término "traducibilidad" o "traducible" se refiere a cierta calidad o característica de los modelos preclínicos que recapitulan las condiciones humanas. Como se usa en el presente documento, un modelo preclínico que recapitula una indicación de TGFβ1 muestra típicamente la expresión predominante de TGFB1, en relación con TGFB2 y TGFB3. En los paradigmas de terapia de combinación, por ejemplo, la traducibilidad puede requerir los mismos mecanismos de acción de subrayado que la combinación de principios

activos pretende efectuar en el modelo. Como ejemplo, muchos tumores humanos están inmunoexcluidos, tumores TGFβ1 positivos que muestran resistencia primaria a una terapia de bloqueo de puntos de control (TCC). Se puede usar una segunda terapia (como los inhibidores de TGFβ1) en combinación para superar la resistencia a la TCC. En este escenario, los modelos preclínicos traducibles adecuados incluyen tumores TGFβ1 positivos que muestran resistencia primaria a una terapia de bloqueo de puntos de control (TCC).

[0120] *Tratar/tratamiento:* El término "tratar" o "tratamiento" incluye tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. Por tanto, el término pretende significar ampliamente: producir beneficios terapéuticos en un paciente, por ejemplo, mejorando o reforzando la inmunidad del cuerpo; reducir o revertir la inmunosupresión; reducir, eliminar o erradicar células o sustancias nocivas del cuerpo; reducir la carga de enfermedad (p. ej., carga tumoral); prevenir la recurrencia o recaída; prolongar un período refractario y/o mejorar de otro modo la supervivencia. El término incluye tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. El tratamiento no requiere la curación completa de un trastorno y abarca formas de realización en las que se reducen los síntomas o los factores de riesgo subyacentes. En el contexto de la terapia de combinación, el término también puede referirse a: i) la capacidad de un segundo terapéutico para reducir la dosificación eficaz de un primer terapéutico para reducir los efectos secundarios y aumentar la tolerabilidad; ii) la capacidad de una segunda terapia para hacer que el paciente responda mejor a una primera terapia; y/o iii) la capacidad de producir beneficios clínicos aditivos o sinérgicos.

[0121] *Macrófagos asociados al tumor (TAM):* Macrófagos polarizados/activados por TAM están con fenotipos pro-tumorales (Macrófagos tipo M2). Los TAM pueden ser monocitos/macrófagos originados en la médula ósea reclutados en el sitio del tumor o macrófagos residentes en tejidos que se derivan de progenitores eritromieloides. La diferenciación de monocitos/macrófagos en TAM está influenciada por una serie de factores, incluidas señales químicas locales como citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y otras moléculas que actúan como ligandos, así como interacciones célula-célula entre los monocitos/macrófagos presentes en el nicho (microambiente tumoral). Generalmente, los monocitos/macrófagos se pueden polarizar en los denominados subtipos "M1" o "M2", este último asociado con un fenotipo más pro-tumoral. En un tumor sólido, hasta el 50% de la masa tumoral puede corresponder a macrófagos, que preferentemente están polarizados en M2. Entre los monocitos asociados a tumores y las poblaciones de células mieloides, los macrófagos M1 expresan típicamente HLA-DR, CD68 y CD86 de la superficie celular, mientras que los macrófagos M2 expresan típicamente HLA-DR, CD68, CD163 y CD206 de la superficie celular. Macrófagos de tipo M2 asociados al tumor (tales como subtipos M2C y M2D) pueden expresar la superficie celular LRRC33 y/o LRRC33-proTGFβ1.

[0122] *Microambiente tumoral:* El término "microambiente tumoral (TME)" se refiere a una enfermedad local nicho, en donde un tumor (p. ej., un tumor sólido) reside in vivo. La TME puede comprender una firma molecular asociada a la enfermedad (un conjunto de quimiocinas, citoquinas, etc.), poblaciones de células asociadas a la enfermedad (tales como TAM, CAF, MDSC, etc.) así como entornos ECM asociados a la enfermedad (alteraciones en los componentes de la ECM y/o estructura).

[0123] *Región variable:* El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo, que típicamente incluyen aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos amino-terminales de la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos amino terminales en la cadena ligera. En determinadas formas de realización, las regiones variables de diferentes anticuerpos difieren ampliamente en la secuencia de aminoácidos incluso entre anticuerpos de la misma especie. La región variable de un anticuerpo típicamente determina la especificidad de un anticuerpo particular para su objetivo.

[0124] Aparte de en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con porcentajes puede significar 61%.

[0125] Los artículos indefinidos "un" y "una" como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse en el sentido de "al menos uno".

[0126] La frase "y/o", como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse en el sentido de "uno o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están conjuntivamente presentes en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos distintos de los elementos identificados específicamente por la cláusula "y/o", ya sean relacionados o no con los elementos identificados específicamente, a menos que se indique claramente lo contrario. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con un lenguaje abierto como "que comprende", puede referirse, en una forma de realización, a A sin B (opcionalmente incluyendo elementos de otros que B); en otra forma de realización, a B sin A (opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra forma de realización más, tanto para A como para B (que incluyen opcionalmente otros elementos); etc.

[0127] Tal como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse que la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, significa al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera

o más de los elementos en la lista de elementos, pero sin incluir necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos enumerados específicamente dentro de la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos pueden estar presentes opcionalmente distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase "al menos uno", ya sean relacionados o no con los elementos identificados específicamente. Por tanto, como ejemplo no limitativo, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B", o, de manera equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una forma de realización, para al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra forma de realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra forma de realización más, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que opcionalmente incluye otros elementos); etc.

[0128] El uso de términos ordinales como "primero", "segundo", "tercero", etc, en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de reivindicación sobre otro o el orden temporal en donde se realizan los actos de un método, pero se utilizan simplemente como etiquetas para distinguir un elemento de reivindicación que tiene un nombre determinado de otro elemento que tiene el mismo nombre (pero para el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de la reivindicación.

[0129] Se entiende que los rangos proporcionados en este documento son taquigrafía para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subrango del grupo que consta de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50, por ejemplo, 10-20, 1-10, 30-40, etc.

Factor de crecimiento transformador-beta (TGFβ)

[0130] Las actividades del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y la posterior purificación parcial de los factores de crecimiento solubles se describieron por primera vez a finales de la década de 1970 y principios de la de 1980, con lo que el campo de TGFβ comenzó hace unos 40 años. Hasta la fecha, se han identificado 33 productos génicos que componen la gran superfamilia TGFβ. La superfamilia TGFβ se puede clasificar en al menos tres subclases de similitudes estructurales: TGFβ, factores de diferenciación de crecimiento (GDF) y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs). La subclase TGFβ está compuesta por tres isoformas altamente conservadas, a saber, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, que están codificadas por tres genes separados en humanos.

[0131] Se cree que el TGFβ juega papeles clave en diversos procesos, tales como la inhibición de la proliferación celular, la remodelación de la matriz extracelular (ECM), y la homeostasis inmunitaria. La importancia del TGFβ1 para la homeostasis de las células T se demuestra por la observación de que los ratones TGFβ1 -/- sobreviven solo 3-4 semanas, sucumbiendo a la falla multiorgánica debido a la activación inmunitaria masiva (Kulkarni, A.B., et al, Proc Natl Acad Sci EE. UU., 1993. 90 (2): p. 770-4; Shull, M.M., y col, Nature, 1992. 359 (6397): p. 693-9). Las funciones de TGFβ2 y TGFβ3 son menos claras. Si bien las tres isoformas de TGFβ tienen distintos patrones de expresión temporal y espacial, emiten señales a través de los mismos receptores, TGFβRI y TGFβRII, aunque en algunos casos, por ejemplo, para la señalización de TGFβ2, también se encuentran receptores de tipo III como el betaglicano requerido (Feng, X.H. y R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 659-93; Massague, J, Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 753-91). La oligomerización inducida por ligando de TGFβRI/II desencadena la fosforilación de factores de transcripción SMAD, lo que resulta en la transcripción de genes diana, como Col1a1, Col3a1, ACTA2 y SERPINE1 (Massague, J., J. Seoane y D. Wotton, Genes Dev, 2005, 19 (23): p. 2783 - 810). También se han descrito rutas de señalización de TGFβ independientes de SMAD, por ejemplo, en el cáncer o en las lesiones aórticas de ratones Marfan (Derynck, R. y Y.E. Zhang, Nature, 2003. 425 (6958): p. 577-84; Holm, TM, et al, Science, 2011. 332 (6027): p. 358-61).

[0132] La importancia biológica de la vía TGFβ en seres humanos ha sido validada por enfermedades genéticas. La enfermedad de Camurati-Engelman produce displasia ósea debido a una mutación autosómica dominante en el gen TGFβ1, que conduce a la activación constitutiva de la señalización del TGFβ1 (Janssens, K, et al, J Med Genet, 2006. 43 (1): p. 1-11). Los pacientes con síndrome de Loeys/Dietz portan mutaciones autosómicas dominantes en componentes de la vía de señalización del TGFβ, que causan aneurisma aórtico, hipertelorismo y úvula bífida (Van Laer, L, H. Dietz y B. Loeys, Adv Exp Med Biol, 2014. 802: p. 95-105). Dado que la desregulación de la vía del TGFβ se ha implicado en múltiples enfermedades, se han desarrollado y probado en pacientes varios fármacos que se dirigen a la vía del TGFβ, pero con un éxito limitado.

[0133] La desregulación de la señalización de TGFβ se ha asociado con una amplia gama de enfermedades humanas. De hecho, en varias enfermedades, tal desregulación puede involucrar múltiples facetas de la función del TGFβ. El tejido enfermo, como los tejidos y tumores fibróticos y/o inflamados, puede crear un entorno local en donde la activación del TGFβ puede provocar una exacerbación o progresión de la enfermedad, que puede estar mediada, al menos en parte, por interacciones entre múltiples células que responden al TGFβ, que se activan de forma autocrina y/o paracrina, junto con otras citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento que desempeñan un papel en el contexto de una enfermedad en particular.

[0134] Por ejemplo, un microambiente tumoral (TME) contiene múltiples tipos de células que expresan TGFβ1, tales como

fibroblastos activados similares a miofibroblastos, células estromales, macrófagos infiltrantes, MDSC y otras células inmunitarias, además de células cancerosas (es decir, malignas). Por tanto, la TME representa una población heterogénea de células que expresan y/o responden a TGFβ1 pero en asociación con más de un tipo de moléculas presentadoras, por ejemplo, LTBP1, LTBP3, LRRC33 y GARP, dentro del nicho.

[0135] Los avances en inmunoterapia han transformado el panorama de un tratamiento eficaz para un número cada vez mayor de pacientes con cáncer. Las más destacadas son las terapias de bloqueo de puntos de control (TCC), que ahora se han convertido en parte de los regímenes de atención estándar para un número creciente de cánceres. Si bien se han observado respuestas profundas y duraderas a la TCC en un número creciente de tipos de cáncer, ahora está claro que una fracción significativa de los tumores parecen ser refractarios a la TCC incluso al comienzo del tratamiento, por lo que apunta a la resistencia primaria como un desafío importante. Para permitir que el sistema inmunológico de muchos pacientes se dirija y elimine las células tumorales. Se han realizado esfuerzos para comprender y abordar los mecanismos subyacentes que confieren resistencia primaria a la TCC con el fin de ampliar la eficacia del tratamiento para un mayor número de pacientes. Sin embargo, este entusiasmo se ha visto frenado por los resultados mediocres de los ensayos clínicos y los fracasos al combinar las TCC con agentes que se sabe que afectan al mismo tipo de tumor o que modulan componentes aparentemente relevantes del sistema inmunológico. Una razón probable es que una clara justificación mecánica para la combinación dada a menudo no se basa en datos derivados de la clínica y, por lo tanto, ha dado lugar a resultados inciertos y confusos en los ensayos destinados a mejorar las terapias aprobadas con un solo agente. Ha quedado claro que el diseño de la inmunoterapia combinada debe basarse en pruebas científicas de relevancia para la biología del sistema inmunológico y del tumor subyacente.

[0136] Recientemente, un fenómeno conocido como "exclusión inmunitaria" fue acuñado para describir un ambiente del tumor a partir de la cual las células T efectoras antitumorales (p. ej., células T CD8+) se mantienen a una distancia (de ahí "excluidas") por señales locales inmunosupresoras. Más recientemente, varios análisis retrospectivos de tumores derivados clínicamente han implicado la activación de la vía del TGFβ en la mediación de la resistencia primaria a la TCC. Por ejemplo, el perfil transcripcional y el análisis de biopsias de melanoma antes del tratamiento revelaron un enriquecimiento de las vías asociadas al TGFβ y los procesos biológicos en tumores que no responden a la CBT anti-PD-1. En un tumor inmuno-excluido, se impide que las células efectoras, que de otro modo serían capaces de atacar las células cancerosas reconociendo los antígenos tumorales de la superficie celular, accedan al sitio de las células cancerosas. De esta manera, las células cancerosas evaden la inmunidad del huésped y las terapias inmuno-oncológicas, como los inhibidores de puntos de control, que explotan y dependen de dicha inmunidad. De hecho, tales tumores muestran resistencia a la inhibición del punto de control, como los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1, presumiblemente porque las células T diana están bloqueadas para que no entren en el tumor, por lo que no ejercen efectos anticancerígenos.

[0137] Varios análisis retrospectivos de tumores derivados clínicamente apuntan a la activación de la vía del TGFβ en la mediación de la resistencia primaria a CBT. Por ejemplo, el perfil transcripcional y el análisis de biopsias de melanoma antes del tratamiento revelaron un enriquecimiento de las vías y procesos biológicos asociados a TGFβ en tumores que no responden a la CBT antiPD-1. Más recientemente, análisis similares de tumores de pacientes con cáncer urotelial metastásico revelaron que la falta de respuesta al bloqueo de PD-L1 con atezolizumab se asoció con firmas transcripcionales de la señalización de TGFβ, particularmente en tumores en los que las células T CD8+ parecen estar excluidas de la entrada al tumor. El papel crítico de la señalización de TGFβ en la mediación de la exclusión inmune que da como resultado la resistencia a anti-PD-(L)1 se ha verificado en el modelo de ratón sinténico EMT-6 de cáncer de mama. Si bien los tumores EMT-6 responden débilmente al tratamiento con un anticuerpo anti-PD-L1, la combinación de este inhibidor del punto de control con 1D11, un anticuerpo que bloquea la actividad de todas las isoformas de TGFβ, dio como resultado un aumento profundo en la frecuencia de respuestas completas en comparación con el tratamiento con inhibidores individuales. Se propone que la actividad antitumoral sinérgica se debe a un cambio en el fenotipo de fibroblasto asociado al cáncer (CAF) y una degradación del fenotipo inmuno excluido, lo que da como resultado la infiltración de células T CD8+ activadas en los tumores. Se encontraron resultados similares en un modelo murino de cáncer colorrectal y metástasis usando una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 con galunisertib, un inhibidor de molécula pequeña de la quinasa ALK5 del receptor del TGFβ de tipo I. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la inhibición de la vía del TGFβ en tumores resistentes a la TCC podría ser un enfoque prometedor para mejorar o aumentar el número de respuestas clínicas a la TCC. Si bien un trabajo reciente ha implicado una relación entre la activación de la vía del TGFβ y la resistencia primaria a la CBT, la señalización del TGFβ se ha relacionado durante mucho tiempo con las características de la patogenia del cáncer. Como potente factor inmunosupresor, el TGFβ previene la actividad de las células T antitumorales y promueve los macrófagos inmunosupresores. Las células malignas a menudo se vuelven resistentes a la señalización del TGFβ como mecanismo para evadir su crecimiento y efectos supresores de tumores. El TGFβ activa los CAF, lo que induce la producción de matriz extracelular y promueve la progresión tumoral. Finalmente, TGFβ induce EMT, apoyando así la invasión tisular y la metástasis tumoral.

[0138] Los mamíferos tienen genes distintos que codifican y expresan los tres factores de crecimiento de TGFβ, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, todos los cuales emiten señales a través del mismo complejo receptor de TGFβ heteromérico. A pesar de la vía de señalización común, cada isoforma de TGFβ parece tener funciones biológicas distintas, como lo demuestran los fenotipos de ratón knockout de TGFβ no superpuestos. Las tres isoformas de TGFβ se expresan como complejos inactivos prodominio-factor de crecimiento, en los que el prodominio TGFβ, también llamado péptido asociado a latencia (LAP), envuelve su factor de crecimiento y lo mantiene en un estado latente sin señalización. Además, el TGFβ latente se

coexpresa con proteínas de unión al TGFβ latente y forma grandes complejos latentes (LLC) a través del enlace disulfuro. Asociación de TGFβ latente con proteína 1 de unión a TGFβ latente (LTBP1) o LTBP3 permite la inmovilización a la matriz extracelular, mientras que la asociación a las proteínas transmembrana GARP o LRRC33 permite la elaboración en la superficie de células T reguladoras o macrófagos, respectivamente. In vivo, el TGFβ1 latente y el TGFβ3 latente se activan mediante un subconjunto de integrinas αV, que se unen a una secuencia de consenso RGD en LAP, lo que desencadena un cambio conformacional para liberar el factor de crecimiento. El mecanismo por el cual se activa el TGFβ2 latente es menos claro ya que carece de un motivo RGD de consenso. La liberación de TGFβ1 por escisión proteolítica de LAP también se ha implicado como un mecanismo de activación, pero su relevancia biológica es menos clara.

[0139] Aunque el papel patogénico de activación de TGFβ es evidente en varios estados de enfermedad, es igualmente evidente que el enfoque terapéutico de la vía de TGFβ ha sido un reto debido a los efectos pleiotrópicos que resultan de la inhibición de vía amplia y sostenida. Por ejemplo, varios estudios han demostrado que la inhibición mediada por moléculas pequeñas del receptor quinasa tipo I de TGFβ ALK5 (TGFR1) o el bloqueo de los tres factores de crecimiento TGFβ altamente relacionados con un anticuerpo de alta afinidad dio como resultado valvulopatías cardíacas graves en ratones, ratas y perros. Estos enfoques "pan" TGFβ que bloquean toda la señalización de TGFβ tienen por tanto una ventana terapéutica muy estrecha, que ha demostrado ser un impedimento para el tratamiento de una serie de procesos relevantes para la enfermedad con una necesidad médica insatisfecha muy alta. Hasta la fecha, no se ha aprobado ninguna terapia dirigida a TGFβ y los resultados de los ensayos clínicos con tales formas de realización han sido en gran medida decepcionantes, probablemente debido al uso de lo que resultó ser regímenes de dosificación ineficaces que se requerían para adaptarse a los problemas de seguridad.

[0140] Las preocupaciones de seguridad que vienen con la inhibición amplia de TGFβ, junto con la evidencia convincente de un papel crítico para esta vía en múltiples procesos de enfermedad, sugiere que una mejor comprensión de las funciones específicas desempeñadas por uno o más miembros de la familia de TGFβ en patología de la enfermedad puede conducir a una vía viable para la intervención terapéutica. Con respecto al TGFβ y las respuestas a CBT, aquí observamos la expresión prevalente de TGFβ1 en muchos tumores humanos, lo que sugiere que este miembro de la familia puede ser el impulsor clave de la contribución de esta vía a la resistencia primaria.

[0141] Como se mencionó anteriormente, el aumento de la evidencia sugiere que el TGFβ puede ser un jugador primario en la creación y/o el mantenimiento de la inmunosupresión en los tejidos de la enfermedad, incluyendo el ambiente del tumor inmune-excluido. Por lo tanto, la inhibición de TGFβ puede desbloquear la inmunosupresión y permitir que las células T efectoras (particularmente las células T CD8+ citotóxicas) accedan y destruyan las células cancerosas diana. Además de la infiltración tumoral, la inhibición de TGFβ también puede promover la expansión de células T CD8+. Tal expansión puede ocurrir en los ganglios linfáticos y/o en el tumor (intratumoralmente). Aunque todavía no se ha esclarecido el mecanismo exacto que subraya este proceso, se contempla que la inmunosupresión está mediada al menos en parte por la activación de TGFβ1 asociado a células inmunitarias que implica células T reguladoras y macrófagos activados. Se ha informado que TGFβ promueve directamente la expresión de Foxp3 en células T CD4+, convirtiéndolas así en un fenotipo regulador (inmunosupresor) (es decir, Treg). Además, las Treg suprimen la proliferación de células T efectoras (véase, por ejemplo, la **FIG. 32B**), reduciendo así las respuestas inmunitarias. Se muestra que este proceso es dependiente de TGFβ1 y probablemente implica la señalización de TGFβ1 asociada a GARP. Las observaciones en modelos humanos y animales han indicado que un aumento de Tregs en TME se asocia con un mal pronóstico en múltiples tipos de cáncer. Además, el solicitante ha demostrado anteriormente que los macrófagos polarizados M2 expuestos a factores derivados de tumores como M-CSF regulan drásticamente al alza la expresión en la superficie celular de LRRC33, que es una molécula presentadora de TGFβ1 (ver, por ejemplo: PCT/US2018/031759). Se cree que estos denominados macrófagos asociados a tumores (o TAM) contribuyen a la inmunosupresión dependiente de TGFβ1 observada en los TME y promueven el crecimiento tumoral.

[0142] Varios tumores sólidos se caracterizan por tener un estroma tumoral enriquecido con miofibroblastos o células similares a miofibroblastos. Estas células producen una matriz de colágeno que rodea o encierra el tumor (como la desmoplasia), que al menos en parte puede deberse a una señalización hiperactiva del TGFβ1. Se contempla que la activación de TGFβ1 está mediada a través de moléculas presentadoras asociadas a ECM, por ejemplo, LTBP1 y LTBP3 en el estroma tumoral.

[0143] El solicitante describió previamente anticuerpos capaces de inhibir la activación de TGFβ1 en muchos de estos contextos biológicos que mostraban efectos prometedores tanto in vitro como in vivo (véase, por ejemplo, PCT/US2018/012601). Sin embargo, permaneció el desafío, i) para desarrollar un anticuerpo mejorado que muestre menos sesgo en las afinidades hacia varios complejos de antígenos para asegurar efectos inhibidores uniformemente en diferentes contextos biológicos o nichos en los que reside el TGFβ1 asociado a la enfermedad, y/o, ii) para desarrollar un anticuerpo de este tipo que proporcione una potencia incluso mayor que la contraparte descrita anteriormente.

[0144] Para el trabajo que se presenta en este documento, se preveía que la mejora de los anticuerpos debe incorporar todas o la mayoría de las siguientes características: 1) selectividad hacia TGFβ1 se debe mantener para minimizar las toxicidades no deseadas asociadas con pan-inhibición ("*selectividad de isoformas*") (véase, por ejemplo, PCT/US2017/021972); 2) deben exhibir amplias actividades de unión en varios contextos biológicos, o categorías asociadas a la matriz y asociadas a las células ("*independientes del contexto*"); 3) debería lograr afinidades más uniformes o no sesgadas a través de múltiples complejos de antígenos ("*uniformidad*"); 4) deben mostrar fuertes actividades de

unión para cada uno de los complejos de antígenos ("*alta afinidad*"); y, 5) debe tener actividades inhibitoras sólidas para cada contexto ("*potencia*"). Además, el mecanismo de acción preferido es inhibir el paso de activación para que el inhibidor pueda dirigirse a un complejo de TGFβ1 latente anclado al tejido, a fin de prevenir preventivamente los eventos de activación corriente abajo para lograr efectos duraderos, en lugar de dirigirse directamente a factores de crecimiento solubles/libres ("*durabilidad*"). Como se describe con más detalle en el presente documento, los inhibidores de TGFβ1 nuevos y mejorados de la presente descripción son inhibidores muy potentes y altamente selectivos de la activación latente de TGFβ1. Los datos presentados en este documento demuestran, entre otras cosas, que este mecanismo de inhibición específica de isoformas es suficiente para superar la resistencia primaria a anti-PD-1 en modelos de ratón singénicos que recapitulan de cerca algunas de las características de resistencia primaria a CBT encontradas en cánceres humanos. Junto con el perfil de seguridad preclínico mejorado de dichos anticuerpos en comparación con los inhibidores "pan" -TGFβ, estos datos de eficacia proporcionan una justificación para explorar el uso terapéutico de la inhibición selectiva del TGFβ1 para ampliar y mejorar las respuestas clínicas al bloqueo de puntos de control en la inmunoterapia contra el cáncer. así como para tratar una serie de indicaciones adicionales relacionadas con TGFβ1.

Anticuerpos selectivos de isoformas novedosas de alta afinidad de proTGFβ1

Características generales

[0145] Se describen en el presente documento inhibidores de TGFβ1 mejorados de alta afinidad, caracterizados porque, en comparación con inhibidores selectivos de TGFβ1 de las revelaciones anteriores, estos anticuerpos tienen propiedades de unión mejoradas, mayor potencia inhibitora y mantienen los perfiles de seguridad deseables y la selectividad de isoformas. Estos inhibidores selectivos de TGFβ1 de la presente divulgación son anticuerpos monoclonales (p. ej., Inmunoglobulinas, moléculas similares a inmunoglobulinas modificadas genéticamente, fragmentos de unión a antígeno o partes de los mismos) que se unen específicamente al menos a una parte del prodominio (a veces denominado "LAP") de un complejo de proTGFβ1 latente y tienen actividad inhibitora selectiva de isoformas hacia TGFβ1.

[0146] En algunas formas de realización, el anticuerpo tiene una alta afinidad (p. ej., KD de ≤ 1 nM) para cada uno de los complejos mencionados anteriormente (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 y hLRRC33-proTGFβ1). En formas de realización preferidas, tal anticuerpo tiene una KD de ≤ 200 pM para cada uno de los complejos humanos, por ejemplo, ≤ 100 pM, medido por un método basado en valoración en equilibrio de solución, tal como MSD-SET. Los anticuerpos inhibidores incluidos en este documento pueden unirse a cada uno de los grandes complejos latentes mencionados anteriormente (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 y hLRRC33-proTGFβ1) en la región o regiones de unión que incluyen al menos una porción de Lazo de Latencia dentro del prodominio del complejo proTGFβ1. Dichas regiones de unión pueden incluir además al menos una parte del dominio del factor de crecimiento.

[0147] Los inhibidores de TGFβ1 selectivos para isoformas de alta afinidad descritos en este documento pueden inhibir TGFβ1 independientemente del modo de activación. Por ejemplo, se sabe que ciertas integrinas se unen directamente a los motivos RGD dentro del prodominio de LLC y "abren" mecánicamente la estructura del prodominio en forma de jaula, provocando así que el factor de crecimiento TGFβ1 se libere del complejo latente. Por separado, se ha demostrado que determinadas proteasas presentes en el entorno extracelular activan el TGFβ1 de una manera independiente de la integrina. Es posible que un anticuerpo que se dirija directamente al motivo RGD interfiera con la unión de la integrina no inhiba la activación del TGFβ1 dependiente de la proteasa de TGFβ1. Por el contrario, en formas de realización preferidas de la presente invención, el anticuerpo independiente del contexto de alta afinidad es capaz de inhibir la activación dependiente de integrina de TGFβ1 y la activación dependiente de proteasa de TGFβ1.

[0148] Si bien la unión de alta afinidad a las proteínas humanas diana es una característica esencial para un tratamiento con anticuerpos, la capacidad de reaccionar también de forma cruzada con contadores de especies adicionales es ventajosa. En particular, dado que la mayoría de los modelos de farmacología preclínica se encuentran en roedores, la reactividad cruzada de especies con proteínas murinas/ratas proporciona herramientas convenientes como anticuerpos sustitutos para la investigación preclínica. Por consiguiente, en algunas formas de realización, los anticuerpos de alta afinidad de la presente divulgación reaccionan de forma cruzada ventajosamente con otros homólogos de mamíferos, tales como ratones, ratas y/o primates no humanos.

[0149] Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden unirse los LLCs humanos a una región de unión que comprende el Lazo de Latencia o una porción del mismo.

[0150] El Lazo de Latencia es un dominio de proteína que forma parte de la denominada "camisa de fuerza" del prodominio. En su forma nativa, el Lazo de Latencia del polipéptido de proTGFβ1 humano tiene la secuencia de aminoácidos LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153). Puede emplearse cualquier técnica adecuada para determinar si un anticuerpo se une a un TGFβ1 LLC humano en una región que incluye al menos una parte del Lazo de Latencia. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de competición que utilizan polipéptidos correspondientes. En algunas formas de realización, las regiones de unión se pueden determinar mediante cristalografía de HD-X o rayos X.

[0151] Dicho anticuerpo puede además unirse los LLC humanos en la región de unión adicionales que comprende al menos una porción del dominio del factor de crecimiento dentro del complejo proTGFβ1. La unión adicional puede ocurrir

solo en el contexto del complejo de latencia, de manera que el anticuerpo no se une específicamente al factor de crecimiento libre que no está asociado con el complejo prodominio. La región o regiones de unión adicionales dentro del dominio del factor de crecimiento de LLC pueden incluir al menos parte de los dominios proteicos denominados "Dedo-1" y/o "Dedo-2". Por lo tanto, tal anticuerpo puede unirse a un epítipo combinatorio que comprende al menos un residuo de aminoácido de Lazo de Latencia y al menos un residuo de aminoácido del dominio del factor de crecimiento.

[0152] El anticuerpo puede también unirse con alta especificidad y alta afinidad a las LLC de especies adicionales correspondientes. El anticuerpo puede mostrar reactividad cruzada de especies con contrapartes murinas.

[0153] El anticuerpo puede mostrar reactividad cruzada con antígenos humanos, de cino, de ratón y de rata.

[0154] El anticuerpo se puede unir un epítipo combinatorio que comprende uno o más residuos de aminoácidos del Lazo de Latencia (dentro del prodominio) y uno o más residuos de aminoácidos del dominio de factor de crecimiento de proTGFβ1.

[0155] Los anticuerpos pueden tener una potencia inhibidora contra TGFβ1 de tal manera que, cuando se mide mediante un ensayo celular adecuado (como los ensayos CAGA descritos en este documento), el anticuerpo tiene un CI_{50} de ≤ 5 nM (p. ej., ≤ 5 nM, ≤ 4 nM, ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM) contra un complejo hLTBP1-TGFβ1 y un complejo hLTBP3-TGFβ1. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse a cada una de las LLC humanas (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 y hLRRC33-proTGFβ1) con una KD de ≤ 500 pM, medida por valoración en equilibrio de solución. En formas de realización preferidas, el anticuerpo o el fragmento se une a cada una de las LLC humanas con una KD de ≤ 100 pM. La KD para cada una de las hLLC puede ser opcionalmente ≤ 400 pM, ≤ 300 pM, ≤ 200 pM y más preferiblemente ≤ 100 pM.

Anticuerpos de ejemplo de la invención

[0156] La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio de cadena pesada variable (VH) de acuerdo con: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYADSVKGRFTISRDNANKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 13); y un dominio de cadena ligera variable (VL) de acuerdo con:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQ
PEDIATYYCQADNHPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15).

[0157] Un ejemplo de un anticuerpo de acuerdo con la invención es Ab6.

[0158] El inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad de la presente descripción puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende seis CDR (p. ej., un H-CDR1, un H-CDR2, un H-CDR3, un L-CDR1, un L-CDR2 y un L-CDR3) seleccionados de cualquiera de los conjuntos de CDR enumerados en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. CDR basados en el esquema de numeración descrito en Lu X et al, MAbs. Enero de 2019; 11(1): 45-57

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
Ab4	FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 108)	YISSSSSTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 109)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab5	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab6	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPSADTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 103)	ARGVLDYGD MLMP (SEQ ID NO: 6)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab21	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab22	FTFGSFSMN (SEQ ID NO: 112)	YIHSDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 113)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab23	FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114)	YISPSADTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 103)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab24	FTFSSFAMY (SEQ ID NO: 115)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)

(Continuación)

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
Ab25	FTFGSFSMD (SEQ ID NO: 116)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab26	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab27	FTFSFYAMN (SEQ ID NO: 117)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab28	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	VRGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 118)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab29	FTFSSFAMN (SEQ ID NO: 119)	YISPDASTIYY AGSVKG (SEQ ID NO: 120)	VRVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 121)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab30	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGTLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 122)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab31	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARAVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 123)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)

(Continuación)

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
Ab32	FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114)	YISPSADTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 103)	ARGVWDMG DMLDP (SEQ ID NO: 124)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab33	FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114)	YISPSADTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 103)	AHGVLGYGD MLDP (SEQ ID NO: 125)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab34	FTFAFYSMN (SEQ ID NO: 126)	YISPDASTIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGD MLDP (SEQ ID NO: 110)	QASQDITNYL N (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPP WT (SEQ ID NO: 12)
Ab7	FTFADYAMT (SEQ ID NO: 204)	AISGTGAHTY YADSVKG (SEQ ID NO: 205)	ARVSSGHWD FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	DASSLQS (SEQ ID NO: 208)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 209)
Ab8	FTFSDYAMV (SEQ ID NO: 210)	AISGSGFTTY YADSVKG (SEQ ID NO: 211)	ARVSSGHWD FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	DASSLQS (SEQ ID NO: 208)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 209)
Ab9	FTFSSFAMT (SEQ ID NO: 212)	AISGSGAATY FADSVKG (SEQ ID NO: 213)	ARVSSGHWD FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	DASSLQS (SEQ ID NO: 208)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 209)
Ab10	FTFRNYAMS (SEQ ID NO: 214)	SISGSGGATY YADSVKG (SEQ ID NO: 215)	ARVSSGHWD FDY (SEQ ID NO: 206)	QASQDISNSL N (SEQ ID NO: 216)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQAPNLPFT (SEQ ID NO: 218)

(Continuación)

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
Ab11	FTFRNYAMS (SEQ ID NO: 214)	SISGSGGATY YADSVKG (SEQ ID NO: 215)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab12	FTFSDYAMV (SEQ ID NO: 210)	AISGSGFTTY YADSVKG (SEQ ID NO: 211)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab13	FTFADYAMT (SEQ ID NO: 204)	AISGFASAIYY ADSVKG (SEQ ID NO: 221)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASLS (SEQ ID NO: 222)	QQVYDPPLT (SEQ ID NO: 223)
Ab14	FTFSAYAMT (SEQ ID NO: 224)	AISGTGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 225)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASLS (SEQ ID NO: 222)	QQVYDPPLT (SEQ ID NO: 223)
Ab15	FTFSDYAMV (SEQ ID NO: 210)	AISGSGFTTY YADSVKG (SEQ ID NO: 211)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab2	FTFADYAMT (SEQ ID NO: 204)	AISGGAATY FADSVKG (SEQ ID NO: 213)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab16	FTFSNYAMS (SEQ ID NO: 226)	AISGSGFTTY YADSVKG (SEQ ID NO: 211)	ARVSSGHW FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)

(Continuación)

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
Ab17	FTFSSFAMT (SEQ ID NO: 212)	AISGSGAATY FADSVKG (SEQ ID NO: 213)	ARVSSGHWD FDY (SEQ ID NO: 206)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLQS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab18	FTFSDYAMV (SEQ ID NO: 210)	AISGSGAATY FADSVKG (SEQ ID NO: 213)	ATVSSGHWD FDY (SEQ ID NO: 227)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLQS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab19	FTFSSFAMT (SEQ ID NO: 212)	AISGSGAATY FADSVKG (SEQ ID NO: 213)	ARVSSGHWD FDE (SEQ ID NO: 228)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLQS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab20	FTFSAYAMT (SEQ ID NO: 224)	AISGSGGVTY YADSVKG (SEQ ID NO: 229)	ARVSSGHWD YDY (SEQ ID NO: 230)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	AASNLQS (SEQ ID NO: 219)	QQTYTVPL T (SEQ ID NO: 220)
Ab35	FTFRNYAMS (SEQ ID NO: 214)	SISGSGGATY YADSVKG (SEQ ID NO: 215)	ARVSSYLWD FDY (SEQ ID NO: 231)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	DASSLQS (SEQ ID NO: 208)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 209)
Ab36	FTFRNYAMS (SEQ ID NO: 214)	SISGSGGATY YADSVKG (SEQ ID NO: 215)	ARVSSGHWD LDY (SEQ ID NO: 232)	RASQSISSYL N (SEQ ID NO: 207)	DASSLQS (SEQ ID NO: 208)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 209)

[0159] La determinación de las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo depende del esquema de numeración particular que se esté empleando. Los sistemas comúnmente utilizados incluyen, pero no se limitan a: sistema de numeración Kabat, sistema de numeración IMTG, sistema de numeración Chothia y otros como el esquema de numeración descrito por Lu et al. (Lu X et al, MAbs. Enero de 2019; 11(1): 45-57). Para ilustrar, a continuación se ejemplifican 6 secuencias CDR de Ab6 definidas por cuatro sistemas de numeración diferentes. Puede usarse cualquier sistema de numeración de CDR reconocido en la técnica para definir secuencias de CDR de los anticuerpos de la presente divulgación.

Tabla 6. Seis CDR de un anticuerpo ejemplar (Ab6) sobre la base de cuatro esquemas de numeración

	Numeración IMTG	Numeración de Kabat	Numeración de Chothia	Sistema de Lu et al.
H-CDR1	GFTFSSFS (SEQ ID NO: 2)	SFSMD (SEQ ID NO: 102)	GFTFSSF (SEQ ID NO: 233)	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)
H-CDR2	ISPSADTI (SEQ ID NO: 4)	YISPSADTIYADSVKG (SEQ ID NO: 103)	SPSADT (SEQ ID NO: 234)	YISPSADTIYADSVKG (SEQ ID NO: 103)
H-CDR3	ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6)	GVL DYGDMLMP (SEQ ID NO: 104)	GVL DYGDMLMP (SEQ ID NO: 104)	ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6)
L-CDR1	QDITNY (SEQ ID NO: 8)	QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)	QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)	QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)
L-CDR2	DAS (SEQ ID NO: 10)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)
L-CDR3	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)

[0160] Las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos de la presente divulgación se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7. Dominios variables de cadena pesada y dominios variables de cadena ligera de anticuerpos de la presente divulgación

	Dominio variable de cadena pesada (V _H)	Dominio variable de cadena ligera (V _L)
Ab4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 127)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 128)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLMPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 129)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYIHSASTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 130)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

(Continuación)

	Dominio variable de cadena pesada (V_H)	Dominio variable de cadena ligera (V_L)
Ab23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 131)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab24	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSS FAMYWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 132)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 133)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 134)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSF YAMNWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 135)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 136)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab29	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSS FAMNWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAG SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRAVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 137)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 138)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 139)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVWDMGDMDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 140)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYPADTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAHGVLDYGDMLDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 141)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLPEDIATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

(Continuación)

	Dominio variable de cadena pesada (V_H)	Dominio variable de cadena ligera (V_L)
Ab34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAF YSMNWVRQAPGKGLEWVSISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGLTVT VSS (SEQ ID NO: 142)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISLQPEDATYYCQQADNHPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab7	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFAD YAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGTGAHTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 235)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 236)
Ab8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSD YAMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGFTTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 237)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 236)
Ab9	QVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGFTFSS FAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAATYFAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 238)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 236)
Ab10	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFRN YAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 239)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNSLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSRS GTDFTFTISLQPEDATYYCQQAPNLPFTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 240)
Ab11	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFRN YAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 239)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
Ab12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSD YAMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGFTTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 237)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
Ab13	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFAD YAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGFASAIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 242)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVDPPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 243)
Ab14	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSA YAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGTGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 244)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVDPPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 243)
Ab15	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSD YAMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGFTTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 245)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
Ab2	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFAD YAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAATYFAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 246)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)

(Continuación)

	Dominio variable de cadena pesada (V_H)	Dominio variable de cadena ligera (V_L)
5	Ab16 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSN YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGFTTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSGHWDFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 247)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
10	Ab17 EVQLLES GGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFSS FAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAATYFAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSGHWDFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 248)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
15	Ab18 QVQLVES GGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSD YAMVWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAATYFAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCATVSSGHWDFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 249)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
20	Ab19 QVQLVES GGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSS FAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAATYFAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSGHWDFDEWQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 250)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
25	Ab20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSA YAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGVTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSGHWDDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 251)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 241)
30	Ab35 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRN YAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSYLWDFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 252)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 236)
35	Ab36 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRN YAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSGHWLDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 253)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSAPFTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 236)
40	Ab1 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRN YAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVY YCARVSSGHWDFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 239)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNFLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQQVFNPPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 254)

[0161] A continuación se proporcionan las secuencias de aminoácidos completas para la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de ciertos anticuerpos enumerados en la Tabla 7 (p. ej., Ab6), así como las secuencias de ácido nucleico que codifican la región de variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera de ciertos anticuerpos:

Ab3 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQGT~~LVTVSS~~ (SEQ ID NO: 95)

Ab6 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada

EVQLVES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CTAS~~GFTFSSFS~~MDWVRQAPGKGLEWVS~~YISPSADTI~~YYADSVKGRFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWGQGT~~LVTVSS~~ (SEQ ID NO: 13)

Ab6 - Secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCC
TCTGGATTACCTTCAGTAGCTTCAGCATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTT
CATACATTAGTCCCAGTGCAGACACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC
AATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCA
GAGGGGTGCTCGACTACGGAGACATGTTAATGCCATGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ
ID NO: 14)

Ab6 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDITNLYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ
PEDIATYYCQADNHPPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Ab6 - Secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGC
GAGTCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGA
TGATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTGCAACATATTACTGTACAGAGCCGACAATCACCTCCTTGACTTTTG
GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA (SEQ ID NO: 16)

Ab6 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYADSVKGRFTISRDAKN
TLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 17)

Ab6 - Secuencia de los ácidos nucleicos de la cadena pesada

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCC
TCTGGATTACCTTCAGTAGCTTCAGCATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTT
CATACATTAGTCCCAGTGCAGACACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC
AATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCA
GAGGGGTGCTCGACTACGGAGACATGTTAATGCCATGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTC
GACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGC
TGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGTC
ACACCTTCCCTGCCGTGCTGAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCTTCTCCTCC
CTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGTGGAGT
CCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCTCTGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCT
CCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTGTCCAGG
AAGATCCTGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGA
GGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG
GAATACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCC
AGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGAC
ATGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCGATATCGCGTGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAAC
TACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTACTCCAGGTGACCGTGGACAAGTC
CCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
TCCCTGTCCCTGTCTCTGGGC (SEQ ID NO: 18)

Ab6 - Secuencia de los aminoácidos de la cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQ
PEDIATYYCQQADNHPPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

Ab6 - Secuencia de los ácidos nucleicos de la cadena ligera (kappa humana)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGC
GAGTCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGA
TGCATCCAATTTGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGATCTGGACAGATTTTACTTTACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTGAGCAGGCCGACAATCACCTCCTGGACTTTTG
GCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG
CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 20)

Ab2 - Secuencia de los aminoácidos de la cadena pesada

EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAATYFADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSLT
VLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQFPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 261)

Ab2 - de cadena ligera de secuencia de aminoácidos

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQTIVPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 262)

[0162] En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en esta memoria comprenden mutaciones que confieren propiedades deseables a los anticuerpos. Por ejemplo, para evitar complicaciones potenciales debido al intercambio de brazo Fab, que se sabe que ocurre con mAbs IgG4 nativos, los anticuerpos proporcionados en este documento pueden comprender una mutación estabilizadora 'Adair' (Angal et al, "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993), donde la serina 228 (numeración EU; numeración Kabat del residuo 241) se convierte en prolina dando como resultado una secuencia de bisagras similar a IgG1 (CPPCP (SEQ ID NO: 54)). Por consiguiente, cualquiera de los anticuerpos puede incluir una mutación estabilizadora de 'Adair' o la secuencia de aminoácidos CPPCP (SEQ ID NO: 54).

[0163] Los inhibidores independientes del contexto, específicos de isoforma de TGFβ1 de la presente divulgación pueden comprender opcionalmente regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo C-terminal a un dominio constante de cadena ligera como C_K o C_L. De manera similar, un dominio VH o parte del mismo puede unirse a toda o parte de una cadena pesada como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y cualquier subclase de isotipo. Los anticuerpos pueden incluir regiones constantes adecuadas (véase, por ejemplo, Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, N° 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Por lo tanto, los anticuerpos dentro del alcance de esta divulgación pueden incluir dominios VH y VL, o una porción de unión a antígeno de los mismos, combinados con cualquier región constante adecuada.

[0164] Los inhibidores de la célula asociada a TGFβ1 (p. ej., TGFβ1 presentado a GARP y TGFβ1 presentado a LRRC33) de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos que específicamente se unen tal complejo (p. ej., TGFβ1 GARP-pro/latente y LRRC33-pro/TGFβ1 latente) y desencadenan la internalización del complejo. Este modo de acción provoca la eliminación o el agotamiento de los complejos TGFβ1 inactivos (p. ej., GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1) de la superficie celular (p. ej., Treg, macrófagos, etc.), reduciendo así el TGFβ1 disponible para activación.

Caracterización de los inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas novedosos de alta afinidad

Perfiles de unión

[0165] Anticuerpos descritos en el presente documento tienen actividades de unión mejoradas. En el presente documento se incluye una clase de anticuerpos independientes del contexto de alta afinidad capaces de inhibir selectivamente la activación de TGFβ1. Nótese que el término "*independiente del contexto*" se usa en este documento con un mayor grado de rigurosidad en comparación con el uso más general anterior. Según la presente divulgación, el término confiere un nivel de *uniformidad* en las afinidades relativas (es decir, no sesgo) que el anticuerpo puede ejercer hacia diferentes complejos de antígenos. Por tanto, el anticuerpo independiente del contexto de la presente invención es capaz de dirigirse a múltiples tipos de complejos precursores de TGFβ1 (p. ej., que presentan complejos de molécula-proTGFβ1) y de unirse a cada uno de dichos complejos con afinidades equivalentes (es decir, no mayores que diferencias de tres veces en afinidades relativas entre los complejos) con valores de K_D inferiores a 10 nM, preferiblemente inferiores a 5 nM, más preferiblemente inferiores a 1 nM, incluso más preferiblemente inferiores a 100 pM, medido por, por ejemplo, MSD-SET. Como se presenta a continuación, los anticuerpos abarcados por la invención tienen valores K_D en un rango subnanomolar.

[0166] Por lo tanto, los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a cada uno de los complejos de molécula-proTGFβ1 de presentación humana (a veces conocidos como "Complejo de Latencia Larga", que es un complejo ternario compuesto por un dímero de proTGFβ1 acoplado a un sola molécula presentadora), a saber, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1. Por lo general, los complejos proteicos purificados producidos de forma recombinante se utilizan como antígenos (p. ej., complejos de antígenos) para evaluar o confirmar la capacidad de un anticuerpo para unirse a los complejos de antígeno en ensayos de unión in vitro adecuados. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a ensayos basados en interferometría de biocapa (BLI) (como Octet®) y ensayos basados en valoración en equilibrio en solución (como MSD-SET).

[0167] Los ensayos de unión basados en BLI se utilizan ampliamente en la técnica para medir las afinidades y la cinética de los anticuerpos frente a los antígenos. Es una tecnología sin etiquetas en donde las interacciones biomoleculares se analizan sobre la base de la interferencia óptica. Una de las proteínas, por ejemplo, un anticuerpo que se está probando, puede inmovilizarse en la punta del biosensor. Cuando la otra proteína en solución, por ejemplo, un antígeno, se une al anticuerpo inmovilizado, provoca un cambio en el patrón de interferencia, que puede medirse en tiempo real. Esto permite el seguimiento de la especificidad de unión, las tasas de asociación y disociación, así como la dependencia de la concentración. Por tanto, BLI es una medida *cinética* que revela la dinámica del sistema. Debido a su facilidad de uso y resultados rápidos, los ensayos basados en BLI, como el sistema Octet® (disponible en ForteBio/Molecular Devices, Fremont California), son particularmente convenientes cuando se utilizan como método de detección inicial para identificar y separar un grupo de "aglutinantes" de un grupo de "no aglutinantes" o "aglutinantes débiles" en el proceso de selección.

[0168] Los ensayos de unión basados en BLI revelaron que los nuevos anticuerpos se caracterizan como anticuerpos "equilibrados por contexto/independientes de contexto" cuando la afinidad de unión se mide por Octet®. Como se puede ver en la Tabla 8 que resume los perfiles de unión de anticuerpos de la presente divulgación basados en BLI, estos anticuerpos muestran valores de K_D relativamente uniformes en un rango subnanomolar en los cuatro complejos diana, con diferenciales de matriz a célula relativamente bajos (no mayores que sesgo quintuple) (véase la columna (H)). Esto se puede contrastar con el anticuerpo Ab3 identificado previamente, proporcionado como un anticuerpo de referencia, que muestra afinidades relativas significativamente más altas hacia los complejos asociados a la matriz (sesgo de 27+ veces) sobre los complejos asociados a las células.

[0169] La **Tabla 8** a continuación proporciona ejemplos de anticuerpos proTGFβ1 de alta afinidad e independientes del contexto de la presente divulgación. La tabla proporciona resultados representativos de ensayos de unión in vitro, medidos por Octet®. También se obtienen resultados similares mediante una técnica basada en SPR (Biacore System).

[0170] La columna (A) de la Tabla enumera los anticuerpos monoclonales con secuencias de aminoácidos discretas. Ab3 (mostrado en negrita) es un anticuerpo de referencia identificado previamente, que demostró ser potente en ensayos basados en células; eficaz en varios modelos animales; y, con un perfil toxicológico limpio (divulgado en: PCT/US2018/012601). Las columnas (B), (D), (E) y (F) proporcionan afinidades de cada uno de los anticuerpos mencionados, medidas en K_D . La columna (B) muestra la afinidad por un complejo de LTBP1-proTGFβ1 humano recombinante; la columna (C) muestra la afinidad por un complejo de LTBP3-proTGFβ1 humano recombinante; (E) muestra la afinidad por un complejo de GARP-proTGFβ1 humano recombinante; y (F) muestra la afinidad por un complejo recombinante humano LRRC33-proTGFβ1, de cada uno de los anticuerpos. Los valores medios de K_D de (B) y (C) se muestran en la columna correspondiente (D), que representa colectivamente las afinidades de los anticuerpos por complejos de proTGFβ1 asociados a ECM o matriz. De manera similar, los valores promedio de K_D de (E) y (F) se muestran en la columna correspondiente (G), que colectivamente representa las afinidades de los anticuerpos por la superficie celular o complejos de proTGFβ1 asociados a la célula. Finalmente, las proporciones relativas entre los valores medios de K_D de las columnas (D) y (G) se expresan como "sesgo de veces" en la columna (H). Por tanto, cuanto mayor es el número de columnas (H), mayor sesgo existe para el anticuerpo particular, cuando se comparan las preferencias de unión del anticuerpo para los complejos asociados a la matriz y los complejos de la superficie celular. Esta es una forma de representar y comparar cuantitativamente el sesgo inherente de los anticuerpos a sus complejos diana. Dichos análisis pueden ser útiles para guiar el proceso de selección de un anticuerpo candidato para un uso terapéutico particular.

Tabla 8. Perfiles de unión cinética in vitro de anticuerpos TGFβ1 de alta afinidad representativos como se ha medido por Octet®

(A) Ab Ref	ProTGFβ1 (K _D) asociado a la matriz			ProTGFβ1 (K _D) asociado a células			(H) G/D (pliegue sesgado)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM AVRG (nM)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) Célula AVRG (nM)	
Ab3	4,70E-10	4,59E-10	0,4645	1,73E-08	8,52E-09	12,91	27,79
Ab21	2,25E-10	2,68E-10	0,2465	8,33E-10	4,55E-10	0,644	2,613
Ab22	3,18E-10	3,29E-10	0,3235	9,74E-10	4,15E-10	0,6945	2,147
Ab23	4,17E-10	4,68E-10	0,4425	1,34E-09	4,55E-10	0,8975	2,028
Ab24	2,46E-10	1,98E-10	0,222	6,65E-10	4,10E-10	0,5375	2,421
Ab25	2,17E-10	1,52E-10	0,1845	4,88E-10	4,09E-10	0,4485	2,431
Ab26	2,21E-10	1,73E-10	0,197	6,25E-10	3,60E-10	0,4925	2,500
Ab27	1,78E-10	2,38E-10	0,208	4,24E-10	2,99E-10	0,3615	1,738
Ab28	3,40E-10	3,16E-10	0,328	7,97E-10	4,09E-10	0,603	1,838
Ab29	1,89E-10	1,21E-10	0,155	3,07E-10	3,02E-10	0,3045	1,965
Ab30	3,32E-10	2,61E-10	0,2965	8,33E-10	5,35E-10	0,684	2,307
Ab31	2,36E-10	1,81E-10	0,2085	5,81E-10	4,10E-10	0,4955	2,376
Ab6	2,07E-10	1,23E-10	0,165	4,04E-10	3,36E-10	0,37	2,242
Ab32	2,69E-10	2,15E-10	0,242	4,96E-10	6,98E-10	0,597	2,467
Ab33	1,79E-10	1,11E-10	0,145	2,65E-10	3,39E-10	0,302	2,083
Ab7	4,87E-10	4,17E-10	0,452	1,80E-08	1,03E-08	14,15	31,3
Ab8	3,29E-10	3,02E-10	0,3155	1,54E-08	1,00E-08	12,7	40,25
Ab9	3,48E-10	2,84E-10	0,316	1,55E-08	1,30E-09	8,4	26,58
Ab10	2,62E-10	3,19E-10	0,2905	1,02E-08	1,06E-09	5,63	19,38
Ab11	1,67E-10	1,54E-10	0,1605	8,42E-10	5,55E-10	0,6985	4,352
Ab12	1,57E-10	1,83E-10	0,17	7,01E-09	7,75E-10	3,8925	22,897
Ab13	2,76E-10	2,49E-10	0,2625	1,00E-08	1,40E-09	5,7	21,71
Ab14	3,36E-10	3,46E-10	0,341	1,05E-08	1,34E-09	5,92	17,36
Ab15	1,50E-10	1,68E-10	0,159	7,01E-09	7,02E-10	3,856	24,25
Ab2	1,65E-10	1,48E-10	0,1565	7,78E-10	5,08E-10	0,643	4,1086
Ab16	1,81E-10	1,32E-10	0,1565	4,16E-09	6,31E-10	2,3955	15,307
Ab17	1,74E-10	2,08E-10	0,191	8,62E-09	6,58E-10	4,639	24,288
Ab18	3,12E-10	2,57E-10	0,2845	1,15E-08	1,02E-09	6,26	22,00
Ab19	1,89E-10	1,56E-10	0,1725	1,12E-08	6,92E-10	5,946	34,47
Ab20	1,92E-10	1,31E-10	0,1615	8,84E-10	5,45E-10	0,7145	4,424
Ab35	1,59E-10	1,69E-10	0,164	7,37E-09	5,45E-10	3,9575	24,13
Ab36	3,53E-10	4,15E-10	0,384	1,28E-08	1,42E-09	7,11	18,5156

[0171] La divulgación proporciona una clase de anticuerpos independientes del contexto de alta afinidad, siendo cada uno de ellos capaz de unirse con afinidades equivalentes a cada uno de los cuatro complejos de molécula-proTGFβ1 presentadora conocidos, a saber, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1. El anticuerpo puede unirse a cada uno de los complejos de molécula presentadora-proTGFβ1 con afinidades equivalentes o superiores, en comparación con el anticuerpo de referencia descrito anteriormente, Ab3.

[0172] Como se muestra, los anticuerpos proTGFβ1 de la presente divulgación tienen afinidades particularmente altas para complejos proTGFβ1 asociados a matriz. En algunas formas de realización, el valor medio de K_D de los complejos asociados a matriz (es decir, LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1) es ≤ 1 nM o ≤ 0,5 nM.

[0173] Como se muestra, los anticuerpos proTGFβ1 de la presente divulgación tienen altas afinidades para complejos proTGFβ1 asociados a células. En algunas formas de realización, el valor K_D promedio de los complejos asociados a células (es decir, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1) es ≤ 2 nM o ≤ 1 nM.

[0174] Los anticuerpos proTGFβ1 de alta afinidad de la presente divulgación se caracterizan por sus afinidades uniformes (imparciales) hacia los cuatro complejos de antígeno (comparar, por ejemplo, a Ab3). Ningún complejo de antígeno individual entre los cuatro complejos conocidos de molécula presentadora-proTGFβ1 descritos en el presente documento se desvía significativamente en K_D. En otras palabras, se han logrado actividades de unión más uniformes mediante la presente divulgación en relación con los anticuerpos proTGFβ1 descritos anteriormente (incluido Ab3) en el sentido de que cada uno de dichos anticuerpos muestra afinidades equivalentes a través de los cuatro complejos de antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento muestra perfiles de unión insesgados o uniformes, caracterizados porque la diferencia (o rango) de afinidades del anticuerpo o los fragmentos a través de los cuatro complejos de antígeno proTGFβ1 no es más de cinco veces entre los valores de K_D más bajos y más altos. En algunas formas de realización, la diferencia relativa (o rango) de afinidades no es más de tres veces.

[0175] El concepto de "uniformidad" o falta de sesgo se ilustra adicionalmente en la Tabla 8. Se calculan, respectivamente, los valores promedio K_D entre los dos complejos asociados a matriz y los asociados a células (véanse las columnas (D) y (G)). Estos valores promedio K_D pueden utilizarse entonces para preguntar si existe sesgo en actividades de unión entre los complejos asociados con matriz vs. complejos asociados con la superficie celular (p. ej., células del sistema inmunitario). El sesgo puede expresarse como "diferencia de veces" en los valores promedio K_D , como se ilustra en la Tabla 8. En comparación con el anticuerpo descrito anteriormente, Ab3, los anticuerpos proTGFβ1 de alta afinidad e independientes del contexto abarcados por la presente divulgación son notablemente insesgados en el sentido de que muchos no muestran más de tres veces la diferencia en los valores promedio K_D entre los complejos asociados a la matriz y a las células (compárelo con un sesgo de más de 25 veces en Ab3).

[0176] Por consiguiente, se proporciona una clase de fragmentos o anticuerpos monoclonales independientes del contexto, cada uno de los cuales es capaz de unirse con afinidades equivalentes a cada uno de los siguientes complejos de molécula presentadora-proTGFβ1 con una afinidad de ≤ 1 nM medida por Interferometría de biocapa o resonancia de plasmón superficial: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1. Dicho anticuerpo se une específicamente a cada uno de los complejos mencionados anteriormente con una afinidad de ≤ 5 nM medida por interferometría de biocapa o resonancia de plasmón superficial, donde el anticuerpo monoclonal o el fragmento muestra no más de un sesgo de tres veces en la afinidad hacia cualquiera de los complejos anteriores en relación con los otros complejos, y en donde el anticuerpo monoclonal o el fragmento inhibe la liberación del factor de crecimiento TGFβ1 maduro de cada uno de los complejos proTGFβ1 pero no de los complejos proTGFβ2 o proTGFβ3.

[0177] Mientras que la cinética de perfiles de unión (p. ej., las tasas de "encendido" y "apagado") obtenibles a partir de ensayos basados en BLI proporcionan información útil, el Solicitante de la presente descripción contempla que, basado en el mecanismo de acción de los inhibidores de activación descritos en este documento, es decir, los anticuerpos que funcionan uniéndose a un objetivo anclado (p. ej., localizado en tejido) inactivo (p. ej., latente) evitando así que se active, las propiedades de unión medidas *en equilibrio* podrían reflejar con mayor precisión su comportamiento y potencia in vivo. Para poner esto en perspectiva, a modo de ejemplo, los anticuerpos con una tasa de activación rápida (" K_{on} ") que se reflejaría en las mediciones de unión obtenidas por BLI, pueden proporcionar parámetros relevantes para evaluar anticuerpos *neutralizantes* (p. ej., anticuerpos que se dirigen directamente y deben secuestrar rápidamente el factor de crecimiento activo soluble en sí mismo para que funcionen como inhibidores efectivos). Sin embargo, lo mismo puede no aplicarse necesariamente a los anticuerpos que funcionan como *inhibidores de la activación*, como los que se describen en este documento. Como se describe, el mecanismo de acción de los nuevos inhibidores de TGFβ1 de la presente invención es a través de la inhibición del paso de activación, que se logra dirigiendo el complejo latente tejido/celular, en contraposición al secuestro del factor de crecimiento post-activación soluble. Esto se debe a que un *inhibidor de la activación* de TGFβ1 se dirige al precursor inactivo localizado en los tejidos respectivos (p. ej., dentro de la ECM, la superficie de la célula inmunitaria, etc.) evitando así de forma preventiva que el factor de crecimiento maduro se libere del complejo. Se cree que este mecanismo de acción permite que el inhibidor logre la saturación de la diana (p. ej., equilibrio) in vivo, sin la necesidad de competir rápidamente por moléculas de factor de crecimiento transitorio contra receptores endógenos como requieren los inhibidores neutralizantes convencionales.

[0178] Tomando en consideración esta diferencia en el mecanismo de acción, una evaluación adicional de las propiedades de unión se llevó a cabo por el uso de otro modo de los ensayos de unión in vitro que permite la determinación de afinidad *en equilibrio*.

[0179] En vista de esto, se contempla que ensayos que miden las afinidades de tales anticuerpos de unión *en el equilibrio* pueden representar con mayor precisión el modo de compromiso diana in vivo. Por tanto, pueden realizarse ensayos de unión basados en MSD-SET (u otros ensayos adecuados), como se ejemplifica en la Tabla 9 a continuación.

[0180] La valoración en equilibrio de la solución ("SET") es un ensayo mediante el cual la unión entre dos moléculas (como un antígeno y un anticuerpo que se une al antígeno) se puede medir en equilibrio en una solución. Por ejemplo, SET basado en Descubrimiento de Escala Meso ("MSD"), o MSD-SET, es un modo útil de determinar constantes de disociación para interacciones proteína-proteína de alta afinidad en equilibrio (ver, por ejemplo: Ducata et al. (2015) J Biomolecular Screening 20 (10): 1256-1267). Los ensayos basados en SET son particularmente útiles para determinar los valores de K_D de anticuerpos con afinidades subnanomolares (p. ej., picomolares).

Tabla 9. Ejemplos de anticuerpos de TGFβ1 de alta afinidad (hlgG4) de la presente divulgación y valores de K_D medidos en equilibrio por MSD-SET ("h" indica 3 humano)

(A) Ab Ref	ProTGFβ1 asociado a la matriz			ProTGFβ1 asociado a células			(H) G/D (pliegue sesgado)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM AVR (nM)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) Célula AVR (nM)	
C1	3,30E-08	1,40E-08	23,2	5,10E-09	2,20E-09	3,65	0,16
C2	2,10E-08	1,20E-08	16,5	8,80E-09	6,10E-09	7,45	0,48
Ab3	1,30E-08	1,62E-08	14,6	2,80E-08	3,50E-08	31,5	2,16
Ab6	1,8E-11	2,9E-11	0,024	2,7E-11	6,3E-11	0,045	1,88

(Continuación)

(A) Ab Ref	ProTGFβ1 asociado a la matriz			ProTGFβ1 asociado a células			(H) G/D (pliegue sesgado)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM AVRG (nM)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) Célula AVRG (nM)	
Ab22	5,00E-11	3,30E-11	0,042	2,70E-11	2,00E-10	0,114	2,71
Ab24	2,40E-11	2,10E-11	0,023	1,90E-11	1,80E-10	0,100	4,35
Ab26	2,80E-11	2,30E-11	0,026	1,40E-11	1,30E-10	0,072	2,77
Ab29	1,20E-11	1,10E-11	0,012	5,50E-12	4,30E-11	0,024	2,00
Ab30	3,10E-11	2,60E-11	0,029	2,20E-11	1,40E-10	0,081	2,80
Ab31	1,90E-11	1,40E-11	0,017	1,90E-11	9,60E-11	0,058	3,41
Ab32	3,70E-11	2,60E-11	0,032	1,50E-11	8,70E-11	0,051	1,60
Ab33	1,10E-11	7,00E-12	0,009	7,80E-12	4,60E-11	0,027	3,00
Ab4	4,6E-9	5,5E-9	5,05	2,5E-9	2,1E-9	2,3	0,42
Ab11	1,20E-09	1,20E-09	1,2	3,00E-09	6,30E-09	4,65	3,87
Ab12	7,80E-10	6,60E-10	0,72	1,70E-09	3,20E-09	2,45	3,40
Ab2	3,60E-10	1,71E-10	0,266	1,40E-09	3,20E-09	2,30	8,66
Ab19	2,10E-09	2,70E-09	2,835	3,80E-09	5,70E-09	4,75	1,68
Ab20	2,20E-10	1,80E-10	0,20	1,10E-09	1,60E-09	1,35	6,75
Ab35	2,70E-10	2,60E-10	0,265	1,10E-09	1,10E-09	1,1	4,15

[0181] La Tabla 9 también incluye tres anticuerpos selectivos de TGFβ1 descritos previamente (C1, C2 y Ab3) como anticuerpos de referencia. C1 y C2 se describieron por primera vez en PCT/US2017/021972 publicado como WO 2017/156500, y Ab3 se describió en PCT/US2018/012601 publicado como WO 2018/129329.

[0182] Como puede verse a partir de la afinidad de datos proporcionada en la Tabla 9, las actividades de los nuevos anticuerpos de unión de acuerdo con la presente descripción son significativamente mayores que los anticuerpos de referencia previamente identificados. Además, los nuevos anticuerpos TGFβ1 son "independientes del contexto" en el sentido de que se unen a cada uno de los complejos LLC humanos con afinidades equivalentes (p. ej., ~ intervalo subnanomolar, por ejemplo, con KD <1 nM). Los perfiles de unión independientes del contexto de alta afinidad sugieren que estos anticuerpos pueden ser ventajosos para su uso en el tratamiento de indicaciones relacionadas con TGFβ1 que implican la desregulación de los componentes inmunitarios y relacionados con la ECM, como el cáncer.

[0183] Para los ensayos de unión basados en la titulación de equilibrio de solución, complejos de proteínas que comprenden una de las moléculas que presentan tales como las que se muestran anteriormente se pueden emplear como antígeno (presentando molécula de TGFβ1 compleja, o un LLC). Se permite que los anticuerpos de prueba formen un complejo antígeno-anticuerpo en solución. Las mezclas de reacción de antígeno-anticuerpo se incuban para permitir que se alcance un equilibrio; la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo presente en las reacciones de ensayo puede medirse por medios adecuados bien conocidos en la técnica. En comparación con los ensayos basados en BLI, los ensayos basados en SET se ven menos afectados por las tasas de activación/desactivación del complejo antígeno-anticuerpo, lo que permite una detección sensible de interacciones de muy alta afinidad. Como se muestra en la Tabla 9, en la presente divulgación, los inhibidores de alta afinidad preferidos de TGFβ1 muestran un intervalo de afinidades subnanomolar (p. ej., picomolar) en todos los grandes complejos latentes ensayados, según se determina mediante ensayos basados en SET.

[0184] En formas de realización adicionales preferidas, dichos anticuerpos o los fragmentos también son de reacción cruzada con homólogos murinos (p. ej., de rata y/o ratón) y/o de primates no humanos (p. ej., cyno). Ab6 es capaz de unirse con alta afinidad a cada uno de los grandes complejos latentes de múltiples especies, incluyendo: humano, murino, rata y mono cynomolgus, como se ejemplifica en la Tabla 10 y el Ejemplo 13 a continuación.

Tabla 10. Ejemplo no limitante de anticuerpo TGFβ1 independiente del contexto de alta afinidad con reactividades cruzadas de especies medidas por MSD-SET ("h" indica humano; "m" indica murino)

Complejo Ag	hLTBP1- proTGFβ1	hLTBP3- proTGFβ1	hGARP proTGFβ1	hLRRC33- proTGFβ1	mLTBPI proTGFβ1	mLTBP3- proTGFβ1	mGARP proTGFβ1	mLRRC33- proTGFβ1
Ab6	1,80E-11	2,90E-11	2,70E-11	6,30E-11	2,40E-11	2,80E-11	2,10E-11	4,80E-11

Potencia

[0185] Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden caracterizarse ampliamente como "anticuerpos funcionales" por su capacidad para inhibir la señalización de TGF β 1. Como se usa en el presente documento, "un anticuerpo funcional" confiere una o más actividades biológicas en virtud de su capacidad para unirse a una proteína diana (p. ej., un antígeno), de tal manera que modula su función. Por lo tanto, los anticuerpos funcionales incluyen ampliamente aquellos capaces de modular la actividad/función de las moléculas diana (es decir, el antígeno). Dichos anticuerpos moduladores incluyen anticuerpos *inhibidores* (o anticuerpos *inhibitorios*) y anticuerpos *activadores*. La presente divulgación se refiere a anticuerpos que pueden inhibir un proceso biológico mediado por la señalización de TGF β 1 asociado con múltiples contextos de TGF β 1. Los agentes inhibidores utilizados para llevar a cabo la presente invención están destinados a ser selectivos de TGF β 1 y no dirigidos a o interfieren con TGF β 2 y TGF β 3 cuando se administran a una dosis terapéuticamente eficaz (dosis a la que se alcanza una eficacia suficiente dentro de niveles aceptables de toxicidad). Los nuevos anticuerpos de la presente descripción han mejorado las actividades inhibitoras (potencia) en comparación con inhibidores de la activación previamente identificados de TGF β 1.

[0186] En algunas formas de realización, la potencia de un anticuerpo inhibidor se puede medir en ensayos basados en células adecuadas, tales como ensayos de células reporteras CAGA descritos en el presente documento. Generalmente, se pueden usar células cultivadas, tales como células heterólogas y células primarias, para realizar ensayos de potencia basados en células. Pueden usarse células que expresan TGF β 1 endógeno y/o una molécula presentadora de interés, como LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos que codifican proteína(s) de interés, como TGF β 1 y/o una molécula presentadora de interés, como LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33, pueden introducirse en dichas células para expresión, por ejemplo, por transfección. (p. ej., transfección estable o transfección transitoria) o por infección basada en un vector viral. En algunas formas de realización, se emplean células LN229 para tales ensayos. Las células que expresan TGF β 1 y una molécula presentadora de interés (p. ej., LTBP1, LTBP3, GARP o LRRC33) se hacen crecer en cultivo, que "presentan" el complejo latente grande en la superficie celular (cuando se asocia con GARP o LRRC33) o se depositan en el ECM (cuando se asocia con un LTBP). La activación de TGF β 1 puede desencadenarse por la integrina, expresada en otra superficie celular. Las células que expresan la integrina pueden ser las mismas células que coexpresan el complejo latente grande o un tipo celular separado. Las células reporteras se añaden al sistema de ensayo, que incorpora un elemento que responde a TGF β . De esta manera, el grado de activación TGF β se puede medir mediante la detección de la señal de las células indicadoras (p. ej., genes informadores respondedores a TGF β , tales como luciferasa acoplada a un elemento promotor respondedor de TGF β) a la activación TGF β . Usando sistemas de ensayo basados en células, las actividades inhibitoras de los anticuerpos se pueden determinar midiendo el cambio (reducción) o la diferencia en la señal informadora (p. ej., actividades de luciferasa medidas por lecturas de fluorescencia) en presencia o ausencia de anticuerpos de prueba. Dichos ensayos se ejemplifican en el Ejemplo 2 de este documento.

[0187] Por lo tanto, en algunas formas de realización, la potencia inhibidora (CI₅₀) de los nuevos anticuerpos de la presente divulgación estimada a partir de los ensayos de reportero basados en células para la medición de TGF β 1 de activación (tal como ensayos de células LN229 descritos en otra parte en el presente documento) puede ser 5 nM o menos, medida frente a cada uno de los complejos hLTBP1-proTGF β 1, hLTBP3-proTGF β 1, hGARP-proTGF β 1 y hLRRC33-proTGF β 1. En algunas formas de realización, los anticuerpos tienen un CI₅₀ de 2 nM o menos (es decir, ≤ 2 nM) medida contra cada una de las sociedades de responsabilidad limitada. En formas de realización preferidas, el CI₅₀ del anticuerpo medido contra cada uno de los complejos LLC es 1 nM o menos. En algunas formas de realización, el anticuerpo tiene una CI₅₀ de menos de 1 nM frente a cada uno de los complejos hLTBP1-proTGF β 1, hLTBP3-proTGF β 1, hGARP-proTGF β 1 y hLRRC33-proTGF β 1.

Tabla 11. Potencias inhibitoras (en CI₅₀) de seleccionar anticuerpos medidos por ensayos de células reporteras

Ref. Ab	CI ₅₀ (nM)			
	hLTBP1-proTGF β 1	hLTBP3-proTGF β 1	hGARP-proTGF β 1	hLRRC33-proTGF β 1
Ab3	24,29	10,42	0,981	0,8578
Ab4	5,222	5,647	0,8221	3,499
Ab5	1,288	1,004	0,14	0,6158
Ab6	2,741	0,8214	0,324	0,4953
Ab21	1,607	0,7647	0,4005	0,5958
Ab23	0,8353	0,8788	0,2639	0,5793
Ab25	6,081	0,538	0,4418	0,6529
Ab26	0,7131	0,7164	0,2619	0,3406
Ab29	0,4711	0,803	0,2637	0,458
Ab33	1,56	1,112	0,1981	0,7383
Ab11	2,954	1,562	0,7902	1,268
Ab12	3,794	1,555	1,077	2,434
Ab2	3,394	0,8673	0,7758	1,375

(Continuación)

Ref. Ab	CI ₅₀ (nM)			
	hLTBP1-proTGFβ1	hLTBP3-proTGFβ1	hGARP-proTGFβ1	hLRRC33-proTGFβ1
Ab19	1,656	1,599	1,34	0,4014
Ab20	1,851	1,184	0,3872	1,354
Ab35	6,246	2,707	3,715	5,37
Ab1	14,47	2,707	3,715	5,37

[0188] La activación de TGFβ1 puede desencadenarse mediante un mecanismo dependiente de la integrina o un mecanismo dependiente de la proteasa. Las actividades inhibitoras (p. ej., potencia) de los anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación pueden evaluarse para determinar la capacidad de bloquear la activación de TGFβ1 inducida por uno o ambos modos de activación. Los ensayos de células indicadoras descritos anteriormente están diseñados para medir la capacidad de los anticuerpos para bloquear o inhibir la activación dependiente de la integrina de la activación del TGFβ1. La potencia inhibitora también puede evaluarse midiendo la capacidad de los anticuerpos para bloquear la activación inducida por proteasa de TGFβ1. El ejemplo 3 de la presente divulgación proporciona formas de realización no limitantes de tales ensayos. Los resultados se resumen en las **FIGS. 5A y 5B**. Por consiguiente, el inhibidor de la isoforma selectivo de acuerdo con la presente descripción puede ser capaz de inhibir la activación dependiente de integrina de TGFβ1 y la activación de la proteasa dependiente de TGFβ1. Tal inhibidor puede ser utilizado para tratar una indicación relacionada con TGFβ1 caracteriza por desregulación de EDM que implica actividades de proteasa. Por ejemplo, tal indicación relacionada con TGFβ1 puede asociarse con miofibroblastos elevados, rigidez aumentada de la ECM, depósito de colágeno anormal o excesivo, o cualquier combinación de los mismos. Tales afecciones incluyen, por ejemplo, trastornos fibróticos y cáncer que comprende un tumor sólido (tal como carcinoma metastásico) o mielofibrosis.

[0189] En algunas formas de realización, la potencia puede ser evaluada en modelos in vivo adecuados como una medida de la eficacia y/o efectos farmacodinámicos. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es eficaz en un modelo in vivo a una cierta concentración, y el segundo anticuerpo es igualmente eficaz a una concentración más baja que el primero en el mismo modelo in vivo, entonces, se puede decir que el segundo anticuerpo es más potente que el primer anticuerpo. Puede usarse cualquier modelo de enfermedad adecuado conocido en la técnica para evaluar las potencias relativas de los inhibidores de TGFβ1, dependiendo de la indicación particular de interés, por ejemplo, modelos de cáncer y modelos de fibrosis. Preferiblemente, en tales estudios se incluyen múltiples dosis o concentraciones de cada anticuerpo de prueba.

[0190] Del mismo modo, efectos farmacodinámicos (P_D) pueden medirse para determinar potencias relativas de anticuerpos inhibidores. Las medidas de PD comúnmente utilizadas para la vía de señalización del TGFβ incluyen, sin limitación, la fosforilación de SMAD2/3 y la expresión de genes efectores posteriores, cuya transcripción es sensible a la activación del TGFβ, como los que tienen un elemento promotor que responde al TGFβ (p. ej., elementos de unión a Smad). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser capaces de bloquear completamente la fosforilación de SMAD2/3 inducida por enfermedad en modelos de fibrosis preclínicos cuando los animales se administran a una dosis de 3 mg/kg o menos. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser capaces de suprimir significativamente la expresión inducida por fibrosis de un panel de genes marcadores que incluyen Acta2, Col1 a1, Col3a1, Fn1, Itga11, Lox, Loxl2, cuando los animales se administran a una dosis de 10 mg/kg o menos en el modelo UUO de fibrosis renal.

[0191] En algunos casos, el proceso de selección de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso terapéutico puede, por tanto, incluir la identificación de un anticuerpo o fragmento que muestra la potencia inhibitora suficiente. Por ejemplo, el proceso de selección puede incluir un paso de llevar a cabo un ensayo de activación de TGFβ1 basado en células para medir la potencia (p. ej., CI₅₀) de uno o más anticuerpos de prueba o fragmentos de los mismos, y, la selección de un anticuerpo candidato o fragmento del mismo que muestra una potencia deseable. En algunos casos, CI₅₀ para cada uno de los LLC humanos 5 nM o menos. El anticuerpo seleccionado o el fragmento se puede usar luego en el tratamiento de una indicación relacionada con TGFβ1 descrita en el presente documento.

Regiones de unión

[0192] En el contexto de la presente descripción, "región(es) de unión" de un antígeno proporciona una base estructural para la interacción anticuerpo-antígeno. Como se usa en este documento, una "región de unión" se refiere a las áreas de interfaz entre el anticuerpo y el antígeno, de modo que, cuando se une al complejo proTGFβ1 ("antígeno") en una solución fisiológica, el anticuerpo o el fragmento protege la región de unión de la exposición al disolvente, según se determina mediante técnicas adecuadas, como la espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS). La identificación de las regiones de unión es útil para comprender mejor la interacción antígeno-anticuerpo y el mecanismo de acción del anticuerpo en particular. La identificación de adicionales anticuerpos con regiones de unión similares o superpuestas pueden facilitarse mediante experimentos de bloqueo cruzado que permiten la agrupación de epítomos. Opcionalmente, se puede emplear cristalografía de rayos X para identificar los residuos de aminoácidos exactos del epítomo que median las interacciones antígeno-anticuerpo.

[0193] La técnica está familiarizada con HDX-MS, que es una técnica ampliamente utilizada para explorar la conformación

de proteínas o interacciones proteína-proteína en solución. Este método se basa en el intercambio de hidrógenos en la amida de la cadena principal de la proteína con el deuterio presente en la solución. Al medir las tasas de intercambio de hidrógeno-deuterio, se puede obtener información sobre la dinámica y la conformación de las proteínas (revisado en: Wei et al. (2014) "Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications." Drug Disco Today. 19(1): 95-102). La aplicación de esta técnica se basa en la premisa de que cuando se forma un complejo anticuerpo-antígeno, la interfaz entre las parejas de unión puede ocluir el disolvente, reduciendo o previniendo así la tasa de intercambio debido a la exclusión estérica del disolvente.

[0194] La presente descripción incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen una LLC humana en una región ("región de unión") que comprende Lazo de Latencia o una porción del mismo. Lazo de Latencia es un módulo de proteínas dentro del prodominio. Se contempla que muchos inhibidores de activación potentes pueden unirse a esta región de un complejo de proTGFβ1 de tal manera que la unión del anticuerpo "bloqueará" el factor de crecimiento evitando así su liberación. Curiosamente, esta es la sección del complejo donde las regiones alargadas en forma de mariposa del factor de crecimiento (p. ej., correspondientes a, por ejemplo, Dedo-1 y Dedo-2) interactúan estrechamente con la estructura en forma de jaula del prodominio.

[0195] Como se representa en la **FIG. 21B**, Lazo de Latencia incluye las regiones etiquetadas como 2a y una parte de 2b, que son parte del prodominio. Tenga en cuenta que inmediatamente adyacente al Lazo de Latencia, la región etiquetada como 5a corresponde al llamado Dedo-1 dentro del dominio del factor de crecimiento, y la región etiquetada como 6b alrededor del lado opuesto, es parte del Dedo-2 dentro del dominio del factor de crecimiento. En base a esto, no es difícil prever que un anticuerpo que envuelve firmemente estas regiones podría prevenir eficazmente que el complejo proTGFβ1 se desacople, bloqueando así la activación.

[0196] Utilizando la técnica HDX-MS, regiones de unión de proTGFβ1 se pueden determinar. En algunas formas de realización, una porción de proTGFβ1 identificada como importante en la unión de un anticuerpo o fragmento incluye al menos una porción del prodominio y al menos una porción del dominio del factor de crecimiento. Son preferibles los anticuerpos o fragmentos que se unen a una primera región de unión ("Región 1" en la **FIG. 22A**) que comprenden al menos una porción de Lazo de Latencia. Más preferiblemente, dichos anticuerpos o fragmentos se unen además a una segunda región de unión ("Región 2" en la **FIG. 22A**) que comprende al menos una parte del dominio del factor de crecimiento en el Dedo-1 del dominio del factor de crecimiento. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden unirse además a una tercera región de unión ("Región 3" en la **FIG. 22A**) que comprende al menos una parte del Dedo-2 del dominio del factor de crecimiento.

[0197] Regiones adicionales dentro del proTGFβ1 también pueden contribuir directa o indirectamente a la interacción de alta afinidad de estos anticuerpos descritos en el presente documento. Las regiones que se consideran importantes para mediar en la unión de alta afinidad del anticuerpo al complejo proTGFβ1 (véase la **FIG. 21A**) pueden incluir, pero no se limitan a: LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159); LASPPSQGEVP (SEQ ID NO: 160); PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161); LALYNSTR (SEQ ID NO: 162); REAVPEPVL (SEQ ID NO: 163); YQKYSNNSWR (SEQ ID NO: 164); RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165); LGPCPYIWS (SEQ ID NO: 166); ALEPLPIV (SEQ ID NO: 167); y VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168) (basado en la secuencia nativa de proTGFβ1 humano).

[0198] Entre las regiones que pueden contribuir a la interacción anticuerpo-antígeno, en algunas formas de realización, el anticuerpo de alta afinidad de la presente descripción pueden unirse a un epítipo que comprende al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ("Región 1" de Ab6) (SEQ ID NO: 169).

[0199] En algunas formas de realización, el anticuerpo de alta afinidad de la presente descripción se puede unir un epítipo que comprende al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos RKDLGWKWIHEPKGYHANF ("Región 2" de Ab6) (SEQ ID NO: 165).

[0200] En algunas formas de realización, el anticuerpo de alta afinidad de la presente descripción se puede unir un epítipo que comprende al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos VGRKPKVEQL ("Región 3" de Ab6) (SEQ ID NO: 168).

[0201] En algunas formas de realización, el anticuerpo de alta afinidad de la presente descripción puede unirse a un epítipo que comprende al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ("Región 1" de Ab6) (SEQ ID NO: 169) y al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos RKDLGWKWIHEPKGYHANF ("Región 2" de Ab6) (SEQ ID NO: 165).

[0202] En algunas formas de realización, el anticuerpo de alta afinidad de la presente descripción puede unirse a un epítipo que comprende al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ("Región 1" de Ab6) (SEQ ID NO: 169) y al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos VGRKPKVEQL ("Región 3 de Ab6") (SEQ ID NO: 168).

[0203] En algunas formas de realización, el anticuerpo de alta afinidad de la presente descripción puede unirse a un epítipo que comprende al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ("Región 1" de Ab6) (SEQ ID NO: 169), al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos RKDLGWKWIHEPKGYHANF ("Región

2" de Ab6) (SEQ ID NO: 165), y, al menos un residuo de la secuencia de aminoácidos VGRKPKVEQL ("Región 3" de Ab6) (SEQ ID NO: 168).

[0204] Además de las contribuciones de las regiones 1, 2 y/o 3 de Ab6, tal epítipo puede incluir además al menos un residuo de aminoácido a partir de una secuencia seleccionada de entre el grupo que consta de: LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159); LASPPSQGEVP (SEQ ID NO: 160); PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161); LALYNSTR (SEQ ID NO: 162); REAVPEPVL (SEQ ID NO: 163); YQKYSNNSWR (SEQ ID NO: 164); RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165); LGPCPYIWS (SEQ ID NO: 166); ALEPLPIV (SEQ ID NO: 167); y VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168).

[0205] En particular, muchas de las regiones de unión identificadas en estudios estructurales utilizando múltiples anticuerpos TGFβ1 selectivos de isoformas (p. ej., Ab2, Ab3, AB5 y AB6) se encuentran para ser superpuestas, apuntando a ciertas regiones dentro del complejo proTGFβ1 que puede ser particularmente importante para mantener la latencia del complejo proTGFβ1. Por tanto, de manera ventajosa, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden seleccionarse al menos en parte sobre la base de su región o regiones de unión que incluyen las porciones superpuestas identificadas a través de múltiples inhibidores descritos en el presente documento. Estas porciones superpuestas de regiones de unión incluyen, por ejemplo, SPSPQGEVPPGGLPEAVL (SEQ ID NO: 201), WKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 202) y PGPLPEAVL (SEQ ID NO: 203). Por tanto, el inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad de acuerdo con la presente divulgación puede unirse a un complejo de proTGFβ1 (p. ej., LLC humanas) en un epítipo que comprende uno o más residuos de aminoácidos de SPSPQGEVPPGGLPEAVL (SEQ ID NO: 201), WKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 202) y/o PGPLPEAVL (SEQ ID NO: 203).

[0206] Por lo tanto, cualquiera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno abarcados por la presente divulgación, se pueden unir una o más de las regiones de unión identificadas en este documento. Dichos anticuerpos pueden usarse en el tratamiento de una indicación de TGFβ1 en un sujeto como se describe en el presente documento. Por consiguiente, la selección de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo adecuado para uso terapéutico de acuerdo con la presente divulgación puede incluir identificar o seleccionar un anticuerpo o un fragmento del mismo que se una a SPSPQGEVPPGGLPEAVL (SEQ ID NO: 201), WKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 202), PGPLPEAVL (SEQ ID NO: 203), o cualquier porción de los mismos.

[0207] Los ejemplos no limitantes de los dominios de proteínas o motivos de proTGFβ1 humana como se ha descrito previamente (documento WO 2014/182676) se incluyen en la Tabla 12.

Tabla 12. Selección dominios/motivos de la proteína de polipéptidos relacionados con TGFβ1 humano

Dominio/módulo de TGFβ1 humano	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Péptido asociado a latencia (LAP) (prodominio)	LSTCKTIDMELVKKRRIEAI R QGILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVLA LYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQS THSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSN NSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHC SCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHL QSSRHRR (<i>"Primera región de unión" para Ab6 está subrayada; "Primera región de unión" para Ab2 se muestra en negrita</i>)	146
Camisa de fuerza	LSTCKTIDMELVKKRRIEAI R QGILSKLRLASPPSQGEVPPGGLP (<i>"Lazo de Latencia" está subrayado</i>)	147
Dominio del factor de crecimiento	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYVGRK PKVEQLSNMIVRSCKCS (<i>"Dedo-1" y "Dedo-2" están subrayados, respectivamente</i>)	148
Cierre	residuos 74-76, YYA	n/a
Sitio de escisión de furina	RHRR	149
Brazo	EAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYD KFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELY QKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLE RAQHLQSSRHRR	150

(Continuación)

Dominio/módulo de TGFβ1 humano	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Dedo-1	CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC (<i>"Segunda región de unión" para Ab6 está subrayada; la porción superpuesta de las regiones de unión de Ab2 y Ab6 se muestra en negrita</i>)	151
Dedo-2	CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (<i>"Tercera región de unión" para Ab6 está subrayada</i>)	152
Residuo en cada monómero para presentar asociación de moléculas	Cys 4	n/A
Lazo de latencia	LASPPSQGEVPPGPL (La parte de las regiones de unión compartidas entre Ab2, Ab3, Ab5 y Ab6 está subrayada)	153
Lazo de latencia extendido	LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (La parte de las regiones de unión compartidas entre Ab2, Ab3, Ab5 y Ab6 está subrayada)	154
Hélice Alfa-1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLR	155
Hélice Alfa-2	AVLALYNSTR	156
Bucle de gatillo	NGFTTGRRGDLATIHGMNRP	157
Unión de integrina	residuo 215-217, RGD	n/A
Pajarita	CSCDSRDNTLQVD	158

Seguridad/toxicología

[0208] Se sabe que los inhibidores pan convencionales de TGFβ capaces de antagonizar múltiples isoformas causan una serie de toxicidades, que incluyen, por ejemplo, toxicidades cardiovasculares (lesiones cardíacas, más notablemente valvulopatía) notificadas en múltiples especies, incluyendo perros y ratas. Las toxicidades cardiovasculares conocidas asociadas con la inhibición de TGFβ incluyen hiperplasia en la válvula aórtica, válvula AV derecha y válvula AV izquierda; inflamación de la válvula aórtica, la válvula AV izquierda y la aorta ascendente; hemorragia en aorta ascendente, válvula aórtica y válvula AV izquierda; la degeneración del tejido conectivo en la aorta ascendente (véase, por ejemplo, Strauber et al (2014) "Nonclinical safety evaluation of a Transforming Growth Factor β receptor I kinase inhibitor in Fischer 344 rats and beagle dogs" J. Clin Pract 4 (3): 1000196). Consulte también la **FIG. 26A**.

[0209] Además, los anticuerpos neutralizantes que se unen las tres isoformas TGFβ (p. ej., inhibidores pan de TGFβ) se han asociado con ciertas toxicidades observadas epiteliales a través de múltiples especies, algunas de las cuales se resumen a continuación.

Tabla 13. Toxicidades epiteliales asociadas con inhibidores pan de TGFβ

	Ratones	Cyno	Humano
Toxicidades	- Hiperplasia e inflamación de lengua, encía y esófago. - Resultados no reversibles (recuperación a las 12 semanas)	- Hiperplasia de la encía, el epitelio nasal y la vejiga - La anemia provocó el cese del tratamiento - Los cambios fueron reversibles (excepto la vejiga)	- Sangrado gígil - Epistaxis - Dolor de cabeza - Fatiga - Varios trastornos de la piel, incluidos queratoacantomas (KA), hiperqueratosis, CCE cutáneo y carcinoma de células basales
Fármaco/ Dosis/ Duración	1D11 Dosificación: 50 mg/kg (3veces/semana) Duración: 9-12 semanas	GC1008 Dosificación: 10 y 50 mg/kg Duración: 6 meses	GC1008 Dosis: 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 15 mg/kg Duración: 4 dosis mensuales
Exposición	Concentración de suero = 1-2 mg/mL (durante 4-12 semanas)	No divulgado	Vida media: 21,7d DN Cmax ~ (350 ng/mL)mg

* Vitsky et. Al. Am. J Patología vol. 174, 2009; y Lonning et. al. Current Pharmaceutical Biotech, 2011

[0210] Sobre la base del reconocimiento anterior por parte del solicitante de la presente divulgación (véase

PCT/US2017/021972) que la falta de especificidad de isoforma de los antagonistas de TGF β convencionales puede ser la base de la fuente de toxicidades asociadas con la inhibición de TGF β , los presentes inventores buscaron lograr además una inhibición de TGF β 1 de amplio espectro para tratar diversas enfermedades que manifiestan una desregulación multifacética de TGF β 1, mientras que mantener el aspecto de seguridad/tolerabilidad de los inhibidores selectivos de isoformas.

[0211] En entorno clínico, el beneficio terapéutico se logra solamente cuando las concentraciones eficaces mínimas (MEC) de un medicamento (p. ej., anticuerpo monoclonal) están por debajo de las concentraciones tóxicas mínimas (MTC) de la droga. Esto no se logró con la mayoría, si no con todos, los inhibidores pan convencionales de TGF β , que de hecho parecían causar toxicidades limitantes de la dosis. El trabajo anterior del solicitante describía inhibidores selectivos de isoformas de TGF β 1 que mostraban un perfil de seguridad notablemente mejorado, en comparación con los inhibidores pan convencionales, tales como antagonistas de receptores de moléculas pequeñas y anticuerpos neutralizantes. El documento WO 2017/156500 divulgó un inhibidor selectivo de isoformas de la activación de TGF β 1, que, cuando se administró en una dosis de hasta 100 mg/kg por semana durante 4 semanas en ratas, no se observó toxicidad relacionada con el artículo de prueba, estableciendo el NOAEL para el anticuerpo como la dosis más alta ensayada, es decir, 100 mg/kg. El trabajo posterior del solicitante también mostró que un anticuerpo con función mejorada también mostraba perfiles de seguridad equivalentes. Aquí, uno de los objetivos era identificar anticuerpos con afinidades y potencias aún mayores, pero con al menos los mismos niveles de seguridad o equivalentes.

[0212] Los resultados de los estudios de toxicología en ratas de cuatro semanas se proporcionan en las **FIGS. 26B y 26C**. Se probaron dos inhibidores de TGF β 1 selectivos de isoformas (Ab3 y Ab6) en estudios separados, junto con un inhibidor de ALK5 de molécula pequeña y un anticuerpo neutralizante monoclonal como control. No se observaron toxicidades relacionadas con el artículo de prueba con ninguno de los anticuerpos selectivos de isoformas, mientras que los inhibidores no selectivos, como se esperaba, causaron una variedad de eventos adversos consistentes con los estudios publicados. Además, se demostró que el Ab6 es seguro (p. ej., sin efectos adversos observados) a un nivel de dosis tan alto como 300 mg/kg en monos cynomolgus cuando se administra semanalmente durante 4 semanas. Dado que se ha demostrado que Ab6 es eficaz en varios modelos in vivo a una dosis tan baja como 3 mg/kg (o menos en algunos casos), esto ofrece una ventana terapéutica de hasta 100 veces. Es importante destacar que esto demuestra que una alta potencia no tiene por qué significar un mayor riesgo de toxicidad. Sin desear estar ligado a una teoría particular, se contempla que la naturaleza altamente selectiva de los anticuerpos descritos en este documento probablemente explica los perfiles de seguridad logrados (p. ej., falta de toxicidades observadas).

[0213] Por lo tanto, en algunas formas de realización, el nuevo anticuerpo de acuerdo con la presente descripción tiene la dosis máxima tolerada (MTD) de >100 mg/kg cuando se dosifica a la semana durante al menos 4 semanas. En algunas formas de realización, el nuevo anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación tiene el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) de hasta 100 mg/kg cuando se dosifica semanalmente durante al menos 4 semanas. Los modelos animales adecuados para ser usados para realizar estudios de seguridad/toxicología para inhibidores de TGF β e inhibidores de TGF β 1 incluyen, pero no se limitan a: ratas, perros, cynos y ratones. En formas de realización preferidas, la cantidad mínima eficaz del anticuerpo basada en un estudio de eficacia preclínico adecuado está por debajo del NOAEL. Más preferiblemente, la cantidad mínima eficaz del anticuerpo es aproximadamente un tercio o menos del NOAEL. En formas de realización particularmente preferidas, la cantidad mínima eficaz del anticuerpo es aproximadamente un sexto o menos del NOAEL. En algunas formas de realización, la cantidad mínima eficaz del anticuerpo es aproximadamente una décima parte o menos del NOAEL.

[0214] En algunas formas de realización, la invención abarca un anticuerpo selectivo para isoformas capaz de inhibir TGF β 1 de señalización, que, cuando se administra a un sujeto, no causa efectos tóxicos epiteliales cardiovasculares o conocidos a una dosis eficaz para tratar una indicación relacionada con TGF β 1. En algunas formas de realización, el anticuerpo tiene una cantidad mínima eficaz de aproximadamente 3-10 mg/kg administrada semanalmente, quincenalmente o mensualmente. Preferiblemente, el anticuerpo no produce toxicidades mínimas a una dosis que es al menos seis veces la cantidad mínima eficaz (p. ej., una ventana terapéutica de seis veces). Más preferiblemente, el anticuerpo no produce toxicidades mínimas a una dosis que es al menos diez veces la cantidad mínima eficaz (p. ej., una ventana terapéutica diez veces mayor). Incluso más preferiblemente, el anticuerpo no provoca toxicidades mínimas a una dosis que es al menos quince veces la cantidad mínima eficaz (p. ej., una ventana terapéutica de quince veces).

Mecanismo de acción

[0215] Los anticuerpos de la presente invención que son útiles como agentes terapéuticos son anticuerpos inhibidores de TGF β 1. Además, los anticuerpos son inhibidores de la activación, es decir, los anticuerpos bloquean el paso de activación de TGF β 1, en lugar de perseguir directamente después de la liberación posterior del factor de crecimiento soluble, que es una especie transitoria.

[0216] En un sentido amplio, el término "inhibición de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo que antagoniza o neutraliza la función objetivo, por ejemplo, la actividad de factor de crecimiento. Ventajosamente, los anticuerpos inhibidores preferidos de la presente divulgación son capaces de inhibir la liberación del factor de crecimiento maduro a partir de un complejo latente, reduciendo así la señalización del factor de crecimiento. Los anticuerpos inhibidores incluyen anticuerpos dirigidos a cualquier epítipo que reduzca la liberación o la actividad del factor de crecimiento cuando se

asocia con tales anticuerpos. Tales epítomos pueden estar en los prodominios de proteínas TGF β (p. ej. TGF β 1), factores de crecimiento u otros epítomos que conducen a la reducción de factores de crecimiento s cuando se unen por el anticuerpo. Los anticuerpos inhibidores de la presente invención son anticuerpos inhibidores de TGF β 1. En algunas formas de realización, los anticuerpos inhibidores de la presente divulgación se unen al motivo proteico denominado Lazo de Latencia, para una parte del mismo.

[0217] Como se representa en las **FIGS. 21B y 22B**, el Lazo de Latencia es una parte del prodominio del complejo proTGF β 1 en estrecha proximidad a los motivos Dedo-1 y Dedo-2 del dominio del factor de crecimiento en la estructura tridimensional. El factor de crecimiento se mantiene dentro de la estructura prodominio similar a una jaula, hasta que la activación desencadena su liberación. El solicitante contempla que el Lazo de Latencia puede desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la conformación latente del complejo proTGF β 1. Los anticuerpos capaces de estabilizar esta interacción prodominio-factor de crecimiento pueden prevenir eficazmente la liberación del factor de crecimiento. Por tanto, en algunas formas de realización, los anticuerpos inhibidores de TGF β 1 de la presente divulgación se unen específicamente a un epítomo en la región de Lazo de Latencia del prodominio. En algunas formas de realización, dichos anticuerpos pueden unirse a un epítomo combinatorio, es decir, un epítomo formado por dos o más componentes/porciones de un antígeno o complejo de antígeno. Por ejemplo, un epítomo combinatorio puede formarse mediante contribuciones de múltiples porciones de una única proteína, es decir, residuos de aminoácidos de más de un segmento no contiguo de la misma proteína. Alternativamente, se puede formar un epítomo combinatorio mediante contribuciones de múltiples componentes proteicos de un complejo de antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a un epítomo combinatorio que incluye uno o más residuos de aminoácidos de Lazo de Latencia y adicionalmente uno o más residuos de aminoácidos del dominio del factor de crecimiento. En algunas formas de realización, los anticuerpos inhibidores de la presente divulgación se unen específicamente a un epítomo conformacional (o epítomo específico de conformación), por ejemplo, un epítomo que es sensible a la estructura tridimensional (es decir, conformación) de un antígeno o complejo de antígeno. El epítomo puede ser un epítomo conformacional de modo que el anticuerpo se una a un complejo de proTGF β 1 pero no se une a cada componente solo cuando no está asociado con los otros componentes del complejo. Por ejemplo, el anticuerpo puede no unirse a una forma libre de factor de crecimiento cuando no se encuentra en el complejo proTGF β 1. De manera similar, el anticuerpo puede no unirse solo a una estructura de prodominio "vacía".

[0218] Los enfoques tradicionales para antagonizar la señalización de TGF β han sido para i) neutralizar directamente el factor de crecimiento maduro después de que ya se ha convertido en activo con el fin de agotar ligandos libres (p. ej., liberado de su complejo precursor latente) que están disponibles para la unión al receptor; ii) emplear fragmentos de receptor solubles capaces de secuestrar ligandos libres (p. ej., las llamadas trampas de ligandos); o, iii) apuntar a su(s) receptor(es) de superficie celular para bloquear interacciones ligando-receptor. Cada uno de estos enfoques convencionales requiere que el antagonista compita contra contrapartes endógenas. Además, los dos primeros enfoques (i y ii) anteriores se dirigen al ligando activo, que es una especie transitoria. Por lo tanto, tal antagonista debe ser capaz de competir cinéticamente con el receptor endógeno durante la breve ventana temporal. El tercer enfoque puede proporcionar un efecto más duradero en comparación, pero inadvertidamente resulta en efectos inhibitorios no deseados (por lo tanto posibles toxicidades) debido a que muchos factores de crecimiento (p. ej., hasta ~20) señalan a través del (de los) mismo(s) receptor(es).

[0219] Para proporcionar soluciones a estos inconvenientes, y para permitir una mayor selectividad y acción localizada para mejorar la eficacia y la seguridad, el mecanismo de acción preferido subrayando los anticuerpos inhibidores, tales como los descritos en el presente documento actúa *corriente arriba* de activación de TGF β 1 e interacción de ligando-receptor. Por lo tanto, se contempla que los inhibidores específicos de isoforma de alta afinidad de TGF β 1 adecuados para llevar a cabo la presente invención deberían apuntar preferiblemente al complejo precursor TGF β 1 inactivo (p. ej., Latente) (p. ej., un complejo que comprende TGF β 1 pro/latente) antes de su activación, para bloquear el paso de activación en su origen (como en un microambiente de enfermedad, por ejemplo, TME). Dichos inhibidores están dirigidos a los complejos de TGF β 1 pro/latente asociados a ECM y anclados a la membrana, en lugar de ligandos libres que solo están disponibles transitoriamente para la unión al receptor una vez liberados. Por lo tanto, el hecho de dirigirse al complejo latente dentro del tejido antes de la activación proporciona una ventana más prolongada de participación de la diana en comparación con los anticuerpos neutralizantes que se requieren para secuestrar una diana de corta duración.

[0220] Las ventajas de dirigirse localmente al complejo unido a tejido/célula en la fuente, en contraposición a las especies activas solubles (es decir, factores de crecimiento maduros después de ser liberados de la fuente), están respaldadas además por un estudio reciente. Ishihara et al. (Sci. Transl. Med. 11, eaau3259 (2019) "Targeted antibody and cytokine cancer immunotherapies through collagen affinity") informó que cuando los medicamentos administrados sistémicamente se dirigen a los sitios del tumor mediante la conjugación con un resto de unión al colágeno, pueden mejorar la inmunidad antitumoral y reducir las toxicidades relacionadas con el tratamiento, en comparación con sus contrapartes no dirigidas.

[0221] El mecanismo de acción logrado por los anticuerpos de la presente divulgación puede contribuir aún más a una mayor durabilidad de efecto, así como la potencia global superior y seguridad.

[0222] De manera interesante, estos anticuerpos pueden ejercer actividades inhibitorias adicionales hacia TGF β 1 asociado a células (LRRC33-proTGF β 1 y GARP-proTGF β 1). El solicitante ha descubierto que los anticuerpos que se unen a LRRC33 tienden a internalizarse al unirse al LRRC33 de la superficie celular. No está claro si la internalización

es inducida activamente por la unión de anticuerpos (p. ej., participación de la diana) o, alternativamente, si este fenómeno es el resultado de actividades endocíticas naturales (p. ej., pasivas) de los macrófagos, por ejemplo. Sin embargo, el inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad, Ab6, es capaz de internalizarse rápidamente en células transfectadas con LRRC33 y proTGFβ1, y la tasa de internalización lograda con Ab6 es significativamente mayor que con un anticuerpo de referencia que reconoce LRRC33 de superficie celular (FIG. 6). Se obtienen resultados similares a partir de macrófagos humanos primarios. Estas observaciones plantean la posibilidad de que Ab6 pueda inducir la internalización al unirse a su objetivo, LRRC33-proTGFβ1, eliminando así los complejos que contienen LRRC33 de la superficie celular. En los loci de la enfermedad, esto puede reducir la disponibilidad de niveles latentes activables de LRRC33-proTGFβ1. Por lo tanto, los inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas pueden inhibir el brazo LRRC33 de TGFβ1 mediante mecanismos de acción duales: i) bloquear la liberación del factor de crecimiento maduro del complejo latente; y ii) eliminar los complejos LRRC33-proTGFβ1 de la superficie celular mediante internalización. Es posible que se puedan aplicar mecanismos inhibidores de acción similares a GARP-proTGFβ1.

Complejos antigénicos y componentes de los mismos

[0223] Los nuevos anticuerpos de la presente divulgación se unen específicamente a cada uno de los cuatro complejos de latencia grandes humanos conocidos (p. ej., hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 y hLRRC33-proTGFβ1) y selectivamente inhibe TGFβ1.

[0224] El proceso de selección (p. ej., la identificación y selección) de tales anticuerpos implica el uso de complejos antígeno adecuados. Normalmente, se utilizan preparaciones purificadas producidas de forma recombinante (véase, por ejemplo, WO 2014/182676). Sin embargo, en algunas situaciones, las preparaciones no purificadas se pueden usar como fuente de antígenos, como las células que expresan los complejos proTGFβ1 de interés (p. ej., antígeno celular), o sustratos (p. ej., matrices, armazones) incrustados con o incorporando complejos de interés de proTGFβ1 asociados a EMC.

[0225] Se proporcionan componentes de las proteínas útiles que pueden formar tales complejos de antígeno, incluyendo isoformas de TGFβ y polipéptidos relacionados, fragmentos y variantes, moléculas presentadoras (p. ej., LTBP, GARP, LRRC33) y polipéptidos, fragmentos y variantes relacionados. Estos componentes se pueden expresar, purificar y permitir que formen un complejo de proteínas (como grandes complejos latentes), que se pueden utilizar en el proceso de selección de anticuerpos. El cribado puede incluir selección positiva, en donde los aglutinantes deseables se seleccionan de un grupo o biblioteca de aglutinantes y no aglutinantes, y selección negativa, en donde los aglutinantes indeseables se eliminan del grupo. Normalmente, al menos un complejo asociado a la matriz (p. ej., LTBP1-proTGFβ1 y/o LTBP1-proTGFβ1) y al menos un complejo asociado a la célula (p. ej., GARP-proTGFβ1 y/o LRRC33-proTGFβ1) se incluyen para un cribado positivo a fin de garantizar que los aglutinantes que se seleccionan tienen afinidades para ambos contextos biológicos.

[0226] En algunas formas de realización, el TGFβ1 comprende un mamífero de origen natural de secuencia de aminoácidos. En alguna forma de realización, el TGFβ1 comprende una secuencia de aminoácidos humana de origen natural. En algunas formas de realización, el TGFβ1 comprende una secuencia de aminoácidos de ser humano, mono, rata o ratón. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento, no se une específicamente al TGFβ2. En algunas formas de realización, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento, no se une específicamente al TGFβ3. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se describe en el presente documento no se une específicamente a TGFβ2 o TGFβ3. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, descritos en este documento se une específicamente a un TGFβ1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 34. Las secuencias de aminoácidos de TGFβ2 y la secuencia de aminoácidos de TGFβ3 se establecen en SEQ ID NO: 38 y 32, respectivamente. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento se une específicamente a un TGFβ1 que comprende una secuencia de aminoácidos no natural (también denominada en este documento como TGFβ1 no natural). Por ejemplo, un TGFβ1 de origen no natural puede comprender una o más mutaciones generadas de forma recombinante con respecto a una secuencia de aminoácidos de TGFβ1 de origen natural. En algunas formas de realización, una secuencia de aminoácidos de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 24-35, como se muestra en la Tabla 14. En algunas formas de realización, un TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 de secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NOs: 36-43, como se muestra en la Tabla 15.

[0227] Polipéptido de TGFβ1 (prodominio + factor de crecimiento de dominio)

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKRLASPPSQGEVPPGPLEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEV
TRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLRLKLKVEQHVLYQKYSNNSWRYLSNRL
APSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLMATP
LERAQHLQSSRRHRLDNTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL
LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 24)

[0228] Polipéptido TGFβ2 (prodominio + dominio del factor de crecimiento)

SLSTCSTLMDQFMKRKIEAIRGQILSKLKLTPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEASRRAAACERERSDEEY
YAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRFRVFDVSAMEKNASNLVKAEFRVRLQNPKEQRIELYQILKSKDLT
SPTQRYIDSKVVKTRAEGEWSFDVTDVHVEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTS
TYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLMLPSYRLSSQQTNRKKRALDAAYCFRNVDNCCRLPLYIDFRDLGWKWI
HEPKGYANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSTYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS
(SEQ ID NO: 28)

[0229] Polipéptido TGFβ3 (prodominio + dominio del factor de crecimiento)

SLSLSTCTLDLFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTSE
YYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRPNPSSKRNEQRIELFQILRPDE
HIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFGVDNED
DHGRGDLGRLLKKQKDHHPHLLMMIPPHRLDNPQGQGRKKRALDNTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRDLGWKWI
VHEPKGYANFCGPGPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASAPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSKCS
(SEQ ID NO: 32)

Tabla 14. Secuencias de aminoácidos de ejemplo TGFβ1, TGFβ2, y TGFβ3

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKKRKEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDNTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAPCCVPQALEPLPIVYVVG RKPKVEQLSNMIVRSCKCS	24
proTGFβ1 C4S	LSTCKTIDMELVKKRKEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDNTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAPCCVPQALEPLPIVYVVG RKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25
proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKKRKEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDNTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAPCCVPQALEPLPIVYVVG KPKVEQLSNMIVRSCKCS	26
proTGFβ1 C4S D2G	LSTCKTIDMELVKKRKEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVLAL YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQST HSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDNTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAPCCVPQALEPLPIVYVVG KPKVEQLSNMIVRSCKCS	27

(Continuación)

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
proTGFβ2	SLSTCSTLMDQFMKRKRIEAI RGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFR LQNP KARPVEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLH HKDRN LGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTS GDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLPSYRLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANF CAGACPYLWSSDTQH SRVL SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	28
proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLMDQFMKRKRIEAI RGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFR LQNP KARPVEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLH HKDRN LGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTS GDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLPSYRLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANF CAGACPYLWSSDTQH SRVL SLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	29
proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLMDQFMKRKRIEAI RGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFR LQNP KARPVEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLH HKDRN LGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTS GDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLPSYRLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVQDN CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANF CAGACPYLWSSDTQH SRVLS LYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	30
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLMDQFMKRKRIEAI RGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISI YNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIP PTFYRPFYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFR LQNP KARPVEQRIEL YQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTD AVHEWLH HKDRN LGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTS GDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLPSYRLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVQDN CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYANF CAGACPYLWSSDTQH SRVLS LYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS	31
proTGFβ3	SLSLSTCTTLD FGHKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRV PNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGR LK KQKDHNNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCC VRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANF CSGPCPYLRSADTTHTSTVLGL YNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSKCS	32
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLD FGHKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRV PNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGR LK KQKDHNNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCC VRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANF CSGPCPYLRSADTTHTSTVLGL YNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSKCS	33
proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLD FGHKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRV PNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGR LK KQKDHNNPHLILMMIPPHRLDNP GQGGQRK GALDTNYCFRNLEENCCV RPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANF CSGPCPYLRSADTTHTSTVLGLY NTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSKCS	34

(Continuación)

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLA LYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNEL AVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESN LGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRK KQKDHNNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCV RPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLY NTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYVGRTPKVEQLSNMVKSKCS	35

Tabla 15. Ejemplos de secuencias de aminoácidos no humanos

Polipéptido	Especies	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
proTGFβ1	Ratón	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSKCDKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMATP LERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASASPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	36
proTGFβ1	Cyno	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLRLKLVQEHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSKCDKDNLTQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCV PQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	37
TGFβ1 LAP C4S	Ratón	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSKCDKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMATP LERAQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLRLKLVQEHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSKCDKDNLTQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRR	39
proTGFβ1 C4S D2G	Ratón	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSKCDKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNMRPFLLMATP LERAQHLHSSRHGALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASASPCCV PQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	40

(Continuación)

Polipéptido	Especies	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
proTGFβ1 C4S	Ratón	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVL ALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKT KDISHSIYMFNTSDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQ KYSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGF RFSAHCSKCDKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDNRPFLLLMATP LERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASASPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	41
proTGFβ1 C4S	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSKDNLTQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCV PQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	42
proTGFβ1 C4S D2G	Cyno	LSTSKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGGLPEAVL ALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK QSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFR LSAHCSCDSKDNLTQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIH EPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVP QALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	43
LTBP3	CYNO	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGS NMTLIGENGHSTDLTGSGFRVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPP DFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRAGALSTGALPPLAPEGDS VASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPP PVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPP TQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKC HKCPQLQYTGVCQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAM PGVCRHGDCLNPNPGSYRCVCPGHSGLGPSRTQCIADKPEEKSLCF RLVSPEHQQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAF KEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPPQQLPESPS QAPPPEDTEEERGVTDDSPVSEERSVQQSHPTATTSPARPYPELIS RPSPTMRWFLPDLPSPRSASVEIAPTQVTEDECRLNQNICGHGEC VPGPPDYSCHCNPGYRSHPHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMN TGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINF PGHYKCNCYPGYRLKASRPVCEIDECRDPSSCPDGKCKENKPGS FKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRC TCAQGYAPAPDGRSCVDVDECEAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLS GYHLSRDRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHLRV GGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYVCVDEGFTPTQDQ HGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQCECCSLGAG WGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDE CMLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYDGNLLECVDVDECL DESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPPEMDVDE CQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAE RAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGA QCRPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLLKGPRRDEDSSEED SDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELN QRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	44

(Continuación)

Polipéptido	Especies	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
LTBP3	Ratón	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGS NMTLIGENGHSTDILTGSAFRVVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPP DFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPGGLARTGAMSTGPLPLAPEGES VASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPP PVVNVRVHHPPEASVQVHRIEGPNAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPP TQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKC HKCPQLQYTGVQKPVVVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAM PGNVCHGDCLNPNPGSYRCVCPGHSGLGPLAAQCIADKPEEKSLCFR LVSTEHCQCHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTAAFK EICPGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPPQQLPESPSRAP PLEDTEEERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPRPYPELISRPSP PTFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGQCVPGPS DYSCHCNAGYRSHPHRYCVDVNECEAEPCGPGKGICMNTGGSY NCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYK CNCYPGYRLKASRPPICEDIDECRDPSTCPDGKCNKPGSFKCIAC QPGYRSQGGGACRDVNECSEGTPCSPGWCENLPGSYRCTCAQYE PAQDGLSCIDVDECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDR SRCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRLVGGRKCKKDI DECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCVCDEGFTLTQDQHGCEEVEQP HHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYP CPVYSSAEFHSLVPDGKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILFGAEICK EGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCNRNGVC ENTRGGYRCACTPPAEYSPAQAQCLIPERWSTPQRDVKAGASEE RTACVWGPWAGPALTDDCCCRQPRLTQCRPCPPRGTGSQCPT SQSESNSFWDTSPLLLKGSPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPG GAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSG SFRCVCKAGFTRSRPHGPACLSAAADDAAIAHTSVIDHRGYFH	45

(Continuación)

Polipéptido	Especies	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
LTBP1S	Cyno	NHTGRIKVVFTSPICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHAADTLT ATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLCQIPVHGASV PKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIH VKHPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPQQSQVSYQGLPVQKTQ TIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQE DCCGTVGTSWGFNKCQKCPKPSYHGYNQMMCECLPGYKRVNNTF CQDINECQLQGVCNPGCECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDP PVISEEGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHC EKCPLPGTAAAFKEICPGMGYTVSGVHRRRPIHHHVKGKPVFVKPK NTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPVGAEPVATAPPEK EIPSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFPVIEKTSPPVPVEVAP EASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEG YKFSEQQRKCDIDECTQVQHLCSSQRCENTEGSFLCICPAGFMAS EEGTNCIDVDECLRPDVCGEHGCNVTGAFRCEYCDSGYRMTQRG RCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDV DECLPNVCTNGDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHKCDIDECQ QGNLCVNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHL CAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEIDINECLEDKSVCQR GDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCDINECEHPGLCGPQGECL NTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCNTAG SFRCLCYQGFQAPQDGGQGVNNECELLSGVCGEAFCEVVEGSFL CVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVEQPKEEKCEYNNLNDAS LCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTMCPK GKGFVPAGESSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYE CYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCT HPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPL VGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTGRR QPYGRDALVDFSEQYAPADPYFIQDRFLNSFEELQAECEGILNGCE NGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDATAKMTCDVDNECDELNNRMSLCK NAKCINTEGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE	46

(Continuación)

Polipéptido	Especies	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
LTBP1S	ratón	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTLISENGHAADTL TATNFRVVICHLPCLMNGGQCSSRDCKCQCPNFTGKLCQIPVLGASM PKLYQHAQQQKALGSHVIHSTHTLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIH VKHPPEASVQIHQVSRIDSPGGQKVKEAQPQGSQVSYQGLPVQKT QTVHSTYSHQQLIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSK QEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRVN NTFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCSCKMFGFPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTKQICCCSVGKAWG PHCEKCPPLPGTAAFKCICPGGMGYTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYV KPKNTQPAKSTHPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRAEPEVVTAP PEKEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVVEKTSPPVP VEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTC ICYEGYKFSEQLRKCVDIDECAQVRHLCSQGRCENTEGSFLCVCPA GFMASEEGTNCIDVDECLRPDMCRDGRGRCINTAGAFRCYCDSGYR MSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQCVNTPGSYQCVPTTEGFRGWNG QCLDVDECLQPKVCTNGSCTNLEGSYMCSCHRGYSPTPDHRHCQ DIDECQQGNLCMNGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDE CEHHHLCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDHCEINEDLED SSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLNDNKGCDINECAQPGLCG SHGECLNTQGSFHCVCCEQGFSSISADGRTECIDEVNNTVCDSHGF CDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDQGGCVDVNECELLSGVCGEAFCE NVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSGVDVRQPREKKEC YYNLNDASLCDNVLPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVQGT AEFTMCPRGKGLVPAGESSYDTGGENYKDADECLLFGEIICKNGY CLNTQPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPNSCIDGQCVENT EGSYNCFCTHPMVLDASEKRCVQPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLS EEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQL CNIPVTGRRRPPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRFLNSFEELQAE ECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDMAKMTCDVDNECSE LNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLD KESDLE	47
GARP	ratón	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLQSI LVSPGLGYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLAT GMALNSGGLGRLPLLVSLLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLAE NSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMIEDGAFAELPHLTHLNS RNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWDLRE NKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSA SPLSNPSRNASTHPLSLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLNLS RNCLRSFEARQVDSLPCVLVLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLQLQ DNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFS GIPTLHVLNMGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALV GLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPWATR AVSLEVLDLRNNSFSLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGW LAAQLHQGRVDVATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGGLKNV NLILLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQQYKA	48

(Continuación)

Polipéptido	Especies	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
sGARP	ratón	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLQSI LVSPPLGFYALRHLDSLNDQISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLAT GMALNSGGLGRLPLLVSLLDLSGNSLHGNI LVERLLGETPRLRRLSLAE NSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMIEDGA FEALPHLTHLNLS RNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWLDLRE NKLHFPDLAVFPRLIYNVSNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSA SPLSNPSRNASTHPLSQLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTSLRFLNLS RNCLRSFEARQVDSLPCVLVLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLQLQ DNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFS GIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATGALV GLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAENQLSHLPWTR AVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGW LAAQLHQGRVDVATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNV N	49

[0230] En algunas formas de realización, los complejos de proteínas antigénicas (p. ej., un complejo de LTBP-TGFβ1) pueden comprender una o más moléculas presentadoras, tales como proteínas LTBP (p. ej., LTBP1, LTBP2, LTBP3 y LTBP4), proteínas GARP, proteínas LRRC33, o fragmentos de las mismas. Normalmente, un fragmento mínimo requerido adecuado para llevar a cabo el proceso de selección incluye al menos 50 aminoácidos, preferiblemente al menos 100 aminoácidos, de una proteína de molécula presentadora, que comprende al menos dos residuos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro con un complejo proTGFβ1 para formar un complejo latente grande (LLC). Específicamente, estos residuos de Cys forman enlaces covalentes con las residencias de cisteína presentes cerca del extremo N de cada monómero del complejo proTGFβ1. En la estructura tridimensional de un complejo dímero de proTGFβ1, la llamada "Hélice Alfa-1" N-terminal de cada monómero se encuentra muy próxima entre sí (ver, por ejemplo, la **FIG. 21B**, las dos hélices cerca de la parte inferior de la estructura en gris), estableciendo la distancia entre los dos residuos de cisteína (uno de cada hélice) requerida para formar enlaces covalentes productivos con un par correspondiente de cisteínas presentes en una molécula presentadora (ver, por ejemplo, Cuende et al. (2015) Sci. Trans. Med. 7:284ra56). Por lo tanto, cuando se usa un fragmento de una molécula presentadora para formar un LLC en el proceso de selección (p. ej., inmunización, selección de bibliotecas, identificación y selección), dicho fragmento debe incluir los residuos de cisteína separados por la distancia correcta, lo que permitirá la formación de enlaces disulfuro adecuados con un complejo proTGFβ1 con el fin de preservar la conformación correcta del LLC resultante. LTBPs (p. ej., LTBP1, LTBP3 y LTBP4), por ejemplo, contienen "dominios ricos en cisteína" para mediar interacciones covalentes con proTGFβ1.

[0231] Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, es capaz de unirse a un complejo de LTBP1-TGFβ1. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 es una proteína de origen natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 es una proteína no natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 es una proteína recombinante. Tal proteína LTBP1 recombinante puede comprender LTBP1, variantes empalmadas alternativamente de la misma y/o fragmentos de la misma. Las proteínas LTBP1 recombinantes también se pueden modificar para que comprendan uno o más marcadores detectables. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 comprende una secuencia líder (p. ej., una secuencia líder nativa o no nativa). En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 no comprende una secuencia líder (es decir, la secuencia líder se ha procesado o escindido). Dichos marcadores detectables pueden incluir, entre otros, marcadores de biotina, marcadores de polihistidina, marcadores myc, marcadores HA y/o marcadores fluorescentes. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 es una proteína LTBP1 de mamífero. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 es una proteína LTBP1 de ser humano, mono, ratón o rata. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 46 y 47 en la Tabla 15. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 50 en la Tabla 17.

[0232] Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, es capaz de unirse a un complejo de LTBP3-TGFβ1. En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 es una proteína de origen natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 es una proteína no natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 es una proteína recombinante. Tal proteína LTBP3 recombinante puede comprender LTBP3, variantes empalmadas alternativamente de la misma y/o fragmentos de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 comprende una secuencia líder (p. ej., una secuencia líder nativa o no nativa). En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 no comprende una secuencia líder (es decir, la secuencia líder se ha procesado o escindido). Las proteínas LTBP3 recombinantes también se pueden modificar para que comprendan uno o más marcadores detectables. Dichos marcadores detectables pueden incluir, entre otros, marcadores de biotina, marcadores de polihistidina, marcadores myc, marcadores HA y/o marcadores fluorescentes. En algunas

formas de realización, la proteína LTBP3 es una proteína LTBP3 de mamífero. En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 es una proteína LTBP3 humana, de mono, de ratón o de rata. En algunas formas de realización, la proteína LTBP3 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 44 y 45 en la Tabla 15. En algunas formas de realización, la proteína LTBP1 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 51 en la Tabla 17.

[0233] Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, es capaz de unirse a un complejo de GARP-TGFβ1. En algunas formas de realización, la proteína GARP es una proteína de origen natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína GARP es una proteína recombinante. Tal GARP puede ser recombinante, denominado en el presente documento GARP recombinante. Algunas GARP recombinantes pueden comprender una o más modificaciones, truncamientos y/o mutaciones en comparación con GARP de tipo salvaje. Los GARP recombinantes pueden modificarse para que sean solubles. En algunas formas de realización, la proteína GARP comprende una secuencia líder (p. ej., una secuencia líder nativa o no nativa). En algunas formas de realización, la proteína GARP no comprende una secuencia líder (es decir, la secuencia líder se ha procesado o escindido). En otras formas de realización, los GARP recombinantes se modifican para comprender uno o más marcadores detectables. En formas de realización adicionales, tales etiquetas detectables pueden incluir, pero no se limitan a etiquetas de biotina, etiquetas de polihistidina, etiquetas de bandera, etiquetas myc, etiquetas HA y/o etiquetas fluorescentes. En algunas formas de realización, la proteína GARP es una proteína GARP de mamífero. En algunas formas de realización, la proteína GARP es una proteína GARP de ser humano, mono, ratón o rata. En algunas formas de realización, la proteína GARP comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 48-49 en la Tabla 15. En algunas formas de realización, la proteína GARP comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 52 y 53 en la Tabla 18. En algunas formas de realización, los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, descritos en este documento no se unen a TGFβ1 de una manera dependiente del contexto, por ejemplo, la unión a TGFβ1 solo ocurriría cuando la molécula de TGFβ1 fuera complejada con una molécula presentadora específica, como GARP. En cambio, los anticuerpos, y las porciones de unión a antígeno de los mismos, se unen al TGFβ1 de una manera independiente del contexto. En otras palabras, los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se unen al TGFβ1 cuando se unen a cualquier molécula presentadora: GARP, LTBP1, LTBP3 y/o LRRC33.

[0234] Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, es capaz de unirse a un complejo de LRRC33-TGFβ1. En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 es una proteína de origen natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 es una proteína de origen no natural o un fragmento de la misma. En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 es una proteína recombinante. Tal LRRC33 puede ser recombinante, denominado en el presente documento LRRC33 recombinante. Algunas proteínas LRRC33 recombinantes pueden comprender una o más modificaciones, truncamientos y/o mutaciones en comparación con LRRC33 de tipo salvaje. Las proteínas LRRC33 recombinantes pueden modificarse para que sean solubles. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el ectodominio de LRRC33 puede expresarse con una etiqueta His C-terminal para expresar la proteína LRRC33 soluble (sLRRC33; ver, por ejemplo, SEQ ID NO: 84). En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 comprende una secuencia líder (p. ej., una secuencia líder nativa o no nativa). En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 no comprende una secuencia líder (es decir, la secuencia líder se ha procesado o escindido). En otras formas de realización, las proteínas LRRC33 recombinantes se modifican para comprender uno o más marcadores detectables. En formas de realización adicionales, tales etiquetas detectables pueden incluir, pero no se limitan a etiquetas de biotina, etiquetas de polihistidina, etiquetas de bandera, etiquetas myc, etiquetas HA y/o etiquetas fluorescentes. En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 es una proteína LRRC33 de mamífero. En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 es una proteína LRRC33 de ser humano, mono, ratón o rata. En algunas formas de realización, la proteína LRRC33 comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 83, 84 y 101 en la Tabla 18.

Tabla 17. Secuencias de aminoácidos de LTBP ejemplares

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISENGHAADTLT ATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPNFTGKLCQIPVHGASVP KLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPQSQVSYQGLPVQKTQTIH STYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCC GTVGTSWGFNKCQKCPKPSYHGYNQMMMECLPGYKRVNNTFCQDI NECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISE EKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCP PGTAAFKEICPGMGYTVSGVHRRRPIHHHVKGKPVFVKPKNTQPV AKSTHPPPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPSLDQ EKTKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFPVIEKTSPPVPVEVAPEASTSSA SQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYRFSEQQ RKCVDIDECTQVQHLCSSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCID VDECLRPDVCGEHCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDEC NPSTCPDEQCVNSPGSYQCVCTEGFRGWNGQCLDVDECLPNVC ANGDCSNLEGSYMCCHKGYTRTPDHKHC RDIDECQQGNLCVNGQ CKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNT EGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEINEDKSVQCQRGDCINTAGSY DCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQ QGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGQFQ APQDGGQGVNECELLSGVCGEAFCEVNEGSFLCVCADENQEYSP MTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKKEKKECYNLNDASLCDNVLAPNVT KQECCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTMCPKGKGFVPAGESS SEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDP VKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRC IRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCL YGEAWGMQCALCPLKSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQ YTPEADPYFIQDRFLNSFEELQAECEGILNGCENGRCVRVQEGYTCD CFDGYHLD TAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTDGSYKCLCL PGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE	50

(Continuación)

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCRDSCQQGS NMTLIGENGHSTDLTGSGFRVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPD FTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLSRTGALSTGALPPLAPEGDSVA SKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVV NVRVHHPEASVQVHRIESSNAESAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKP LGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQ LQYTGVCQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCR HGDCLNPPGSYRCVCPGHSGLGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEH QCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPDGTAAAFKEICPAGK GYHILTSHTLTIQGESDFSLFLHPDGPCKPQQLPESPSQAPPPEDTE EERGVTDDSPVSEERSVQQSHPTATTTTPARPYELISRPSPTMRWF LPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGPPDYSCHC NPGYRSHQHRVCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGGSYNCHCNRG YRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFGHYKCNCYPGYR LKASRPPVCEDIDECRDPSSCPDGKCNKPGSFKCIACQPGYRSQG GGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSC LDVDECEAGDVCDNGICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDE CDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDIDECSDPSL CLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYL NFDDTVFCDSVLATNVTQCECCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEF HSLCPDGKGYTDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQ PGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCNRNGVCENTRGGYR CACTPPAEYSPAQRQCLSPPEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSY RCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERDVCWSQRGEDGMC AGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSES NSFWDTSPLLLGPPEDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCEC PGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCK AGFARSRPHGACVPQRRR	51

Tabla 18. Ejemplos de secuencias de aminoácidos GARP y LRRC33

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILA SPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALS AGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTR HTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGPLRLTHLNLNRNSLTCISDFS LQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWDLRENKLLHFPDLAALP RLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLS QLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLM LLDLSHNALETLELGARALGSLRLLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLN LQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFGSITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFH TPLTELDLSSNPGLVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPFCIC LKRLNLAENRSLHLPWATQAVSLEVLDRNNSFSLPGSAMGGLETSLR RLYLQGNPLSCCGNGWLAQLHQGRVDVDTQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGGKLNINLIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA	52
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILA SPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALS AGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTR HTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGPLRLTHLNLNRNSLTCISDFS LQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWDLRENKLLHFPDLAALP RLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLS QLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLM LLDLSHNALETLELGARALGSLRLLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLN LQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFGSITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFH TPLTELDLSSNPGLVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPFCIC LKRLNLAENRSLHLPWATQAVSLEVLDRNNSFSLPGSAMGGLETSLR RLYLQGNPLSCCGNGWLAQLHQGRVDVDTQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGGKLNIN	53
LRRC33 (también conocido como NRROS; número de acceso Uniprot Q86YC ₃)	MELLPLWLCGLGFHFLTVGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAADCRGQ SLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERI SRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNAL TEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYI FEIEGGAFFDGLAELRHLNLAFFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLA TGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYRDLYN TSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDADLRFLDMSQNQF QYLPDGFRLKMPSLSHLNHLQNCMLTHIREHEPPGALTELDLSHNQLS ELHLAPGLASCLGSLRLFNLSNQLLGVPPLGFANARNITTLDMSHNQIS LCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMAASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSL TYLDLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALDFSGF GNLRDLDSGNCLTTFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSR GLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKIIIRVTE LPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVILPSCLTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIK SRCHWSSVY *	83
LRRC33 soluble (sLRRC33)	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSC HLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLS GNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQ RNYIFEIEGGAFFDGLAELRHLNLAFFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLE WFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYR DLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDADLRFLDMSQ NQFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLQNCMLTHIREHEPPGALTELDLSHN QLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSNQLLGVPPLGFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMAASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQ GTSLTYLDSLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALD FSGFGNLRDLDSGNCLTTFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSE QLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGLHHHHHH *	84

El péptido señal nativo está representado en negrita.

El péptido señal de la cadena ligera kappa humana modificado se representa en negrita.** La etiqueta de histidina está subrayada.

(Continuación)

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
LRRC33 soluble (sLRRC33)	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSC HLERISRGAFQEQQHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDLDS GNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQ RNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLA FNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLE WFLATGGEEAAFELETDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYR DLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQ NQFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLQNCMLTHIREHEPPGALTELDLSHN QLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSNQLLGVPGLFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMA SLRSLSLEGCGLGALPDCPFQ GTSLT YLDLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALD FSGFGNLRDLDSGNCLTTFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSE QLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGGQTVDWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGLHHHHHH * El péptido señal de la cadena ligera kappa humana modificado se representa en negrita. ** La etiqueta de histidina está subrayada.	84
Quimera humana LRRC33-GARP	MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQGVCKLVGGAAD CRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSC HLERISRGAFQEQQHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRDLDS GNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQ RNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLA FNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLE WFLATGGEEAAFELETDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYR DLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQ NQFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLQNCMLTHIREHEPPGALTELDLSHN QLSELHLAPGLASCLGSLRFLNLSNQLLGVPGLFANARNITTLDMSH NQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMA SLRSLSLEGCGLGALPDCPFQ GTSLT YLDLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALD FSGFGNLRDLDSGNCLTTFPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSE QLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGGQTVDWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKEN QQYKA * El péptido señal de la cadena ligera kappa humana modificado se representa en negrita. ** El ectodominio LRRC33 está subrayado. # El dominio transmembrana GARP está en cursiva. ## La cola intracelular GARP está doblemente subrayada.	101

Varias Modificaciones y Variaciones de Anticuerpos

[0235] Las variaciones, modificaciones y características no limitantes de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos abarcados por la presente divulgación se discuten brevemente a continuación. También se proporcionan formas de realización de métodos analíticos relacionados.

[0236] Las unidades estructurales de anticuerpos de origen natural comprenden típicamente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" de longitud completa (en ciertas formas de realización, aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (en ciertas formas de realización, aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye típicamente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente es responsable del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define típicamente una región constante que puede ser responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras de anticuerpos humanos se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo. Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo (p. ej., IgM, IgD, IgG, IgA, IgY e IgE) y clase (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM₁, IgM₂, IgA₁ e IgA₂). Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, típicamente, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, Capítulo 7 (Paul, W, ed, 2ª ed. Raven Press, NY (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras/pesadas típicamente forman el sitio de unión al antígeno.

[0237] Las regiones variables exhiben típicamente la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par típicamente están alineadas por las regiones marco, lo que puede permitir la unión a un epítipo específico. Desde el N-terminal al C-terminal, tanto las regiones variables de cadena ligera como pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991), o Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883. Las CDR de una cadena ligera también se pueden denominar CDR-L1 (o L-CDR1), CDR-L2 (o L-CDR2) y CDR-L3 (o L-CDR3), y las CDR de una cadena pesada también puede denominarse CDR-H1 (o H-CDR1), CDR-H2 (o H-CDR2) y CDR-H3 (o H-CDR3). En algunas formas de realización, un anticuerpo puede comprender un pequeño número de deleciones de aminoácidos del extremo carboxi de la(s) cadena(s) pesada(s). En algunas formas de realización, un anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene deleciones de 1 a 5 aminoácidos en el extremo carboxi de la cadena pesada. En ciertas formas de realización, la delimitación definitiva de una CDR y la identificación de residuos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo se logra resolviendo la estructura del anticuerpo y/o resolviendo la estructura del complejo anticuerpo-ligando. En ciertas formas de realización, esto se puede lograr mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como cristalografía de rayos X. En algunas formas de realización, se pueden emplear varios métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM, la definición descrita por Lu et al (ver arriba) y la definición de contacto.

[0238] Un anticuerpo "madurado por afinidad" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR de las mismas, que resultan en una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno en comparación con un anticuerpo parental, que no posee las alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares (p. ej., K_D de un intervalo de $\sim 10^{-9}$ M- 10^{-12} M) por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante métodos conocidos en la técnica. Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783 describe la maduración por afinidad mediante la reorganización de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos marco se describe por Barbas, et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. EE. UU. 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169: 147-155; Yelton y col, (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154 (7): 3310-9; y Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; y la mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectiva, posiciones de contacto o de hipermutación con un residuo de aminoácido potenciador de la actividad se describe en la Patente de EE. UU. Nº. 6.914.128. Normalmente, un anticuerpo parental y su progenie madurada por afinidad (p. ej., derivados) retienen la misma región de unión dentro de un antígeno, aunque ciertas interacciones a nivel molecular pueden alterarse debido a la(s) alternancia(s) de residuos de aminoácidos introducidas por maduración por afinidad.

[0239] El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos, que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie pero en donde las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se sustituyen con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena ligera y pesada murina en las que una o más de las CDR murinas (p. ej., CDR3) se han reemplazado con secuencias CDR humanas.

[0240] El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos, que comprenden secuencias pesadas y ligeras variables de la cadena de la región de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena murina pesada y ligera ligadas a regiones constantes humanas.

[0241] Tal como se utiliza aquí, el término "marco" o "secuencia de marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, -L2 y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones marco de la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones. (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3 y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como se hace referencia por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco.

[0242] En algunas formas de realización, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio de cadena pesada constante de inmunoglobulina de un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG2A humana, un dominio constante de IgG2B humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgA humana, un dominio constante de IgA1 humana, un dominio constante de IgA2 humana, un dominio constante de IgD humana o un dominio constante de IgE humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada de un dominio constante de IgG1 humana o un dominio constante de IgG4 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada de un dominio

constante de IgG4 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada de un dominio constante de IgG4 humano que tiene una sustitución de la cadena principal de Ser a Pro que produce una bisagra similar a IgG1 y permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas.

[0243] En algunas formas de realización, el anticuerpo o porción de unión de antígeno del mismo, comprende además un dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera que comprende un dominio constante de Ig lambda humana o un dominio constante de Ig kappa humana.

[0244] En algunas formas de realización, el anticuerpo es una IgG que tiene cuatro cadenas de polipéptidos que son dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras.

[0245] En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un diacuerpo, o un anticuerpo quimérico. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende un marco que tiene una secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana.

[0246] En algunas formas de realización, la porción de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento scFab, o un fragmento scFv.

[0247] Tal como se utiliza aquí, el término "gen de la línea germinal de anticuerpo" o "fragmento génico" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce a la reorganización genética y la mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular, (véase, por ejemplo, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30). Una de las ventajas proporcionadas por diversas formas de realización de la presente divulgación se deriva del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen más probabilidades que los genes de anticuerpos maduros de conservar las estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales características de los individuos de la especie, por lo que es menos probable que se reconozcan como de una fuente extraña cuando se usan terapéuticamente en esa especie.

[0248] Como se usa en este documento, el término "neutralizar" se refiere a contrarrestar la actividad biológica de un antígeno (p. ej., proteína diana) cuando una proteína de unión se une específicamente al antígeno. En una forma de realización, la proteína de unión neutralizante se une al antígeno/diana, por ejemplo, citocina, quinasa, factor de crecimiento, proteína de la superficie celular, proteína soluble, fosfatasa o ligando del receptor, y reduce su actividad biológica en al menos aproximadamente un 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. En algunas formas de realización, un anticuerpo neutralizante de un factor de crecimiento se une específicamente a un factor de crecimiento soluble maduro que se ha liberado de un complejo latente, evitando así su capacidad para unirse a su receptor para provocar la señalización corriente abajo. En algunas formas de realización, el factor de crecimiento maduro es TGFβ₁ o TGFβ₃.

[0249] El término "proteína de unión", como se usa en este documento incluye cualquier polipéptido que se une específicamente a un antígeno (p. ej., TGFβ₁), incluyendo, pero no limitado a un anticuerpo, o porciones de unión a antígeno del mismo, un DVD-IgTM, un TVD-Ig, un RAb-Ig, un anticuerpo biespecífico y un anticuerpo de doble especificidad.

[0250] El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" cuando se usa en un contexto de una composición que comprende el mismo puede referirse a una preparación de anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada mAb está dirigido contra un único determinante del antígeno. No se debe interpretar que el modificador "monoclonal" requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

[0251] El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descritos con más detalle en la Sección II C, a continuación), anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom, H.R. (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy, H. y Highsmith, W.E. (2002) Clin. Biochem 35: 425-445; Gavilondo, J.V. y Larrick, J.W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom, H. y Chames, P. (2000) Immunol. Today 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, Taylor, L.D. et al (1992) Nucl Acids Res 20: 6287-6295; Kellermann, S.A. y Green, L.L. (2002) Cur. Opin. in Biotechnol. 13: 593-597; Little, M. et al. (2000) Immunol. Today 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro método que implica el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas formas

de realización, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y, por tanto, a las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL del recombinante. Los anticuerpos son secuencias que, aunque se derivan de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y están relacionadas con ellas, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[0252] Como se usa en el presente documento, "inmunoglobulina de dominio variable dual" o "DVD-IgTM" y similares incluyen proteínas de unión que comprenden un polipéptido DVD de cadena pesada emparejado y un polipéptido DVD de cadena ligera con cada cadena pesada y ligera emparejada proporcionando dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión incluye un total de 6 CDR involucradas en la unión de antígenos por sitio de unión de antígenos. Un DVD-IgTM normalmente tiene dos brazos unidos entre sí al menos en parte por dimerización de los dominios CH3, siendo cada brazo del DVD biespecífico, lo que proporciona una inmunoglobulina con cuatro sitios de unión. DVD-IgTM se proporcionan en las publicaciones de patente de EE. UU. N^{os} 2010/0260668 y 2009/0304693.

[0253] Como se usa en este documento, "inmunoglobulina de dominio variable triple" o "TVD-Ig" y similares son proteínas de unión que comprenden un polipéptido de proteína de cadena pesada TVD emparejado y un polipéptido de proteína de unión TVD de cadena ligera con cada cadena pesada y ligera emparejada proporcionando tres sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión incluye un total de 6 CDR involucradas en la unión de antígenos por sitio de unión de antígenos. Una proteína de unión a TVD puede tener dos brazos unidos entre sí al menos en parte por dimerización de los dominios CH3, siendo cada brazo de la proteína de unión a TVD inespecífico, proporcionando una proteína de unión con seis sitios de unión.

[0254] Como se usa en el presente documento, "inmunoglobulina de receptor-anticuerpo" o "RAb-Ig" y similares son proteínas de unión que comprenden un polipéptido de cadena pesada de RAb, y un polipéptido de cadena ligera de RAb, que juntas forman tres sitios de unión de antígeno en total. Un sitio de unión al antígeno se forma mediante el emparejamiento de los dominios variables de anticuerpos pesados y ligeros presentes en cada uno de los polipéptidos RAb de cadena pesada y el polipéptido RAb de cadena ligera para formar un único sitio de unión con un total de 6 CDR que proporcionan un primer sitio de unión al antígeno. Cada polipéptido RAb de cadena pesada y polipéptido RAb de cadena ligera incluye una secuencia de receptor que se une independientemente a un ligando que proporciona el segundo y tercer sitio de unión del "antígeno". Un RAb-Ig típicamente tiene dos brazos unidos entre sí al menos en parte por dimerización de los dominios CH3, siendo cada brazo del RAb-Ig inespecífico, proporcionando una inmunoglobulina con seis sitios de unión. Los RAb-Igs se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N^o 2002/0127231).

[0255] El término "anticuerpo biespecífico", como se usa en este documento, y como diferenciado de una "proteína de unión media-Ig biespecífica" o "proteína de unión biespecífica (media-Ig)", se refiere a anticuerpos de longitud completa que se generan por tecnología de cuádrima (ver Milstein, C. y Cuello, A.C. (1983) Nature 305 (5934): p. 537-540), por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (ver Staerz, U.D. et al. (1985) Nature 314 (6012): 628-631), o mediante enfoques de perilla-en-agujero o similares, que introducen mutaciones en la región Fc que no inhiben la dimerización de CH3-CH3 (ver Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90 (14): 6444-6448), dando como resultado múltiples especies de inmunoglobulinas diferentes de las cuales solo una es el anticuerpo biespecífico funcional. Por función molecular, un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítipo) en uno de sus dos brazos de unión (un par de CP/CL) y se une a un antígeno (o epítipo) diferente en su segundo brazo (un par diferente de CP/CL). Según esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos (tanto en la especificidad como en las secuencias de CDR) y es monovalente para cada antígeno al que se une.

[0256] El término "anticuerpo de doble especificidad", como se usa en este documento, y como diferenciado de una proteína de unión media-Ig biespecífica o proteína de unión biespecífica, se refiere a anticuerpos de longitud completa que se pueden unir dos antígenos diferentes (o epítipos) en cada uno de sus dos brazos de unión (un par de CP/CL) (véase la publicación PCT N^o. WO 02/02773). En consecuencia, una proteína de unión de doble especificidad tiene dos brazos de unión de antígeno idénticos, con idéntica especificidad y secuencias de CDR idénticas, y es bivalente para cada antígeno al que se une.

[0257] El término "Kon", como se utiliza aquí, se pretende que se refiera a la de la constante de velocidad para la asociación de una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo) al antígeno para formar, por ejemplo, el complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica. El "Kon" también se conoce por los términos "constante de velocidad de asociación" o "ka", como se usa indistintamente en el presente documento. Este valor que indica la tasa de unión de un anticuerpo a su antígeno diana o la tasa de formación de complejos entre un anticuerpo y un antígeno también se muestra mediante la ecuación: Anticuerpo ("Ab") + Antígeno ("Ag") → Ab-Ag.

[0258] El término "Koff", como se utiliza aquí, se pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo), por ejemplo, del complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica. El "Koff" también se conoce por los términos "constante de velocidad de disociación" o "K_D" como se usa indistintamente en el presente documento. Este valor indica la tasa de disociación de un anticuerpo de su antígeno diana o la separación del complejo Ab-Ag a lo largo del tiempo en anticuerpo y antígeno libres como se muestra en la ecuación: Ab + Ag ← Ab-Ag.

[0259] Los términos "constante de equilibrio de disociación" o " K_D ", como se usa indistintamente en este documento, se refieren al valor obtenido en una medición de la titulación en el equilibrio, o dividiendo la constante de velocidad de disociación (k_{off}) por la constante de velocidad de asociación (k_{on}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se utilizan para representar la afinidad de unión de una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, a un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece una alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en tampones fisiológicos en equilibrio. Se pueden usar otros enfoques e instrumentos experimentales, tales como un ensayo Biacore® (análisis de interacción biomolecular) (p. ej., un instrumento disponible de Biacore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Además, también se puede usar un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), disponible de Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

[0260] Los términos "cristal" y "cristalizado" como se usan en el presente documento, se refieren a una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo), o porción de unión a antígeno de la misma, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que se diferencia de otras formas, como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales se componen de matrices tridimensionales regulares de átomos, iones, moléculas (p. ej., proteínas como los anticuerpos) o conjuntos moleculares (p. ej., complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales se organizan de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se comprenden bien en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal llamado unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica determinada y bien definida proporciona la "célula unitaria" del cristal. La repetición de la célula unitaria mediante traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., Págs. 201-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999). El término "enlazador" se usa para indicar polipéptidos que comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Dichos polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Holliger, P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90: 6444-6448; Poljak, R.J. et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Los enlazadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 55), ASTKGP (SEQ ID NO: 56); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 57); TVAAP (SEQ ID NO: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 59); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 60); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 61); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 62); SAKTTP (SEQ ID NO: 63); RADAAP (SEQ ID NO: 64); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 65); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 66); RADAAAA (G4S) 4 (SEQ ID NO: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 68); ADAAP (SEQ ID NO: 69); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 70); QPKAAP (SEQ ID NO: 71); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 72); AKTTPP (SEQ ID NO: 73); AKTTPPSVTLPLAP (SEQ ID NO: 74); AKTTAP (SEQ ID NO: 75); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 76); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 77); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 78); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 79); GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 80); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 81); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 82).

[0261] "Etiqueta" y "etiqueta detectable" o "resto detectable" significan un resto unido a una pareja de unión específica, como un anticuerpo o un analito, por ejemplo, para producir la reacción entre miembros de una pareja de unión específica, como un anticuerpo y un analito, detectable, y la pareja de unión específica, por ejemplo, anticuerpo o analito, así marcado se denomina "marcado detectablemente". Por tanto, el término "proteína de unión marcada", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína con una etiqueta incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. En una forma de realización, el marcador es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotín que pueden detectarse mediante avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{68}Ga , ^{18}F , ^{89}Zr , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm); cromógenos; marcadores fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina y fósforos de lantánidos); marcadores enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, luciferasa y fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotín; epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales y etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, como quelatos de gadolinio. Los ejemplos representativos de marcadores empleados comúnmente para inmunoensayos incluyen restos que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y restos que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. En este documento se describen otras etiquetas. A este respecto, el resto en sí puede no estar marcado de forma detectable, pero puede volverse detectable tras la reacción con otro resto más. El uso de "marcado detectablemente" pretende abarcar el último tipo de marcado detectable.

[0262] En algunas formas de realización, la afinidad de unión de un anticuerpo, o porción de unión de antígeno del mismo, a un antígeno (p. ej., complejo de proteínas), tales como la presentación de complejos de molécula-proTGF β 1, se determina usando un ensayo de octeto. En algunas formas de realización, un ensayo de octeto es un ensayo que determina uno o más parámetros cinéticos indicativos de la unión entre un anticuerpo y un antígeno. En algunas formas de realización, se usa un sistema Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA) para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para presentar complejos molécula-proTGF β 1. Por ejemplo, las afinidades de unión de los anticuerpos se pueden determinar usando el sistema de ensayo sin etiqueta de lectura e inmersión forteBio Octet QKe utilizando interferometría de biocapa. En algunas formas de realización, los antígenos se inmovilizan en

biosensores (p. ej., biosensores recubiertos con estreptavidina) y los anticuerpos y complejos (p. ej., complejos de molécula presentadora biotinilada-proTGFβ1) se presentan en solución a alta concentración (50 µg/ml) para medir interacciones vinculantes. En algunas formas de realización, la afinidad de unión de un anticuerpo, o una porción de unión de antígeno del mismo, a un complejo de molécula presentadora-proTGFβ1 se determina usando el protocolo descrito en este documento.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

[0263] La invención proporciona además composiciones farmacéuticas utilizadas como un medicamento adecuado para la administración en sujetos humanos y no humanos. Uno o más anticuerpos independientes del contexto de alta afinidad abarcados por la invención se pueden formular o mezclar con un vehículo (excipiente) farmacéuticamente aceptable, incluyendo, por ejemplo, un tampón, para formar una composición farmacéutica. Tales formulaciones pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que implica la señalización de TGFβ. En formas de realización particularmente preferidas, tales formulaciones pueden usarse para aplicaciones inmuno-oncológicas. Las composiciones farmacéuticas pueden probarse para determinar su esterilidad.

[0264] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas a pacientes para aliviar una indicación relacionada con TGFβ (p. ej., fibrosis, trastornos del sistema inmunitario, y/o cáncer). "Aceptable" significa que el vehículo es compatible con el ingrediente activo de la composición (y preferiblemente, capaz de estabilizar el ingrediente activo) y no perjudicial para el sujeto a tratar. Los ejemplos de excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables, que incluyen tampones, serán evidentes para el experto en la materia y se han descrito previamente. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K.E. Hoover. En un ejemplo, una composición farmacéutica descrita en este documento contiene más de un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-proTGFβ1, un complejo de LTBP1-proTGFβ1, un complejo de LTBP3-proTGFβ1 y un complejo de LRRC33-proTGFβ1 donde los anticuerpos reconocen diferentes epítopos/residuos del complejo.

[0265] Las composiciones farmacéuticas a ser utilizadas en los presentes métodos pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecil dimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilo parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen adicionalmente en el presente documento.

[0266] La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0267] Por tanto, el anticuerpo o una molécula que comprende un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo se puede formular en una composición farmacéutica adecuada para la administración humana.

[0268] La formulación farmacéutica puede incluir uno o más excipientes. En algunas formas de realización, los excipientes pueden seleccionarse de la lista proporcionada a continuación: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=browseByLetter.page&Letter=A>

[0269] La composición farmacéutica se formula típicamente a una concentración final del biológico activo (p. ej., anticuerpo monoclonal, molécula de unión diseñada que comprende un fragmento de unión a antígeno, etc.) entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml. Por ejemplo, la concentración final (peso/volumen) de las formulaciones puede oscilar entre aproximadamente 2-200, 2-180, 2-160, 2-150, 2-120, 2-100, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 5-200, 5-180, 5-160, 5-150, 5-120, 5-100, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 10-200, 10-180, 10-160, 10-150, 10-120, 10-100, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 20-200, 20-180, 20-160, 20-150, 20-120, 20-100, 20-80, 20-70, 20-60, 20-50, 20-40, 30-200, 30-180, 30-160, 30-150, 30-120, 30-100, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50, 30-40, 40-200, 40-180, 40-160, 40-150, 40-120, 40-100, 40-80, 40-70, 40-60, 40-50, 50-200, 50-180, 50-160, 50-150, 50-120, 50-100, 50-80, 50-70, 50-60, 60-200, 60-180, 60-160, 60-150, 60-120, 60-100, 60-80, 60-70, 70-200, 70-180, 70-160, 70-150, 70-120, 70-100, 70-80 mg/mL. En algunas formas de realización, la concentración final del biológico en la formulación es aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg/mL.

[0270] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan preferiblemente con tampones adecuados. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampón fosfato, tampón cítrico y tampón histidina.

[0271] El pH final de la formulación es típicamente entre pH 5,0 y 8,0. En algunas formas de realización, el pH final de la formulación está entre aproximadamente pH 5,0 y 7,0, opcionalmente entre aproximadamente pH 5,0 y 6,0. Por ejemplo, el pH de la composición farmacéutica puede ser de aproximadamente 5,0, 5,2, 5,5, 5,8, 6,0, 6,2, 6,5, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,5, 7,6 o 7,8.

[0272] La composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender un tensioactivo, tal como un detergente no iónico, aprobado para el uso en formulaciones farmacéuticas. Dichos tensioactivos incluyen, por ejemplo, polisorbato, tales como Polisorbato 20 (Tween-20), Polisorbato 80 (Tween-80) y NP-40.

[0273] La composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender un estabilizador. Para las preparaciones de proteínas líquidas, la estabilidad se puede mejorar mediante la selección de sales tamponantes del pH y, a menudo, también se pueden usar aminoácidos. A menudo son las interacciones en la interfaz líquido/aire o en la interfaz líquido/sólido (con el empaque) las que conducen a la agregación después de la adsorción y el despliegue de la proteína. Los estabilizadores adecuados incluyen, pero no se limitan a: sacarosa, maltosa, sorbitol, así como ciertos aminoácidos tales como histidina, glicina, metionina y arginina.

[0274] La composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener uno o cualquier combinación de los siguientes excipientes: fosfato de sodio, arginina, sacarosa, cloruro de sodio, trometamina, manitol, bencil alcohol, histidina, sacarosa, polisorbato 80, citrato de sodio, glicina, polisorbato 20, trehalosa, poloxámero 188, metionina, trehalosa, hialuronidasa, succinato de sodio, fosfato de potasio, edetato de disodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, maltosa, acetato de histidina, sorbitol, ácido pentético, albúmina de suero humano, ácido pentético.

[0275] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener un conservante.

[0276] La composición farmacéutica de la presente descripción se presenta típicamente como un líquido o una forma liofilizada. Normalmente, los productos se pueden presentar en viales (p. ej., viales de vidrio). Los productos disponibles en jeringas, bolígrafos o autoinyectores pueden presentarse como líquidos precargados en estos sistemas de contenedor/cierre.

[0277] En algunos ejemplos, la composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende liposomas que contienen un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-proTGFβ1, un complejo de LTBP1-proTGFβ1, un complejo de LTBP3-proTGFβ1, y un complejo de LRRC33-proTGFβ1, que puede prepararse mediante cualquier método adecuado, tal como se describe en Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82: 3688 (1985); Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77: 4030 (1980); y la patente de EE. UU. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de EE. UU. N° 5.013.556. Liposomas particularmente útiles pueden generarse mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

[0278] En algunas formas de realización, los liposomas con propiedades de direccionamiento se seleccionan para entregar o localizar la composición farmacéutica a ciertos tejidos o tipos de células preferentemente. Por ejemplo, se pueden emplear ciertos vehículos basados en nanopartículas con propiedades de direccionamiento a la médula ósea, por ejemplo, nanopartículas o liposomas basados en lípidos. Véase, por ejemplo, Sou (2012) "Advanced drug carriers targeting bone marrow", ResearchGate publicación 232725109.

[0279] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender o pueden ser utilizadas en conjunción con un adyuvante. Se contempla que cierto adyuvante puede potenciar las respuestas inmunitarias del sujeto a, por ejemplo, antígenos tumorales y facilitar la función efectora T, la diferenciación de DC de los monocitos, la captación y presentación mejorada de antígenos por APC, etc. Los adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, ácido retinoico. adyuvantes basados en ácido y derivados de los mismos, adyuvantes basados en emulsión de aceite en agua, tales como MF59 y otros adyuvantes que contienen escualeno, ligandos del receptor de tipo Toll (TRL) (p. ej., CpG), α-tocoferol (vitamina E) y derivados de los mismos.

[0280] Los anticuerpos descritos en este documento también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (p. ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se han descrito anteriormente técnicas ejemplares, véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

[0281] En otros ejemplos, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse en formato de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(2-hidroxietilmetacrilato) o alcohol poli(vinílico), polilactidas (Patente de Estados Unidos N°

3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0282] Las composiciones farmacéuticas para usarse para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones de anticuerpos terapéuticos se colocan generalmente en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

[0283] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden estar en formas de dosificación unitarias tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

[0284] Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanos (p. ej., Tween™ 20, 40, 60, 80 o 85) y otros sorbitanos (p. ej. Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre el 0,05 y el 5% de agente tensioactivo, y pueden estar entre el 0,1 y el 2,5%. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si es necesario.

[0285] Las emulsiones adecuadas se pueden preparar usando emulsiones grasas disponibles comercialmente, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo se puede disolver en una composición de emulsión premezclada o alternativamente se puede disolver en un aceite (p. ej., aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendras) y se forma una emulsión al mezclar con un fosfolípido (p. ej., fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta un 20% de aceite, por ejemplo, entre un 5 y un 20%.

[0286] Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas mediante la mezcla de un anticuerpo de la invención con Intralipid™ o los componentes de los mismos (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Kits para uso en la detección, monitorización o aliviar una indicación relacionada con TGFβ

[0287] La presente descripción también proporciona kits para uso en el alivio de enfermedades/trastornos asociados con una indicación relacionada con TGFβ1. Dichos kits pueden incluir uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento.

[0288] En algunas formas de realización, el kit puede comprender instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de la administración del anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 para tratar, retrasar la aparición o aliviar una enfermedad diana como las descritas en el presente documento. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basado en la identificación de si ese individuo tiene la enfermedad objetivo. En otras formas de realización más, las instrucciones comprenden una descripción de la administración de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, a un individuo en riesgo de padecer la enfermedad diana.

[0289] Las instrucciones relativas a la utilización de anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1, y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 generalmente incluye información sobre la dosis, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (p. ej., paquetes multidosis) o subunidades. Las instrucciones suministradas en los kits de la divulgación suelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (p. ej., una hoja de papel incluida en el kit), pero también se incluyen instrucciones legibles por máquina (p. ej., instrucciones en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

[0290] La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar, retardar la aparición y/o aliviar una enfermedad o trastorno asociado con una indicación relacionada con TGFβ. Se pueden proporcionar instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en este documento.

[0291] Los kits de la presente divulgación están en un embalaje adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a viales, botellas, frascos, envases flexibles (p. ej., bolsas de Mylar o plástico selladas) y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (p. ej., un atomizador) o un dispositivo de infusión como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (p. ej., el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable

con una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (p. ej., el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 como los descritos en este documento.

[0292] Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto(s) en el recipiente o asociados con el recipiente. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden el contenido de los kits descritos anteriormente.

Fabricación de inhibidores de alta afinidad específicos de isoforma de TGFβ1

[0293] La invención abarca procesos de fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención capaces de unir cada uno de: un complejo de GARP-proTGFβ1, un complejo de LTBP1-proTGFβ1, un complejo de LTBP3-proTGFβ1 y un complejo de LRRC33-proTGFβ1.

[0294] El proceso de fabricación de una composición farmacéutica que comprende tal anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender los pasos de purificación, formulación, filtración estéril, envasado, etc. Ciertos pasos, como la filtración estéril, por ejemplo, se realizan de acuerdo con las pautas establecidas por las agencias reguladoras relevantes, como la FDA. Dichas composiciones pueden estar disponibles en forma de recipientes de un solo uso, como jeringas precargadas, o recipientes multidosis, como viales.

Modificaciones

[0295] Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación se pueden modificar con un marcador detectable o un resto detectable, que incluye, entre otros, una enzima, grupo prostético, material fluorescente, material luminiscente, material bioluminiscente, material radiactivo, metal emisor de positrones, ion metálico paramagnético no radiactivo y marcador de afinidad para la detección y el aislamiento de un complejo de GARP-proTGFβ1, un complejo de LTBP1-proTGFβ1, un complejo de LTBP3-proTGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-proTGFβ1. La sustancia o resto detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a los polipéptidos de la divulgación o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador (p. ej., un enlazador escindible)) usando técnicas adecuadas. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucosa oxidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos no limitantes de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficeeritina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos no limitantes de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa u otros radioisótopos como, por ejemplo, yodo (131I, 125I, 123I, 121I), carbono (14C), azufre (35S), tritio (3H), indio (115mIn, 113mIn, 112In, 111In) y tecnecio (99Tc, 99mTc), talio (201Tl), galio (68Ga, 67Ga), paladio (103Pd), molibdeno (99Mo), xenón (133Xe), flúor (18F), 153Sm, Lu (177Lu), 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 86R, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, circonio (⁸⁹Zr) y estaño (113Sn, 117Sn). En algunas formas de realización, la etiqueta de radio puede seleccionarse del grupo que consiste en: ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸F y ⁸⁹Zr. En algunas formas de realización, los marcadores útiles son isótopos emisores de positrones, que pueden detectarse mediante tomografía por emisión de positrones. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a los anticuerpos de la divulgación que se unen específicamente a un complejo de GARP-proTGFβ1, un complejo de LTBP1-proTGFβ1, un complejo de LTBP3-proTGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-proTGFβ1, o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador) usando técnicas adecuadas. Cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento que se conjugan con una sustancia detectable puede usarse para cualquier ensayo de diagnóstico adecuado, como los descritos en el presente documento.

[0296] Además, los anticuerpos, o porciones de unión de antígeno de los mismos, de la descripción pueden también ser modificados con un fármaco. El fármaco puede acoplarse o conjugarse directamente a los polipéptidos de la divulgación, o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador (p. ej., un enlazador escindible)) usando técnicas adecuadas.

Agentes de dirección

[0297] En algunas formas de realización, los métodos de la presente divulgación comprenden el uso de uno o más agentes de dirección para dirigir un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, a un sitio particular en un sujeto con el propósito de modular la liberación de TGFβ maduro de un complejo de GARP-proTGFβ1, un complejo de LTBP1-proTGFβ1, un complejo de LTBP3-proTGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-proTGFβ1. Por ejemplo, los complejos LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1 se localizan típicamente en la matriz extracelular. Por tanto, en algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden conjugar con agentes de dirección de la matriz extracelular con el fin de localizar los anticuerpos en los sitios donde residen los complejos de TGFβ1 asociados a LTBP. En tales formas de realización, el direccionamiento selectivo de anticuerpos

conduce a la modulación selectiva de los complejos LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1. En algunas formas de realización, los agentes que se dirigen a la matriz extracelular incluyen agentes de unión a heparina, agentes de unión a metaloproteinasas de matriz, dominios de unión a lisil oxidasa, agentes de unión a fibrilina, agentes de unión a ácido hialurónico y otros.

[0298] Del mismo modo, los complejos de GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1s son típicamente localizados y anclados a la superficie de las células. El primero se expresa en células T reguladoras FOXP3 + activadas (Tregs), mientras que el último se expresa en ciertas células mieloides y algunas células cancerosas como la LMA. Por tanto, en algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden conjugar con agentes de unión de células inmunitarias (p. ej., células Treg, macrófagos activados, etc.) con el fin de localizar anticuerpos en sitios donde residen estos complejos de proTGFβ1 asociados a células. En tales formas de realización, el direccionamiento selectivo de anticuerpos conduce a la inhibición selectiva de complejos de proTGFβ1 asociados a células (p. ej., inhibición selectiva de la liberación de TGFβ1 maduro con fines de modulación inmunitaria, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer). En tales formas de realización, los agentes dirigidos a células inmunitarias pueden incluir, por ejemplo, proteínas CCL22 y CXCL12 o fragmentos de las mismas.

[0299] En algunas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden utilizar con una primera porción que se une selectivamente un complejo de proTGFβ1 y una segunda porción que se une selectivamente un componente de un sitio diana, por ejemplo, un componente de la ECM (p. ej., la fibrilina) o un componente de una célula Treg (p. ej., CTLA-4).

[0300] Tal como se detalla adicionalmente en este documento, la presente invención contempla que los inhibidores de TGFβ1 selectivos para isoformas, tales como los descritos en el presente documento, se pueden utilizar para promover o restaurar la hematopoyesis en la médula ósea. Por consiguiente, en algunas formas de realización, una composición que comprende tal inhibidor (p. ej., inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de TGFβ1) puede dirigirse a la médula ósea. Un modo de lograr la focalización en la médula ósea es el uso de ciertos portadores que se dirigen preferentemente a la localización o acumulación de la médula ósea. Por ejemplo, se pueden emplear ciertos vehículos basados en nanopartículas con propiedades de direccionamiento a la médula ósea, por ejemplo, nanopartículas o liposomas basados en lípidos. Véase, por ejemplo, Sou (2012) "Advanced drug carriers targeting bone marrow", ResearchGate publicación 232725109.

[0301] En algunas formas de realización, agentes de direccionamiento incluyen potenciadores inmunitarios, tales como adyuvantes que comprenden escualeno y/o α-tocoferol y adyuvantes que comprenden un ligando/agonista de TLR (como ligandos/agonistas de TLR3). Por ejemplo, el adyuvante que contiene escualeno puede dirigirse preferentemente a determinadas células inmunitarias tales como monocitos, macrófagos y células presentadoras de antígenos para potenciar el cebado, el procesamiento de antígenos y/o la diferenciación de células inmunitarias para reforzar la inmunidad del huésped. En algunas formas de realización, tal adyuvante puede estimular las respuestas inmunitarias del huésped a los neoepítomos para la activación de las células T.

Dianas terapéuticas y mecanismos de acción *in vivo*

[0302] Por consiguiente, los inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas de alta afinidad descritos en el presente documento pueden usarse para inhibir TGFβ1 en cualquier sistema biológico adecuado, tal como sistemas *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*. Los métodos relacionados pueden comprender poner en contacto un sistema biológico con el inhibidor de TGFβ1. El sistema biológico puede ser un sistema de ensayo, una muestra biológica, un cultivo celular, etc. En algunos casos, estos métodos incluyen modificar el nivel de factor de crecimiento libre en el sistema biológico.

[0303] Por consiguiente, tales composiciones y formulaciones farmacéuticas pueden usarse para dirigirse a complejos latentes que contienen TGFβ accesibles por los inhibidores *in vivo*. Por tanto, el anticuerpo de la invención tiene como objetivo apuntar a las siguientes dianas en un sitio de la enfermedad (p. ej., microambiente tumoral y microambiente fibrótico) donde se une al complejo latente evitando así de manera preventiva que se libere el factor de crecimiento: i) proTGFβ1 presentado por GARP; ii) proTGFβ1 presentado por LRRC33; iii) proTGFβ1 presentado por LTBP1; y iv) proTGFβ1 presentado por LTBP3. Por lo general, los complejos (i) y (ii) anteriores están anclados en la membrana celular porque tanto GARP como LRRC33 son proteínas transmembrana capaces de unir el proTGFβ1 latente en la cara extracelular de la célula que expresa LRRC33, mientras que los complejos (iii) y (iv) son componentes de la matriz extracelular. De esta manera, los inhibidores incorporados en el presente documento eliminan el tener que completar la unión con receptores endógenos de alta afinidad para ejercer efectos inhibidores. Además, dirigirse corriente arriba de la interacción ligando/receptor puede permitir efectos más duraderos, ya que la ventana de accesibilidad a la diana es más larga y está más localizada en los tejidos relevantes que los inhibidores convencionales que se dirigen a factores de crecimiento solubles transitorios solo después de que se ha liberado del complejo latente. Por lo tanto, apuntar al complejo latente anclado a ciertos nichos puede facilitar una mejor participación de la diana *in vivo*, en comparación con los anticuerpos neutralizantes convencionales que deben competir en la unión con los receptores endógenos durante su corta vida media como factor de crecimiento soluble (libre), por ejemplo, -dos minutos, una vez que se libera del complejo latente.

[0304] Varios estudios han arrojado luz sobre los mecanismos de activación de TGFβ1. Se ha demostrado que tres

integrinas, $\alpha V\beta 6$, $\alpha Y\beta 8$ y $\alpha V\beta 1$ son activadores clave del TGF β 1 latente (Reed, N.I., et al., *Sci Transl Med*, 2015, 7(288): p. 288ra79; Travis, M.A. y D. Sheppard, *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: p. 51-82; Munger, J.S., et al, *Cell*, 1999, 96 (3): p. 319-28). Las integrinas αV se unen a la secuencia RGD presente en los LAP de TGF β 1 y TGF β 1 con alta afinidad (Dong, X, et al, *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21 (12): p. 1091-6). Ratones transgénicos con una mutación en el sitio TGF β 1 RGD que previene la unión de la integrina, pero no la secreción, fenocopia el ratón TGF β 1 -/- (Yang, Z, et al, *J Cell Biol*, 2007, 176(6): p. 787-93). Los ratones que carecen de integrinas $\beta 6$ y $\beta 8$ recapitulan todos los fenotipos esenciales de los ratones knockout para TGF β 1 y TGF β 3, incluida la inflamación multiorgánica y el paladar hendido, lo que confirma el papel esencial de estas dos integrinas para la activación de TGF β 1 en el desarrollo y la homeostasis (Aluwihare, P. y col, *J Cell Sci*, 2009, 122 (Pt 2): págs. 227-32). La clave para la activación dependiente de la integrina del TGF β 1 latente es la unión covalente a las moléculas presentadoras; la ruptura de los enlaces disulfuro entre GARP y TGF β 1 LAP por mutagénesis no altera la formación de complejos, pero anula completamente la activación de TGF β 1 por $\alpha Y\beta 6$ (Wang, R, et al., *Mol Biol Cell*, 2012, 23(6): págs. 1129-39). El reciente estudio de la estructura del TGF β 1 latente ilumina cómo las integrinas permiten la liberación del TGF β 1 activo del complejo latente: el enlace covalente del TGF β 1 latente a su molécula presentadora ancla el TGF β 1 latente, ya sea a la ECM a través de LTBP, o al citoesqueleto a través de GARP o LRRC33. La unión de integrina a la secuencia de RGD da como resultado un cambio dependiente de la fuerza en la estructura de LAP, lo que permite que el TGF β 1 activo se libere y se una a los receptores cercanos (Shi, M, et al., *Nature*, 2011, 474 (7351): págs. 343-9). La importancia de la activación del TGF β 1 independiente de la integrina en la enfermedad también ha sido bien validada. Un inhibidor de molécula pequeña de $\alpha V\beta 1$ protege contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (Reed, N.I., et al., *Sci Transl Med*, 2015, 7(288): p. 288ra79), y bloqueo $\alpha V\beta 6$ con un anticuerpo o la pérdida de la integrina $\beta 6$ suprime la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y la fibrosis inducida por radiación (Munger, J.S., et al., *Cell*, 1999, 96 (3): p. 319-28); Horan, G.S. y otros, *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(1): p. 56-65).

[0305] Además de las integrinas, han sido implicados otros mecanismos de activación de TGF β 1, incluyendo trombospondina-1 y la activación por proteasas tales como plasmina, metaloproteinasas de la matriz (MMPs, por ejemplo, MMP2, MMP9 y MMP12), la cathepsina D, caliceína, y la familia de proteasas de zinc ADAM (p. ej., ADAM10, ADAM12 y ADAM17). La eliminación de la trombospondina-1 recapitula algunos aspectos del fenotipo TGF β 1 -/- en algunos tejidos, pero no es protector en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, conocida por ser dependiente de TGF β (Ezzie, M.E., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44 (4): p. 556-61). Además, la desactivación de las proteasas candidatas no dio como resultado un fenotipo de TGF β 1 (Worthington, J.J., J.E. Klementowicz y M.A. Travis, *Trends Biochem Sci*, 2011, 36 (1): p. 47-54). Esto podría explicarse por redundancias o porque estos mecanismos son críticos en enfermedades específicas más que en el desarrollo y la homeostasis.

[0306] Por lo tanto, los inhibidores específicos a las isoformas de alta afinidad de TGF β 1 descritos en este documento incluyen inhibidores que funcionan mediante la prevención del paso de activación de TGF β 1. En algunas formas de realización, tales inhibidores pueden inhibir la activación dependiente de integrina (p. ej., mecánica o impulsada por la fuerza) de TGF β 1. En algunas formas de realización, tales inhibidores pueden inhibir la activación de TGF β 1 dependiente de proteasa o inducida por proteasa. Este último incluye inhibidores que inhiben el paso de activación del TGF β 1 de forma independiente de la integrina. En algunas formas de realización, tales inhibidores pueden inhibir la activación de TGF β 1 independientemente del modo de activación, por ejemplo, inhibir tanto la activación dependiente de integrina como la activación dependiente de proteasa de TGF β 1. Ejemplos no limitantes de proteasas que pueden activar TGF β 1 incluyen proteasas de serina, tales como caliceínas, quimiotripsina, tripsina, elastasas, plasmina, así como metaloproteasas de zinc (familia MMP) tales como MMP-2, MMP-9 y MMP-13. Las caliceínas incluyen las caliceínas plasmáticas y las caliceínas tisulares, como KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 y KLK15. Los datos presentados en el presente documento demuestran ejemplos de inhibidores de TGF β 1 específicos de isoforma, capaces de inhibir la activación de TGF β 1 dependiente de caliceína *in vitro*. Los inhibidores de la presente invención pueden prevenir la liberación o disociación del factor de crecimiento TGF β 1 activo (maduro) del complejo latente. Dichos inhibidores pueden funcionar estabilizando la conformación inactiva (p. ej., latente) del complejo. Los datos demuestran además que un inhibidor de TGF β 1 de alta afinidad e independiente del contexto (Ab6) también puede inhibir el TGF β 1 dependiente de activación de Plasmina. Sorprendentemente, sin embargo, un inhibidor de TGF β 1 (Ab3) descrito anteriormente no pudo inhibir este proceso.

[0307] La invención es particularmente útil para el uso terapéutico para ciertas enfermedades que están asociadas con múltiples funciones biológicas de TGF β 1 de señalización que no se limita a un único contexto de la función de TGF β 1. En tales situaciones, puede ser beneficioso inhibir los efectos del TGF β 1 en múltiples contextos. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos para dirigir e inhibir el TGF β 1 de una manera específica de isoforma, en lugar de una manera específica de contexto.

[0308] Un cuerpo de evidencia apoya la noción de que muchas enfermedades manifiestan perturbaciones complejas de señalización de TGF β , lo que probablemente implica la participación de tipos de células heterogéneas que confieren diferentes efectos de la función de TGF β , que son mediados por sus interacciones con las llamadas moléculas presentadoras. Se han identificado al menos cuatro de tales moléculas presentadoras, que pueden "presentar" TGF β en varios nichos extracelulares para permitir su activación en respuesta a estímulos locales. En una categoría, TGF β se deposita en la ECM en asociación con moléculas presentadoras asociadas a ECM, tales como LTBP1 y LTBP3, que median las actividades de TGF β asociadas a ECM. En otra categoría, el TGF β está anclado a la superficie de las células inmunitarias, a través de moléculas presentadoras como GARP y LRRC33, que median en determinadas funciones

inmunitarias. Estas moléculas presentadoras muestran expresión, localización y/o función diferencial en diferentes tejidos y tipos de células, lo que indica que los eventos desencadenantes y el resultado de la activación de TGFβ variarán, dependiendo del microambiente. Basándose en la noción de que muchos efectos del TGFβ pueden interactuar y contribuir a la progresión de la enfermedad, los agentes terapéuticos que pueden antagonizar múltiples facetas de la función del TGFβ pueden proporcionar una mayor eficacia.

[0309] Se ha reconocido que varias enfermedades implican poblaciones heterogéneas de células como fuente de TGFβ1 que contribuyen en conjunto a la patogénesis y/o progresión de la enfermedad. Es probable que coexistan más de un tipo de complejos ("contextos") que contienen TGFβ1 dentro del mismo microambiente de la enfermedad. En particular, tales enfermedades pueden implicar tanto un componente ECM (o "matriz") de la señalización de TGFβ1 como un componente inmunitario de la señalización de TGFβ1. En tales situaciones, dirigirse selectivamente a un único contexto de TGFβ1 (p. ej., TGFβ1 asociado con un tipo particular de molécula presentadora) puede proporcionar un alivio limitado. Se razonó que es ventajoso inhibir de forma potente tanto el componente de la matriz de TGFβ1 como el componente inmunitario de las actividades del TGFβ1.

[0310] En segundo lugar, se observan similitudes notables en las características celulares/tisulares entre el estroma tumoral y los tejidos fibróticos, destacando los mecanismos comunes que subrayan estas indicaciones. Por tanto, el uso de inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas de alta afinidad que actúan ampliamente sobre ambos constituyentes con alta potencia puede proporcionar efectos terapéuticos óptimos en diversos tipos de enfermedades. Por ejemplo, la progresión de los tumores sólidos, así como la fibrosis, puede estar muy influenciada por factores relacionados con la matriz, como alteraciones en los componentes y la organización de la ECM, y también está influenciada por el entorno inmunosupresor. De manera similar, las manifestaciones clínicas de mielofibrosis incluyen la proliferación anormal de ciertas poblaciones de células y fibrosis en la médula ósea.

[0311] En tercer lugar, las líneas de evidencia han planteado la posibilidad de que el TGFβ1 pueda ser al menos en parte responsable de la resistencia farmacológica a las terapias contra el cáncer (como los inhibidores de puntos de control inmunológico, las vacunas contra el cáncer, la terapia con células inmunitarias modificadas, la quimioterapia, la radioterapia, etc.) observado en muchos tipos de cáncer (pacientes con cáncer). En algunos casos, tal resistencia parece intrínseca al cáncer/tipo de tumor particular en comparación con los antecedentes del paciente (generalmente denominada resistencia innata, resistencia primaria, resistencia intrínseca o resistencia inherente; estos términos se usan indistintamente en este documento). Tal resistencia puede estar representada en un subconjunto de pacientes que responden mal a las terapias contra el cáncer, como los inhibidores de puntos de control inmunitarios, y posiblemente reflejen un entorno inmuno-excluido. Es probable que esto esté mediado, al menos en parte, por una vía dependiente de TGFβ1. Por tanto, el inhibidor selectivo de isoformas descrito en el presente documento puede hacer que los cánceres resistentes sean más sensibles a tales terapias. En particular, en situaciones en las que la resistencia a la terapia está asociada con la exclusión inmunitaria en un sitio de la enfermedad (como un tumor), la inhibición de TGFβ1 puede desbloquear la inmunosupresión y permitir que las células efectoras accedan a su objetivo (p. ej., células cancerosas). El mismo mecanismo de acción es aplicable en una serie de paradigmas terapéuticos en los que los efectos de una terapia deben entrar en contacto con la enfermedad o el tejido asegurado a tratar. Se cree que los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención facilitan este proceso al trabajar a través de los múltiples brazos de la función de TGFβ1, por ejemplo, inhibición de células inmunosupresoras (p. ej., Tregs, macrófagos M2, MDSC) y regulación de ECM, superando así la resistencia a los medicamentos.

[0312] Alternativamente, la resistencia puede desarrollarse con el tiempo de tal manera que los pacientes que muestran la capacidad de respuesta clínica material a un tratamiento se vuelven poco sensible con el tiempo (es decir, resistencia adaptativa o adquirida). Por ejemplo, se ha informado que la terapia con PD-1 puede conducir a una resistencia adaptativa que se correlaciona con la regulación positiva de otros antígenos de células T (p. ej., componentes de TCR), lo que sugiere que las células cancerosas evolucionan para evadir el bloqueo de PD-1 a través de otro mecanismo. Posteriormente, un segundo inhibidor de punto de control que se dirige a un componente receptor de células T diferente, como TIM3, puede restaurar la capacidad de respuesta a la inmunoterapia. Estas observaciones sugieren que bloquear múltiples vías para contrarrestar las respuestas adaptativas de las células cancerosas puede reducir la probabilidad de que las células cancerosas eviten la inmunidad del huésped. Los inhibidores de TGFβ1 capaces de dirigirse a múltiples contextos de TGFβ1 pueden eludir ventajosamente la resistencia a fármacos adquirida proporcionando bloqueo en múltiples puntos de la función de TGFβ1.

[0313] Y finalmente, basado en la noción de que la expresión de varias moléculas presentadoras puede variar con el tiempo, por ejemplo, en respuesta a señales locales (p. ej., citoquinas, quimiocinas, entorno de ECM, etc.) y/o con cambios en un microambiente de enfermedad, se razona que los inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1 tales como los descritos en este documento pueden usarse para resistir tal plasticidad y proporcionar efectos inhibidores amplios y duraderos incluso cuando ocurren cambios anormales en la expresión de las moléculas de presentación.

[0314] En cualquiera de estos escenarios, los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 están dirigidos ventajosamente para orientar las formas pro/latentes de TGFβ1 en asociación con diversas moléculas presentadoras, todas las cuales o diferentes combinaciones de las cuales están presentes en un(os) microambiente(s) patológico(s). Más específicamente, en una modalidad, el inhibidor se dirige al TGFβ1 asociado a ECM (complejos LTBP1/3-TGFβ1). En otra modalidad, el inhibidor se dirige al TGFβ1 asociado a células inmunitarias. Esto incluye al

TGFβ1 presentado por GARP, como los complejos GARP-TGFβ1 expresados en células Treg y los complejos LRRC33-TGFβ1 expresados en macrófagos y otras células mieloides/linfoides, así como ciertas células cancerosas.

[0315] Dichos anticuerpos incluyen inhibidores específicos de isoforma de TGFβ1 que se unen y previenen la activación (o liberación) del factor de crecimiento TGFβ1 maduro de un complejo de TGFβ1 pro/latente de una manera independiente del contexto, de manera que los anticuerpos pueden inhibir la activación (o liberación) de TGFβ1 asociado con múltiples tipos de moléculas presentadoras. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos capaces de bloquear TGFβ1 asociado a ECM (complejos presentados por LTBP y presentados por LTBP3) y TGFβ1 asociado a células (complejos presentados por GARP y presentados por LRRC33).

[0316] Se han sugerido diversas condiciones de enfermedad para involucrar a la desregulación de señalización de TGFβ como un factor que contribuye. De hecho, la patogénesis y/o la progresión de ciertas afecciones humanas parecen estar impulsadas predominantemente por las actividades del TGFβ1 o depender de ellas. En particular, muchas de estas enfermedades y trastornos involucran tanto un componente ECM como un componente inmunitario de la función del TGFβ1, lo que sugiere que está involucrada la activación del TGFβ1 en múltiples contextos (p. ej., mediada por más de un tipo de moléculas presentadoras). Además, se contempla que haya diafonía entre las células que responden a TGFβ1. En algunos casos, las interacciones entre las actividades multifacéticas del eje TGFβ1 pueden desencadenar una cascada de eventos que conducen a la progresión de la enfermedad, agravamiento y/o supresión de la capacidad del huésped para combatir la enfermedad. Por ejemplo, ciertos microambientes patológicos, como el microambiente tumoral (TME) y el microambiente fibrótico (FME), pueden estar asociados con TGFβ1 presentado por múltiples moléculas presentadoras diferentes, por ejemplo, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1, LRRC33-proTGFβ1 y cualquier combinación de los mismos. Las actividades de TGFβ1 de un contexto pueden, a su vez, regular o influir en las actividades de TGFβ1 de otro contexto, lo que aumenta la posibilidad de que cuando se desregula, esto pueda dar como resultado la exacerbación de las condiciones de la enfermedad. Por lo tanto, es deseable inhibir ampliamente a través de múltiples modos de función de TGFβ1 (es decir, múltiples contextos) mientras se limitan selectivamente tales efectos inhibidores a la isoforma de TGFβ1. El objetivo es no perturbar la señalización homeostática del TGFβ mediada por las otras isoformas, incluido el TGFβ3, que desempeña un papel importante en la cicatrización.

[0317] Los componentes inmunitarios de actividades de TGFβ1 están mediados en gran parte por TGF asociada a las células beta 1 (p. ej., GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1). Tanto los brazos GARP como LRRC33 de la función TGFβ1 están asociados con características inmunosupresoras que contribuyen a la progresión de muchas enfermedades. Por tanto, el inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad puede usarse para inhibir TGFβ1 asociado con células inmunosupresoras. Las células inmunosupresoras incluyen células T reguladoras (Tregs), macrófagos M2 y MDSC. Por tanto, el inhibidor de TGFβ1 puede inhibir o revertir el fenotipo inmunosupresor en un sitio de enfermedad, por ejemplo, TME y FME in vivo.

[0318] En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 inhibe TGFβ1 asociado con una célula que expresa el complejo de GARP-TGFβ1 o el complejo de LRRC33-TGFβ1, en donde opcionalmente la célula puede ser una célula T, un fibroblasto, un miofibroblasto, un macrófago, un monocito, una célula dendrítica, una célula presentadora de antígeno, un neutrófilo, una célula supresora derivada de mielóide (MDSC), un linfocito, un mastocito o una microglía. La célula T puede ser una célula T reguladora (p. ej., célula T inmunosupresora). El neutrófilo puede ser un neutrófilo activado. El macrófago puede ser un macrófago activado (p. ej., polarizado), incluidos macrófagos profibróticos y/o asociados a tumores (TAM), por ejemplo, macrófagos de subtipo M2c y subtipo M2d. En algunas formas de realización, los macrófagos están expuestos a factores derivados de tumores (p. ej., citoquinas, factores de crecimiento, etc.) que pueden inducir además fenotipos pro-cancerígenos en macrófagos. En algunas formas de realización, tal factor derivado de tumor es CSF-1/M-CSF.

[0319] En algunas formas de realización, la célula que expresa el complejo de GARP-TGFβ1 o el complejo de LRRC33-TGFβ1 es una célula de cáncer, por ejemplo, células cancerosas circulantes y células tumorales.

GARP-proTGFβ1 como diana

[0320] Las células T reguladoras (Tregs) representan un pequeño subconjunto de linfocitos T CD4-positivos y desempeñan un papel importante al actuar como una "ruptura" en la reducción de la respuesta inmunitaria para mantener la homeostasis. En condiciones de enfermedad (como el cáncer), se informan niveles elevados de Tregs, y esto se asocia con un pronóstico más precario. Las Treg humanas aisladas de células de sangre periférica de donantes pueden activarse mediante estimulación con CD3/CD28. Se muestra que la activación de Treg induce un marcado aumento en la expresión de la superficie celular de GARP-proTGFβ1 (**FIG. 32A**). Como se informó anteriormente, las Treg ejercen actividades inmunosupresoras, que incluyen una poderosa supresión de la proliferación de células T efectoras (Teff). Como se muestra en el presente documento (**FIG. 32B**), en las condiciones experimentales estándar en las que la mayoría de los Teffs experimentan división celular, los Tregs cocultivados reducen esto a una mera fracción. Y esta inhibición de Treg de la proliferación de Teff puede superarse eficazmente (es decir, desinhibición) mediante el tratamiento del cocultivo de Teffs y Tregs con inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1, demostrando que el TGFβ1 selectivo de isoformas descrito en este documento es eficaz para inhibir el brazo GARP de la función TGFβ1. En entornos patológicos (como el microambiente tumoral y el entorno fibrótico), esto se traduciría en la capacidad de estos inhibidores para bloquear la inmunosupresión mediada por Treg. Esto, a su vez, debería conducir a una mayor proliferación de células T

efectoras para estimular la inmunidad. El brazo GARP de los inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1 puede apuntar a esta faceta de la función TGFβ1. En algunas formas de realización, los anticuerpos, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento, pueden reducir la actividad supresora de las células T reguladoras (Tregs).

LRRC33-proTGFβ1 como diana

[0321] LRRC33 se expresa en tipos de células selectivos, en particular los de linaje mieloide, incluyendo monocitos y macrófagos. Los monocitos se originan a partir de progenitores en la médula ósea y circulan en el torrente sanguíneo y llegan a los tejidos periféricos. Los monocitos circulantes pueden luego migrar a los tejidos donde quedan expuestos al entorno local (p. ej., específico de tejido, asociado a una enfermedad, etc.) que incluye un panel de varios factores, como citoquinas y quimiocinas, que desencadenan la diferenciación de los monocitos en macrófagos, células dendríticas, etc. Estos incluyen, por ejemplo, macrófagos alveolares en el pulmón, osteoclastos en la médula ósea, microglia en el SNC, histiocitos en los tejidos conectivos, células de Kupffer en el hígado y macrófagos del tejido adiposo marrón en el tejido adiposo marrón. En un tumor sólido, los macrófagos infiltrados pueden ser macrófagos asociados a tumores (TAM), neutrófilos asociados a tumores (TAN) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), etc. Dichos macrófagos pueden activarse y/o asociarse con fibroblastos activados, tales como fibroblastos (CAF) asociados a carcinoma (o asociados a cáncer) y/o estroma. Por tanto, los inhibidores de la activación de TGFβ1 descritos en el presente documento que inhiben la liberación de TGFβ1 maduro de complejos que contienen LRRC33 pueden dirigirse a cualquiera de estas células que expresan LRRC33-proTGFβ1 en la superficie celular. En un microambiente fibrótico, las células que expresan LRRC33 pueden incluir macrófagos M2, macrófagos residentes en tejidos y/o MDSC.

[0322] En algunas formas de realización, el complejo de LRRC33-TGFβ1 está presente en la superficie externa de los macrófagos profibróticos (similares a M2). En algunas formas de realización, los macrófagos profibróticos (similares a M2) están presentes en el microambiente fibrótico. En algunas formas de realización, el direccionamiento del complejo de LRRC33-TGFβ1 en la superficie externa de macrófagos profibróticos (similares a M2) proporciona un efecto superior en comparación con el direccionamiento exclusivo de complejos LTBP1-TGFβ1 y/o LTBP1-TGFβ1. En algunas formas de realización, los macrófagos similares a M2 se polarizan adicionalmente en múltiples subtipos con fenotipos diferenciales, tales como macrófagos M2c y M2d similares a TAM. En algunas formas de realización, los macrófagos pueden activarse por diversos factores (p. ej., factores de crecimiento, quimiocinas, citoquinas y moléculas de remodelación de ECM) presentes en el microambiente del tumor, que incluyen, entre otros, TGFβ1, CCL2 (MCP-1), CCL22, SDF-1/CXCL12, M-CSF (CSF-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, CXCR4, VEGF, PDGF, agentes reguladores de prostaglandinas como el ácido araquidónico y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), RUNX2, HIF1α y metaloproteinasas. La exposición a uno o más de estos factores puede conducir a los monocitos/macrófagos a fenotipos pro-tumorales. Para dar solo un ejemplo, se ha demostrado que la coexpresión de CCL2 y VEGF en tumores se correlaciona con un aumento de TAM y un diagnóstico deficiente. A su vez, las células asociadas a tumores activadas también pueden facilitar el reclutamiento y/o la diferenciación de otras células en células pro-tumorales, por ejemplo, CAF, TAN, MDSC y similares. Las células estromales también pueden responder a la activación de los macrófagos y afectar la remodelación de la ECM y, en última instancia, la vascularización, la invasión y la metástasis. Por ejemplo, CCL2 no solo funciona como un atrayente de monocitos, sino que también promueve la adhesión celular mediante la regulación ascendente de MAC-1, que es un receptor de ICAM-1, expresado en el endotelio activado. Esto puede conducir a la arteriogénesis dependiente de CCL2 y la progresión del cáncer. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 descritos en el presente documento pueden usarse en un método para inhibir la arteriogénesis interfiriendo con el eje de señalización de CCL2.

[0323] Un subconjunto de células mieloides expresan la superficie celular de LRRC33, incluyendo los macrófagos polarizados por M2 y células supresoras derivadas de mieloide (MDSCs), ambas de las cuales tienen fenotipos inmunosupresores y se enriquecen en los entornos de la enfermedad (p. ej., TME y FME). Los monocitos circulantes derivados de la médula ósea no parecen expresar LRRC33 en la superficie celular. La expresión restrictiva de LRRC33 lo convierte en un objetivo terapéutico particularmente atractivo. Si bien la mayoría de los estudios disponibles en la bibliografía se han centrado en la biología de las células T efectoras (p. ej., células citotóxicas CD8+) en el cáncer, cada vez más pruebas (como los datos presentados aquí) apuntan a funciones importantes de las poblaciones de células mieloides supresoras en las enfermedades. Es importante destacar que los anticuerpos inhibidores de TGFβ1 altamente selectivos descritos en este documento son capaces de dirigirse a este brazo de la función de TGFβ1 in vivo. Más específicamente, los datos presentados en este documento muestran que los macrófagos M2 asociados a tumores y las MDSC expresan LRRC33 de la superficie celular, con una fuerte correlación con la progresión de la enfermedad. Los anticuerpos selectivos de TGFβ1 de alta afinidad descritos en el presente documento son capaces de superar la resistencia primaria a la terapia de bloqueo de puntos de control (TCC) de tumores en múltiples modelos farmacológicos. De hecho, la eficacia antitumoral coincide con una disminución significativa en los macrófagos asociados a tumores y los niveles de MDSC, lo que sugiere que dirigirse a esta faceta de la función de TGFβ1 puede contribuir a efectos terapéuticamente beneficiosos. Es probable que esto sea aplicable a otras enfermedades en las que estas células inmunosupresoras están enriquecidas. Varias condiciones fibróticas también están asociadas con frecuencias locales elevadas de estas poblaciones de células. Por tanto, se espera que los anticuerpos selectivos de TGFβ1 de alta afinidad ejerzan efectos in vivo similares en tales indicaciones.

LTBP1/3-proTGFβ1 como diana

[0324] La matriz extracelular es el sitio en donde son orquestados eventos de señalización complejos a los niveles celulares, de tejido, de órganos, y sistémicos. La desregulación de la ECM se observa en varias patologías. Un depósito de factor de crecimiento TGFβ1 está presente en la ECM en forma de complejo proTGFβ1 latente. Los complejos latentes de proTGFβ1 se anclan a la matriz mediante interacciones covalentes con los componentes de ECM, LTBP1 y/o LTBP3. Se cree que otras proteínas ECM tales como fibronectina y fibrilinas (p. ej., Fibrilina-1) son importantes para mediar el depósito de ECM y la localización de LTBP. La orientación de LLC a la ECM es un paso esencial en el proceso de activación de TGFβ1. Debido a que la mayoría, si no todas, las indicaciones relacionadas con TGFβ1 probablemente involucran algunos aspectos de la función de la ECM que son dependientes de TGFβ1, es imperativo que los inhibidores de TGFβ considerados como terapéuticos sean capaces de dirigirse a este grupo de señalización de TGFβ1. De hecho, los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 de acuerdo con la presente divulgación muestran afinidades notablemente altas y potencian los complejos de LTBP1/3-proTGFβ1 humano. Debido a que estos anticuerpos se dirigen directamente a los complejos localizados en ECM en su estado de activación anterior, este mecanismo de acción eliminaría la necesidad de competir con los receptores endógenos de alta afinidad por la unión del ligando. Además, debido a que las actividades inhibidoras de estos anticuerpos se localizan en el sitio de la enfermedad asociada con una activación aumentada de TGFβ1 (p. ej., nicho desregulado dentro de la ECM), se prevé que estos anticuerpos deberían lograr una eficacia mejorada al tiempo que limitan los efectos secundarios.

[0325] En algunas formas de realización, el complejo de LTBP1-TGFβ1 o el complejo de LTBP3-TGFβ1 es un componente de la matriz extracelular. El extremo N-terminal de las LTBP puede unirse covalentemente a la ECM mediante un enlace isopéptido, cuya formación puede ser catalizada por transglutaminasas. Se cree que la integridad estructural de la ECM es importante en la mediación de la actividad de TGFβ1 asociada a LTBP. Por ejemplo, la rigidez de la matriz puede afectar significativamente la activación de TGFβ1. Además, la incorporación de fibronectina y/o fibrilina en el armazón puede aumentar significativamente la activación de TGFβ1 mediada por LTBP. De manera similar, la presencia de fibronectina y/o fibrilina en los ensayos de LTBP (p. ej., ensayos de potencia basados en células) puede aumentar una ventana de ensayo. En algunas formas de realización, la matriz extracelular comprende fibrilina y/o fibronectina. En algunas formas de realización, la matriz extracelular comprende una proteína que comprende un motivo RGD.

[0326] Por tanto, los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 proporcionados en este documento permiten una potente inhibición de cada uno de los contextos biológicos de la función de TGFβ1, a saber, el brazo GARP, el brazo LRRC33 y el brazo LTBP1/3.

Selección de indicaciones terapéuticas y/o sujetos que probablemente respondan a una terapia que comprende un inhibidor selectivo de TGFβ1 de alta afinidad

[0327] Se pueden hacer tres preguntas en cuanto a la identificación/cribado/selección de indicaciones adecuadas y/o poblaciones de pacientes para las cuales es probable que los inhibidores selectivos de isoforma de alta afinidad de TGFβ1, como los descritos en este documento, tengan beneficios terapéuticos ventajosos: i) si la enfermedad es impulsada por o depende predominantemente de la isoforma TGFβ1 sobre las otras isoformas en humano (o al menos codominante); ii) si la afección (o tejido afectado) está asociado con un fenotipo inmunosupresor; y, iii) si la enfermedad implica la función del TGFβ1 asociada tanto a la matriz como asociada a las células.

[0328] La expresión diferencial de las tres isoformas TGFβ conocidas, a saber, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, se ha observado bajo condiciones normales (sanas; homeostáticas), así como de la enfermedad en diversos tejidos. Sin embargo, el concepto de selectividad de isoformas no se ha explotado por completo ni se ha logrado de manera robusta con enfoques convencionales que favorecen la inhibición parcial de TGFβ a través de múltiples isoformas. Además, los patrones de expresión de las isoformas pueden regularse diferencialmente, no solo en condiciones normales (homeostáticas) frente a anormales (patológicas), sino también en diferentes subpoblaciones de pacientes. Debido a que la mayoría de los estudios preclínicos se llevan a cabo en un número limitado de modelos animales, que pueden o no recapitular las condiciones humanas, los datos obtenidos con el uso de dichos modelos pueden estar sesgados, dando lugar a malas interpretaciones de los datos o conclusiones engañosas en cuanto a la traducibilidad a los efectos de desarrollo de terapias.

[0329] En consecuencia, la presente divulgación incluye el reconocimiento de que la expresión diferencial de las isoformas de TGFβ en modelos animales preclínicos debe tenerse en cuenta al predecir la eficacia de fármacos candidatos particulares (p. ej., inhibidores de TGFβ1), así como al interpretar datos preclínicos en cuanto a la traducibilidad en condiciones humanas.

[0330] Los análisis previos de muestras de tumores humanos implicaron la señalización de TGFβ como un contribuyente importante a la resistencia primaria a la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, incluyendo la terapia de punto de control de bloqueo ("CBT") de varios tipos de tumores malignos. Los estudios publicados en la literatura revelan que la expresión del gen TGFB puede ser particularmente relevante para la resistencia al tratamiento, lo que sugiere que la actividad de esta isoforma puede estar impulsando la señalización del TGFβ en estas enfermedades. Como se detalla en el Ejemplo 17, en la mayoría de los tipos de tumores humanos perfilados en The Cancer Genome Atlas (TCGA), la expresión de TGFB1 parece ser la más prevalente, lo que sugiere que puede ser beneficiosa la selección de modelos preclínicos que recapitulan más de cerca los patrones de expresión de enfermedades humanas de las isoformas de TGFβ.

[0331] Como se ejemplifica en el presente documento, TGFβ1 y TGFβ3 son co-dominantes (co-expresados en niveles similares) en ciertos modelos de cáncer singénico murinos (p. ej., EMT-6 y 4T1) que se utilizan ampliamente en los estudios preclínicos (véanse la **FIG. 25D**). Por el contrario, muchos otros modelos de cáncer (p. ej., S91, B16 y MBT-2) expresan casi exclusivamente TGFβ1, similar al observado en muchos tumores humanos, en los que TGFβ1 parece ser con más frecuencia la isoforma dominante sobre TGFβ2/3 (véanse las **FIGS. 25B y 25C**). Además, la isoforma o isoformas de TGFβ expresadas predominantemente en condiciones homeostáticas pueden no ser las isoformas asociadas a la enfermedad. Por ejemplo, en los tejidos pulmonares normales de ratas sanas, la señalización tónica del TGFβ parece estar mediada principalmente por el TGFβ3. Sin embargo, el TGFβ1 parece regularse notablemente al alza en condiciones patológicas, como la fibrosis pulmonar. Tomados en conjunto, aunque no es un requisito previo, puede ser beneficioso probar o confirmar la expresión relativa de las isoformas de TGFβ en muestras clínicas para seleccionar agentes terapéuticos adecuados a los que es probable que responda el paciente. En algunas formas de realización, la determinación de la expresión de isoformas relativas se puede realizar después del tratamiento. En tales circunstancias, la capacidad de respuesta de los pacientes (p. ej., respuesta clínica/beneficio) en respuesta a la terapia de inhibición de TGFβ1 puede correlacionarse con los niveles de expresión relativos de las isoformas de TGFβ. En algunas formas de realización, la sobreexpresión de la isoforma de TGFβ1 mostrada *ex post facto* se correlaciona con una mayor capacidad de respuesta al tratamiento.

[0332] Como se describe en el presente documento, los inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas son particularmente ventajosos para el tratamiento de enfermedades en las que la isoforma de TGFβ1 se expresa predominantemente con relación a las otras isoformas (p. ej., se hace referencia como TGFβ1-dominante). Como ejemplo, se proporciona una lista no limitante de muestras clínicas de cáncer humano con niveles de expresión relativa de TGFβ1 (izquierda), TGFβ2 (*centro*) y TGFβ3 (*derecha*) en **FIGS. 25B y 25C**. Cada línea horizontal a través de las tres isoformas representa un solo paciente. Como se puede ver, la expresión general de TGFβ1 (TGFβ1) es significativamente mayor en la mayoría de estos tumores/cánceres humanos que las otras dos isoformas en muchos tipos de tumores/cáncer, lo que sugiere que la inhibición selectiva de TGFβ1 puede ser beneficiosa en estos tipos de enfermedades. En conjunto, estas líneas de evidencia apoyan la noción de que la inhibición selectiva de la actividad de TGFβ1 puede superar la resistencia primaria a CBT. La generación de inhibidores de TGFβ1 altamente selectivos también permitirá la evaluación de si tal enfoque abordará los problemas de seguridad clave observados con la inhibición de pan-TGFβ, que será importante para la evaluación de su utilidad terapéutica.

[0333] Ciertas excepciones deben tenerse en cuenta, sin embargo. Primero, esta tendencia no siempre es aplicable a ciertos pacientes individuales dentro del tipo de enfermedad. Es decir, incluso en un tipo de cáncer que muestra una dominancia de TGFβ1 *casi* uniforme sobre TGFβ2/3 en general, hay algunos individuos que no siguen esta regla general, como se representa en la **FIG. 25C**. Por lo tanto, los pacientes que pertenecen a la subpoblación minoritaria pueden no responder a una terapia con inhibidores específicos de la isoforma de TGFβ1 de la manera que funciona para la mayoría de los pacientes. En segundo lugar, hay algunos tipos de cáncer en donde TGFβ1 es *co-dominante* con otra isoforma o en donde TGFβ2 y/o TGFβ3 de expresión es significativamente mayor que TGFβ1. En estas situaciones, no es probable que inhibidores selectivos de TGFβ1 como los descritos en el presente documento sean eficaces si se usan solos. Más bien, se pueden emplear inhibidores adicionales adecuados que se dirijan a otras isoformas en conjunto (véanse, por ejemplo, WO 2016/201282). Sin embargo, para tratar las toxicidades potencialmente graves, deben evitarse los inhibidores de pan-TGFβ, así como los inhibidores que antagonizan tanto al TGFβ2 como al TGFβ3.

[0334] Por ejemplo, en enfermedades (como ciertos tipos de carcinoma y sarcoma) o pacientes individuales donde TGFβ1 es codominante (p. ej., coexpresado a niveles similares) con TGFβ3 (p. ej., como se muestra por análisis de biopsia), el régimen terapéutico adecuado puede incluir tanto un inhibidor de TGFβ1 como un inhibidor de TGFβ3. Preferiblemente, cada uno de los inhibidores es un inhibidor selectivo de isoformas, para evitar efectos secundarios no deseados o toxicidades asociadas con la inhibición de todas las isoformas del TGFβ. En algunas formas de realización, uno o ambos inhibidores selectivos de isoformas inhiben el paso de activación de la isoforma TGFβ (p. ej., TGFβ1 y/o TGFβ3). El inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas puede ser un inhibidor de activación independiente del contexto de alta afinidad descrito en el presente documento. El inhibidor de TGFβ3 selectivo para isoformas puede ser un inhibidor de activación de TGFβ3 independiente del contexto, elaborado mediante el proceso que comprende el paso de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un complejo proTGFβ3. Normalmente, dicho proceso incluye además la selección o confirmación del anticuerpo o fragmento para la capacidad de unirse a múltiples complejos de antígenos, por ejemplo, LTBP1-proTGFβ3, LTBP3-proTGFβ3, GARP-proTGFβ3 y/o LRRC33-proTGFβ3. Preferiblemente, dicho proceso incluye además la selección o confirmación del anticuerpo o fragmento para la capacidad de inhibir la liberación del factor de crecimiento (TGFβ3) del complejo latente (es decir, inhibición de la activación).

[0335] Cuando los regímenes terapéuticos adecuados incluyen dos inhibidores de TGFβ selectivo de isoformas, tales como TGFβ1 y TGFβ3 (como en el ejemplo anterior), dicha terapia puede comprender una única formulación que incluye inhibidores tanto TGFβ1 como TGFβ3. Tal formulación puede contener, por ejemplo, 10-50 mg/ml de cada inhibidor y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0336] Alternativamente, dicha terapia puede comprender el uso de dos formulaciones separadas, comprendiendo cada uno un único inhibidor para la administración a un paciente o población de pacientes. Esto ofrece una mayor flexibilidad para ajustar las proporciones de las dos dosis de inhibidor que se administrarán al paciente o la población de pacientes,

dependiendo de (y adaptado a) los niveles de expresión relativa (por encima de los niveles saludables) de las dos isoformas de TGF β que se muestran presentes en una o más muestras biológicas recogidas del paciente o de la población de pacientes. Por ejemplo, para su uso en el tratamiento de cáncer/tumores de TGF β 1 positivo, TGF β 3 positivo (como cáncer de mama), donde el primero es la isoforma asociada a la enfermedad dominante en relación con el segundo, el inhibidor de TGF β 1 puede utilizarse en dosis más altas y/o de mayor duración como parte de los regímenes terapéuticos.

[0337] Por lo tanto, es beneficioso comprobar o confirmar niveles relativos de expresión de las tres isoformas de TGF β (es decir, TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3) en muestras clínicas recogidas de pacientes individuales. Dicha información puede proporcionar una mejor predicción sobre la efectividad de una terapia particular en pacientes individuales o poblaciones de pacientes, lo que puede ayudar a asegurar la selección del régimen de tratamiento apropiado (p. ej., tratamiento individualizado/personalizado) para aumentar la probabilidad de una respuesta clínica.

[0338] Más recientemente, los inventores de la presente solicitud han realizado un descubrimiento inesperado de que un inhibidor selectivo de TGF β 1 de alta afinidad (p. ej., Ab6), que se utiliza en conjunción con un inhibidor de punto de control (p. ej., anticuerpo anti-PD-1), es capaz de causar una regresión tumoral significativa en el modelo EMT-6, que se sabe que expresa tanto TGF β 1 como TGF β 3 en niveles similares. La co-dominancia se ha confirmado mediante mediciones de ARN y ensayos ELISA (véase la **FIG. 41**). Esta observación es sorprendente porque se había planteado previamente la hipótesis de que para lograr una eficacia material en tumores TGF β 1 positivos, TGF β 3 positivos en un contexto de bloqueo de punto de control, ambas isoformas codominantes tendrían que inhibirse específicamente. Inesperadamente, sin embargo, un inhibidor selectivo de TGF β 1 solo (junto con anti-PD-1), sin un inhibidor selectivo de TGF β 3, es suficiente para superar la resistencia primaria a CBT y lograr eficacia in vivo en la reducción del volumen tumoral y mejorar el beneficio de supervivencia (véase el ejemplo 24). Sin estar ligado a una teoría particular, esto puede deberse a que TGF β 1 es la isoforma que verdaderamente conduce a la enfermedad, aunque TGF β 3 se coexpresa en el tumor. Otra posibilidad es que la inhibición de TGF β 1 provoque una regulación negativa de TGF β 3 corriente abajo. También es posible que las dos isoformas estén sujetas a una regulación temporal y/o espacial diferencial. Por ejemplo, las dos isoformas se pueden localizar en compartimentos celulares o tisulares discretos. Adicional o alternativamente, sigue siendo posible que un inhibidor potente del TGF β 1, usado junto con un inhibidor del punto de control, pueda ser suficiente para superar el umbral inmunosupresor. Por consiguiente, la invención incluye el uso de inhibidor de TGF β 1 para promover la regresión tumoral, donde el tumor es TGF β 1+/TGF β 3+. Dicho tumor puede incluir, por ejemplo, cánceres de origen epitelial, es decir, carcinoma (p. ej., carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma ductal in situ (DCIS), carcinoma ductal invasivo y adenocarcinoma). En algunas formas de realización, TGF β 1 es predominantemente la isoforma asociada a la enfermedad, mientras que TGF β 3 apoya la función homeostática en el tejido, tal como epitelios.

[0339] Ciertos tumores, tales como diversos carcinomas, se pueden caracterizar como tumores de baja carga mutacional (MBT). Estos tumores son a menudo poco inmunogénicos y no provocan una respuesta suficiente de las células T. Las terapias contra el cáncer que incluyen quimioterapia, radioterapia, vacunas contra el cáncer y/o virus oncolíticos pueden ser útiles para inducir la inmunidad de las células T en dichos tumores. Por lo tanto, la terapia de inhibición de TGF β 1 detallada en este documento puede usarse junto con una o más de estas terapias contra el cáncer para aumentar los efectos antitumorales. Esencialmente, tal terapia de combinación tiene como objetivo convertir tumores "fríos" (p. ej., tumores poco inmunogénicos) en tumores "calientes" promoviendo neoantígenos y facilitando que las células efectoras ataquen el tumor. Los ejemplos de tales tumores incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de páncreas, por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Por consiguiente, uno o más de los anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar un tumor poco inmunogénico ("tumor frío") sensibilizado con una terapia contra el cáncer destinada a promover la inmunidad de las células T.

[0340] En los tumores inmuno-excluidos donde se mantienen alejadas las células T efectoras desde el sitio de tumor (de ahí "excluidos"), el ambiente del tumor inmunosupresor puede ser mediado de un modo dependiente de TGF β 1. Estos son tumores que son típicamente inmunogénicos; sin embargo, las células T no pueden infiltrarse suficientemente, proliferar y provocar sus efectos citotóxicos debido al entorno inmunodeprimido. Por lo general, estos tumores responden mal a las terapias contra el cáncer, como las TCC. Como sugieren los datos proporcionados en este documento, la terapia adjunta que comprende un inhibidor de TGF β 1 puede superar el fenotipo inmunosupresor, permitiendo la infiltración de células T, la proliferación y la función antitumoral, haciendo que dicho tumor responda mejor a la terapia del cáncer como CBT.

[0341] Por lo tanto, la segunda consulta se señala a la identificación o selección de pacientes que tienen tumor(es) inmunosupresor(es), que son susceptible(s) de beneficiarse de una terapia de inhibidor TGF β 1. La presencia o el grado de frecuencias de células T efectoras en un tumor es indicativo de inmunidad antitumoral. Por tanto, la detección de células antitumorales como las células CD8+ en un tumor proporciona información útil para evaluar si el paciente puede beneficiarse de una terapia inhibidora de CBT y/o TGF β 1.

[0342] La detección se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos tales como análisis inmunohistoquímico de muestras de biopsia de tumor. Más recientemente, se están desarrollando métodos de formación de imágenes no invasivos que permitirán la detección de células de interés (p. ej., células T citotóxicas) in vivo. Consulte, por ejemplo, <http://www.imaginab.com/technology/>; Tavare et al. (2014) PNAS, 111 (3): 1108-1113; Tavare et al. (2015) J Nucl Med 56

(8): 1258-1264; Rashidian et al. (2017) J Exp Med 214 (8): 2243-2255; Beckford Vera et al. (2018) PLoS ONE 13(3): e0193832; y Tavare et al. (2015) Cancer Res 76 (1): 73-82. Normalmente, los anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos diseñados con un resto de detección (p. ej., radiomarcaje) se pueden infundir en un paciente, que luego se distribuirán y localizarán en los sitios del marcador particular (p. ej., CD8+). De esta forma, es posible determinar si el tumor tiene un fenotipo inmune excluido. Si se determina que el tumor tiene un fenotipo inmune excluido, la terapia contra el cáncer (como la TCC) sola puede no ser eficaz porque el tumor carece de suficientes células citotóxicas en el entorno del tumor. La terapia complementaria con un inhibidor de TGFβ1, como los descritos en el presente documento, puede reducir la inmunosupresión, haciendo que el tumor resistente a la terapia del cáncer sea más sensible a una terapia del cáncer.

[0343] Técnicas de imagen in vivo no invasivas se pueden aplicar en una variedad de métodos adecuados para los propósitos de diagnóstico de los pacientes; seleccionar o identificar pacientes que probablemente se beneficien de la terapia con inhibidores de TGFβ1; y/o monitorizar a los pacientes para determinar la respuesta terapéutica tras el tratamiento. Cualquier célula con un marcador de superficie celular conocido puede detectarse/localizarse mediante el empleo de un anticuerpo o moléculas similares que se unen específicamente al marcador celular. Normalmente, las células que se van a detectar mediante el uso de tales técnicas son células inmunitarias, tales como linfocitos T citotóxicos, células T reguladoras, MDSC, macrófagos asociados a tumores, células NK, células dendríticas y neutrófilos. Los anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos modificadas genéticamente que reconocen dichos marcadores se pueden acoplar a un resto de detección.

[0344] Los ejemplos no limitantes de marcadores de células inmunitarias adecuados incluyen marcadores de monocitos, marcadores de macrófagos (p. ej., marcadores de macrófagos M1 y/o M2), marcadores de CTL, marcadores de células inmunitarias supresoras, marcadores MDSC (p. ej., marcadores para MDSC G y/o M), que incluyen, entre otros: CD8, CD3, CD4, CD11b, CD163, CD206, CD68, CD14, CD15, CD66, CD34, CD25 y CD47.

[0345] En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende el seguimiento de células T, como las células T CD8-positivas citotóxicas. En consecuencia, cualquiera de los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 de la presente divulgación puede usarse en el tratamiento del cáncer en un sujeto con un tumor sólido, en donde el tratamiento comprende: i) llevar a cabo un análisis de imágenes in vivo para detectar células T en el sujeto, en donde opcionalmente las células T son células T CD8+, y si se determina que el tumor sólido es un tumor sólido inmuno-excluido según el análisis de imágenes in vivo del paso (i), entonces, administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de TGFβ1. En algunas formas de realización, el sujeto ha recibido una TCC, en donde opcionalmente el tumor sólido es resistente a la TCC. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una CBT junto con el inhibidor de TGFβ1, como una terapia de combinación. La combinación puede comprender la administración de una única formulación que comprende tanto un inhibidor de punto de control como un inhibidor de TGFβ1. Alternativamente, la terapia de combinación puede comprender la administración de una primera formulación que comprende un inhibidor de punto de control y una segunda formulación que comprende un inhibidor de TGFβ1.

[0346] En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende el seguimiento de MDSC, tal como G-MDSCs (también conocidos como PMNMDSCs) y M-MDSCs. Por ejemplo, las MDSC pueden enriquecerse en un sitio de la enfermedad (como tejidos fibróticos y tumores sólidos) en la línea de base. Tras la terapia (p. ej., terapia con inhibidor de TGFβ1), se pueden observar menos MDSC, medidas por la intensidad reducida del marcador (tal como radioisótopo y fluorescencia), indicativo de efectos terapéuticos.

[0347] En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende el seguimiento o localización de las células positivas para LRRC33. Las células positivas para LRRC33 incluyen, por ejemplo, MDSC y macrófagos de tipo M2 activados (p. ej., TAM y macrófagos activados asociados con tejidos fibróticos). Por ejemplo, las células positivas para LRRC33 pueden enriquecerse en un sitio de la enfermedad (como tejidos fibróticos y tumores sólidos) en la línea de base. Tras la terapia (p. ej., terapia con inhibidor de TGFβ1), se pueden observar menos células que expresan LRRC33 de la superficie celular, según se mide por la intensidad reducida del marcador (tal como radioisótopo y fluorescencia), indicativo de efectos terapéuticos.

[0348] En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende el uso de PET-SPECT, MRI y/o óptica de fluorescencia/bioluminiscencia con el fin de detectar diana de interés (p. ej., moléculas o entidades que se pueden unir por el reactivo marcado, tales como células y tejidos que expresan marcadores apropiados).

[0349] En algunas formas de realización, el etiquetado de anticuerpos o moléculas de tipo anticuerpos como con un resto de detección puede comprender el marcado directo o marcaje indirecto.

[0350] En algunas formas de realización, el resto de detección puede ser un trazador. En algunas formas de realización, el trazador puede ser un radioisótopo, en donde opcionalmente el radioisótopo puede ser un isótopo emisor de positrones. En algunas formas de realización, el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en: ¹⁸F, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸F y ⁸⁹Zr.

[0351] Por lo tanto, se pueden emplear tales métodos para llevar a cabo la formación de imágenes in vivo con el uso de

anticuerpos marcados en inmune-PET.

[0352] En algunas formas de realización, tal formación de imágenes in vivo se lleva a cabo para el control de una respuesta terapéutica a la terapia de inhibición TGFβ1 en el sujeto. Por ejemplo, la respuesta terapéutica puede comprender la conversión de un tumor inmuno-excluido en un tumor inflamado, lo que se correlaciona con un aumento de la infiltración de células inmunitarias en un tumor. Esto puede visualizarse mediante un aumento de la frecuencia de las células inmunitarias intratumorales o el grado de señales de detección, como el radiomarcaje y la fluorescencia.

[0353] En consecuencia, la invención incluye un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, para su uso en un método para tratar el cáncer que puede comprender las siguientes etapas: i) seleccionar un paciente diagnosticado con cáncer que comprende un tumor sólido, en donde el tumor sólido es o se sospecha que es un tumor inmuno-excluido; y ii) administrar al paciente el anticuerpo o el fragmento en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. En algunas formas de realización, el paciente ha recibido o es un candidato para recibir una terapia contra el cáncer, como terapias de inhibición de puntos de control inmunológico (p. ej., anticuerpos PD-(L)1), quimioterapias, radioterapias, terapias con células inmunitarias diseñadas y terapias con vacunas contra el cáncer. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende la detección de células inmunitarias o uno o más marcadores de las mismas, en donde opcionalmente la detección comprende un análisis de biopsia tumoral, análisis de marcadores de suero y/o formación de imágenes in vivo.

[0354] En algunas formas de realización, el paciente es diagnosticado con cáncer para el que se ha aprobado un CBT, en donde opcionalmente, estadísticamente una población de pacientes similar con el cáncer en particular muestra tasas de respuesta relativamente bajas a la CBT aprobada, por ejemplo, menos de 25%. Por ejemplo, las tasas de respuesta para la CBT pueden estar entre aproximadamente el 10-25%, por ejemplo aproximadamente el 10-15%. Dicho cáncer puede incluir, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer gástrico y cáncer de mama triple negativo. El inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad puede usarse en el tratamiento de dicho cáncer, cuando el sujeto aún no ha recibido una TCC. El inhibidor de TGFβ1 se puede administrar al sujeto en combinación con una CBT. En algunas formas de realización, el sujeto puede recibir o puede haber recibido terapia adicional contra el cáncer, como quimioterapia y radioterapia.

[0355] Pueden emplearse técnicas de formación de imágenes in vivo descritas anteriormente para detectar, localizar y/o rastrear ciertas MDSC en un paciente diagnosticado con una enfermedad asociada a TGFβ1, tal como cáncer y fibrosis. Los individuos sanos tienen una frecuencia baja o nula de MDSC en circulación. Con el inicio o la progresión de dicha enfermedad, pueden detectarse niveles elevados de MDSC circulantes y/o localizadas por la enfermedad. Por ejemplo, se ha informado que las M-MDSC positivas para CCR2 se acumulan en los tejidos con inflamación y pueden causar la progresión de la fibrosis en el tejido (como la fibrosis pulmonar), y se ha demostrado que esto se correlaciona con la expresión de TGFβ1. De manera similar, las MDSC están enriquecidas en varios tumores sólidos (incluido el cáncer de mama triple negativo) y contribuyen en parte al fenotipo inmunosupresor de la TME. Por lo tanto, la respuesta del tratamiento a la terapia de inhibición de TGFβ1 de acuerdo con la presente divulgación puede controlarse localizando o rastreando las MDSC. La reducción o la baja frecuencia de las MDSC detectables suelen indicar beneficios terapéuticos o un mejor pronóstico.

[0356] Por lo tanto, el inhibidor de TGFβ1 de activación puede ser utilizado en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde el cáncer se caracteriza por la supresión inmune, en donde el cáncer comprende opcionalmente un tumor sólido que es TGFβ1 positivo y TGFβ3 positivo. Tal sujeto puede ser diagnosticado con carcinoma. En algunas formas de realización, el carcinoma es carcinoma de mama, en donde opcionalmente el carcinoma de mama es cáncer de mama triple negativo (TNBC). Dicho tratamiento puede comprender además una terapia del cáncer, incluyendo, sin limitación, quimioterapias, terapias de radiación, vacunas contra el cáncer, terapias con células inmunitarias modificadas (tales como CAR-T), y terapias inmunológicas de punto de control de bloqueo, tales como anticuerpos anti-PD(L)-1.

[0357] En algunas formas de realización, se identifica un tumor frío, en donde pocas células efectoras están presentes o se sabe que es un tipo de cáncer caracterizado como poco inmunogénico. Un sujeto/paciente con tal tumor se trata con una terapia de cáncer inmunosensibilizante, como quimioterapia, radioterapia, terapia viral oncolítica y vacuna contra el cáncer, para provocar una respuesta de células T más fuerte a los antígenos tumorales (p. ej., neoantígenos). Este paso puede convertir el tumor frío en un tumor "inmuno-excluido". El sujeto opcionalmente recibe además un CBT, como anti-PD-(L)1. El sujeto se trata además con un inhibidor de TGFβ1, tal como los anticuerpos descritos en este documento. Esto puede convertir el tumor frío o inmuno-excluido en un tumor "inflamado" o "caliente", lo que confiere capacidad de respuesta a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres pobremente inmunogénicos incluyen cáncer de mama (como TNBC), cáncer de próstata (como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC)) y cáncer de páncreas (como adenocarcinoma de páncreas (PDAC)).

[0358] Como se muestra en la **FIG. 5B**, inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 de la presente invención, tales como Ab6, pueden inhibir la activación inducida por Plasmina de TGFβ1. El eje plasmina-plasminógeno ha sido implicado en cierta tumorigénesis, invasión y/o metástasis, de varios tipos de cáncer, carcinoma en particular, como el cáncer de mama. Por lo tanto, es posible que los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1, como los descritos aquí, puedan ejercer los efectos inhibidores a través de este mecanismo en tumores o modelos tumorales, como EMT6, que involucran a los epitelios. De hecho, la destrucción o remodelación del epitelio dependiente de plasmina puede contribuir a la patogénesis de afecciones que involucran lesiones epiteliales e invasión/diseminación

del carcinoma. Este último puede desencadenarse por una transición epitelial a mesenquimatosa ("EMT"). Se ha informado que la activación del plasminógeno y la invasión dependiente del plasminógeno fueron más prominentes en las células de tipo epitelial y fueron dictadas en parte por la expresión de S100A10 y PAI-1 (Bydoun et al. (2018) Scientific Reports, 8: 14091).

[0359] La descripción incluye un método para seleccionar una población de pacientes o un sujeto que es probable que responda a una terapia que comprende un inhibidor de TGFβ1 específico a isoforma de alta afinidad. Dicho método puede comprender los pasos de: proporcionar una muestra biológica (p. ej., muestra clínica) recogida de un sujeto, determinar (p. ej., medir o analizar) los niveles relativos de TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 en la muestra, y, administrar al sujeto una composición que comprende el inhibidor de TGFβ1, si TGFβ1 es la isoforma dominante sobre TGFβ2 y TGFβ3; y/o, si TGFβ1 se sobreexpresa o aumenta significativamente en comparación con el control. En algunos casos, comprendiendo dicho método las etapas de: obtener información sobre los niveles de expresión relativos de TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 que se determinó previamente; identificar un sujeto que tiene una enfermedad positiva para TGFβ1, preferiblemente de TGFβ1 dominante; y administrar al sujeto una composición que comprende un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma. En algunos casos, dicho sujeto tiene una enfermedad (como el cáncer) que es resistente a una terapia (como la terapia del cáncer). En algunos casos, dicho sujeto muestra intolerancia a la terapia y, por lo tanto, la ha interrumpido o es probable que la interrumpa. La adición del inhibidor de TGFβ1 al régimen terapéutico puede permitir reducir la dosis de la primera terapia y aún así lograr beneficios clínicos en combinación. En algunos casos, el inhibidor de TGFβ1 puede retrasar o reducir la necesidad de cirugías.

[0360] Los niveles relativos de las isoformas pueden ser determinados por ensayos basados en ARN y/o ensayos basados en proteínas, que son bien conocidos en la técnica. En algunos casos, el paso de administración también puede incluir otra terapia, como inhibidores de puntos de control inmunitarios u otros agentes proporcionados en otra parte de la presente. Dichos métodos pueden incluir opcionalmente un paso de evaluación de una respuesta terapéutica controlando los cambios en los niveles relativos de TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 en dos o más puntos de tiempo. En algunos casos, las muestras clínicas (como las biopsias) se recogen antes y después de la administración. En algunos casos, las muestras clínicas (como las biopsias) se recogen varias veces después del tratamiento para evaluar los efectos in vivo a lo largo del tiempo.

[0361] Además de las investigaciones anteriores, la tercera consulta investiga la amplitud de la función de TGFβ1 implicada en una enfermedad particular. Esto puede estar representado por el número de *contextos* de TGFβ1, a saber, qué molécula(s) presentadora(s) median la función del TGFβ1 asociada a la enfermedad. Los inhibidores de contexto amplio, específicos de TGFβ1, tales como inhibidores independientes del contexto, son ventajosos para el tratamiento de enfermedades que implican tanto un componente de ECM como un componente inmunitario de la función de TGFβ1. Dicha enfermedad puede estar asociada con una desregulación en la ECM así como con una perturbación en la función de las células inmunitarias o la respuesta inmunitaria. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 descritos en este documento son capaces de dirigirse al TGFβ1 asociado a ECM (p. ej., presentado por LTBP1 o LTBP3) así como al TGFβ1 asociado a células inmunitarias (p. ej., presentado por GARP o LRRC33). Dichos inhibidores inhiben las cuatro dianas terapéuticas: TGFβ1 pro/latente asociado a GARP; TGFβ1 pro/latente asociado a LRRC33; TGFβ1 pro/latente asociado a LTBP1; y TGFβ1 pro/latente asociado a LTBP3, para inhibir ampliamente la función de TGFβ1 en estos contextos.

[0362] Se puede evaluar si una condición particular de un paciente implica o está impulsada por múltiples aspectos de la función del TGFβ1 evaluando los perfiles de expresión de las moléculas de presentación, en una muestra clínica recogida del paciente. Se conocen varios ensayos en la técnica, incluidos ensayos basados en ARN y ensayos basados en proteínas, que se pueden realizar para obtener perfiles de expresión. Los niveles de expresión relativos (y/o cambios/alteraciones de los mismos) de LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33 en la muestra o muestras pueden indicar la fuente y/o el contexto de las actividades de TGFβ1 asociadas con la afección. Por ejemplo, una muestra de biopsia tomada de un tumor sólido puede exhibir una alta expresión de las cuatro moléculas presentadoras. Por ejemplo, LTBP1 y LTBP3 pueden estar altamente expresados en CAF dentro del estroma tumoral, mientras que GARP y LRRC33 pueden ser altamente expresados por células inmunitarias asociadas a tumores, como Tregs e infiltradas de leucocitos, respectivamente.

[0363] Por consiguiente, la divulgación incluye un método para determinar (p. ej., probar o confirmar) la participación de TGFβ1 en la enfermedad, en relación con TGFβ2 y TGFβ3. En algunos casos, el método comprende además un paso de: identificación de una fuente (o contexto) de TGFβ1 asociado a la enfermedad. En algunos casos, la fuente/contexto se evalúa determinando la expresión de moléculas presentadoras de TGFβ, por ejemplo, LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33 en una muestra clínica tomada de los pacientes. En algunos casos, estos métodos se llevan a cabo *Ex post facto*.

[0364] Con respecto a las células positivas para LRRC33, el solicitante de la presente divulgación ha reconocido que puede haber una discrepancia significativa entre la expresión de ARN y la expresión de proteína de LRRC33. En particular, aunque algunos tipos de células seleccionados parecen expresar LRRC33 a nivel de ARN, solo un subconjunto de tales células expresa la proteína LRRC33 en la superficie celular. Se contempla que la expresión de LRRC33 puede estar altamente regulada a través del tráfico/localización de proteínas, por ejemplo, en términos de inserción en la membrana plasmática e internalización rápida. Por lo tanto, en casos preferidos, la expresión de la proteína LRRC33 puede usarse como un marcador asociado con un tejido enfermo (tal como tejido tumoral y fibrótico) enriquecido, por ejemplo, con

macrófagos activados/similares a M2 y MDSC.

Indicaciones relacionadas con TGF β

5 **Características generales de indicaciones relacionadas con TGF β 1**

[0365] Inhibidores de TGF β 1 selectivos para isoformas, tales como los descritos en el presente documento, se pueden utilizar para tratar una amplia variedad de enfermedades, trastornos y/o condiciones que son asociadas con la desregulación de TGF β 1 (es decir, "*indicaciones relacionadas con TGF β 1*") en sujetos humanos. Como se usa en este documento, "enfermedad (trastorno o condición) asociada con la desregulación de TGF β 1" o "indicación relacionada con TGF β 1" significa cualquier enfermedad, trastorno y/o afección relacionada con la expresión, actividad y/o metabolismo de un TGF β 1 o cualquier enfermedad, trastorno y/o afección que pueda beneficiarse de la inhibición de la actividad y/o los niveles de TGF β 1.

[0366] Por consiguiente, la presente invención incluye el uso de un inhibidor de TGF β 1 específico de isoforma de alta afinidad en un método para tratar una indicación relacionada con TGF β 1 en un sujeto humano. Dicho inhibidor se formula típicamente en una composición farmacéutica que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Ventajosamente, el inhibidor se dirige al TGF β 1 dentro de matrices extracelulares y al TGF β 1 asociado a células que media la inmunosupresión, pero no se dirige al TGF β 2 o TGF β 3 in vivo. En algunas formas de realización, el inhibidor inhibe el paso de activación de TGF β 1. La enfermedad puede caracterizarse por desregulación o deterioro en al menos dos de los siguientes atributos:

a) células T reguladoras (Treg); b) proliferación o función de células T efectoras (Teff); c) proliferación o diferenciación de células mieloides; d) reclutamiento o diferenciación de monocitos; e) función de los macrófagos; f) transición epitelial a mesenquimatoso (EMT) y/o transición endotelial a mesenquimatoso (EndMT); g) expresión génica en uno o más de los genes marcadores seleccionados del grupo que consiste en: PAI-1, ACTA2, CCL2, Col1a1, Col3a1, FN-1, CTGF y TGFB1; h) componentes o función del ECM; i) diferenciación de fibroblastos. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tal inhibidor al sujeto que padece o se le diagnostica la enfermedad.

[0367] En algunas formas de realización, la enfermedad implica la desregulación o deterioro de los componentes o función de ECM que muestran una mayor deposición de colágeno I. En algunas formas de realización, la desregulación del ECM incluye una mayor rigidez de la matriz. En algunas formas de realización, la desregulación de la ECM implica fibronectina y/o fibrilina.

[0368] En algunas formas de realización, la desregulación o alteración de la diferenciación de fibroblastos comprende miofibroblastos o células de tipo miofibroblastos aumentados. En algunas formas de realización, los miofibroblastos o células similares a miofibroblastos son fibroblastos asociados al cáncer (CAF). En algunas formas de realización, los CAF están asociados con un estroma tumoral y pueden producir CCL2/MCP-1 y/o CXCL12/SDF-1. En algunas formas de realización, los miofibroblastos o células similares a miofibroblastos se localizan en un tejido fibrótico.

[0369] En algunas formas de realización, la desregulación o deterioro de las células T reguladoras comprende un aumento de la actividad de Treg.

[0370] En algunas formas de realización, la desregulación o menoscabo de la proliferación o función de células T efectoras (Teff) comprende proliferación suprimida de células CD8⁺/CD4⁺.

[0371] En algunas formas de realización, la desregulación o menoscabo de proliferación o diferenciación de células mieloides comprende un aumento de la proliferación de células progenitoras mieloides. El aumento de la proliferación de células mieloides puede ocurrir en la médula ósea.

[0372] En algunas formas de realización, la desregulación o menoscabo de diferenciación de monocitos comprende el aumento de la diferenciación de los monocitos derivados de la médula ósea y/o residentes en el tejido en macrófagos en un sitio de la enfermedad, tal como un tejido fibrótico y/o un tumor sólido.

[0373] En algunas formas de realización, la desregulación o menoscabo de monocitos de reclutamiento comprende el aumento de la médula ósea derivada de reclutamiento de monocitos en un sitio de enfermedad tal como TME, lo que lleva a un aumento de la diferenciación de macrófagos y la polarización M2, seguido por el aumento de TAM.

[0374] En algunas formas de realización, la desregulación o deterioro de la función de los macrófagos comprende una mayor polarización de los macrófagos en fenotipos M2.

[0375] En algunas formas de realización, la desregulación o alteración de la proliferación o diferenciación de células mieloides comprende un mayor número de células T reguladoras, MDSCs y/o TANs.

[0376] Las indicaciones relacionadas con TGF β pueden incluir afecciones que comprenden un microambiente de

enfermedad inmunitaria excluida, como un tumor o tejido canceroso que suprime el mecanismo de defensa/inmunidad normal del cuerpo en parte al excluir las células inmunitarias efectoras (p. ej., células T CD4+ y/o CD8+). En algunas formas de realización, tales condiciones inmunoexcluyentes están asociadas con una respuesta deficiente al tratamiento (p. ej., terapia contra el cáncer). Los ejemplos no limitantes de terapias contra el cáncer, a las que los pacientes responden mal, incluyen, pero no se limitan a: terapia con inhibidores de puntos de control, vacunas contra el cáncer, quimioterapia y radioterapia. Sin pretender ceñirse a una teoría particular, se contempla que los inhibidores de TGFβ, como los descritos en este documento, pueden ayudar a contrarrestar la capacidad del tumor para evadir o excluir la inmunidad anticancerosa restaurando el acceso de las células inmunitarias, por ejemplo, células T (p. ej., células CD8+) y macrófagos (p. ej., células F4/80+, macrófagos polarizados en M1) acceden promoviendo la expansión y/o infiltración de células T en el tumor.

[0377] Por tanto, la inhibición de TGFβ puede superar la resistencia al tratamiento (p. ej., resistencia a puntos de control inmunológico, resistencia a la vacuna contra el cáncer, resistencia a CAR-T, resistencia a la quimioterapia, resistencia a la radioterapia, etc.) en un entorno de enfermedad inmuno-excluida (como TME) mediante el desbloqueo y la restauración del acceso de las células T efectoras y las funciones efectoras citotóxicas. Dichos efectos de la inhibición de TGFβ pueden proporcionar además una memoria inmunológica de larga duración mediada, por ejemplo, por células T CD8+.

[0378] En algunas formas de realización, el tumor es poco inmunogénico (p. ej., tumores "desiertos" o "en frío"). Los pacientes pueden beneficiarse de la terapia contra el cáncer que desencadena neoantígenos o promueve la respuesta inmunitaria. Tales terapias incluyen, pero no se limitan a quimioterapia, radioterapia, terapia viral oncolítica, péptidos oncolíticos, inhibidores de tirosina quinasa, vacunas de neoepítipo, anti-CTLA4, inductores de inestabilidad, agentes DDR, activadores de células NK y diversos adyuvantes tales como ligandos/agonistas de TLR. Los inhibidores de TGFβ1, como los descritos en el presente documento, se pueden usar en conjunto para potenciar los efectos de las terapias contra el cáncer. Un modo de acción de los inhibidores de TGFβ1 puede ser normalizar o restaurar la expresión del MHC, promoviendo así la inmunidad de las células T.

[0379] Los ejemplos no limitantes de indicaciones relacionadas con TGFβ incluyen: fibrosis, incluyendo fibrosis de órganos (p. ej., fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis cardíaca/cardiovascular, fibrosis muscular, fibrosis de la piel, fibrosis uterina/endometriosis y fibrosis pulmonar), la esclerodermia, Síndrome de Alport, cáncer (que incluye, entre otros: cánceres de sangre como leucemia, mielofibrosis, mieloma múltiple, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de mama, melanoma maligno, glioblastoma), fibrosis asociada con tumores sólidos (p. ej., desmoplasia de cáncer, tales como melanoma desmoplásico, desmoplasia asociada con cáncer de páncreas y desmoplasia de carcinoma de mama), fibrosis estromal (p. ej., fibrosis estromal de la mama), fibrosis inducida por radiación (p. ej., síndrome de fibrosis por radiación), facilitación de la hematopoyesis rápida después de la quimioterapia, curación ósea, cicatrización de heridas, demencia, mielofibrosis, mielodisplasia (p. ej., síndrome mielodisplásico o SMD), una enfermedad renal (p. ej., enfermedad renal en etapa terminal o ESRD), obstetricia ureteral unilateral (UUO), pérdida y/o degeneración de dientes, síndromes de proliferación endotelial, asma y alergia, trastornos gastrointestinales, anemia del envejecimiento, aneurisma aórtico, indicaciones huérfanas (como el síndrome de Marfan y la enfermedad de Camurati-Engelmann), obesidad, diabetes, artritis, esclerosis múltiple, distrofia muscular, trastornos óseos, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, osteoporosis, osteoartritis, osteopenia, síndromes metabólicos, trastornos nutricionales, atrofia de órganos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y anorexia.

[0380] La evidencia sugiere que las ectonucleotidasas CD39 y CD73 pueden contribuir al menos en parte a niveles elevados de adenosina en condiciones patológicas. En particular, el eje CD39/CD73-TGFP puede desempeñar un papel en la modulación de las células inmunitarias implicadas en la señalización de TGFβ, incluidas las Tregs y las MDSC. Tanto las células T reguladoras (Tregs) como las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) generalmente exhiben fenotipos inmunosupresores. En muchas afecciones patológicas (p. ej., cáncer, fibrosis), estas células se enriquecen en los sitios de la enfermedad y pueden contribuir a crear y/o mantener un entorno inmunosupresor. Esto puede estar mediado al menos en parte por las ectonucleotidasas CD39 y CD73 que juntas participan en la descomposición del ATP en nucleósido adenosina, lo que conduce a concentraciones locales elevadas de adenosina en el entorno de la enfermedad, como el microambiente tumoral y el entorno fibrótico. La adenosina puede unirse a sus receptores expresados en las células diana, como las células T y las células NK, que a su vez suprimen la función antitumoral de estas células diana.

Enfermedades con expresión génica aberrante; biomarcadores

[0381] Se ha observado que la activación anormal de la vía de transducción de señal TGFβ1 en varias condiciones de enfermedad se asocia con la expresión génica alterada de un número de marcadores. Estos marcadores de expresión génica (p. ej., medidos por ARNm) incluyen, entre otros: Serpina 1 (que codifica PAI-1), MCP-1 (también conocida como CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFB1, CTGF, ACTA2 (que codifica α-SMA), SNAI1 (impulsa EMT en fibrosis y metástasis regulando negativamente E-cadherina (Cdh1), MMP2 (metaloproteasa de matriz asociada con EMT), MMP9 (metaloproteasa de matriz asociada con EMT), TIMP1 (metaloproteasa de matriz asociada con EMT), FOXP3 (marcador de inducción de Treg), CDH1 (cadherina E (marcador de células epiteliales) que está regulada negativamente por TGFβ), y CDH2 (cadherina N (marcador de células mesenquimales) que está regulada positivamente por TGFβ). Es interesante que muchos de estos genes están implicados para desempeñar un papel en un conjunto diverso de enfermedades, incluidos varios tipos de fibrosis de órganos, así como en muchos cánceres, que incluyen mielofibrosis. De hecho, se ha sugerido que hay un vínculo fisiopatológico entre las enfermedades fibróticas y la proliferación celular anormal,

tumorigénesis y metástasis. Ver por ejemplo, Cox y Erler (2014) *Clinical Cancer Research* 20 (14): 3637-43 "Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis"; Shiga et al. (2015) *Cancer* 7: 2443-2458 "Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth"; Wynn y Barron (2010) *Semin. Liver Dis.* 30 (3): 245-257 "Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis". Sin desear estar ligados por una teoría particular, los inventores de la presente divulgación contemplan que la vía de señalización del TGFβ1 puede de hecho ser un vínculo clave entre estas patologías amplias.

[0382] La capacidad de las citoquinas quimiotácticas (o quimiocinas) para mediar el reclutamiento de leucocitos (p. ej., monocitos/macrófagos) a los tejidos lesionados o enfermos tiene consecuencias cruciales en la progresión de la enfermedad. Miembros de la familia de quimiocinas C-C, como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), también conocida como CCL2, la proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1α), también conocida como CCL3, y MIP-1β, también conocida como CCL4, y MIP-2α, también conocido como CXCL2, han sido implicados en este proceso.

[0383] Por ejemplo, se cree que MCP-1/CCL2 desempeñan un papel tanto en la fibrosis como en el cáncer. MCP-1/CCL2 se caracteriza como una quimiocina profibrótica y es un quimioatrayente de monocitos, y la evidencia sugiere que puede estar involucrado tanto en el inicio como en la progresión del cáncer. En la fibrosis, se ha demostrado que MCP-1/CCL2 juega un papel importante en la fase inflamatoria de la fibrosis. Por ejemplo, la neutralización de MCP-1 dio como resultado una disminución dramática en la formación de la media luna glomerular y la deposición de colágeno tipo I. De manera similar, la inmunoterapia pasiva con anticuerpos anti-MCP-1 o anti-MIP-1 alfa reduce significativamente la acumulación de fagocitos mononucleares en ratones desafiados con bleomicina, lo que sugiere que MIP-1 alfa y MCP-1 contribuyen al reclutamiento de leucocitos durante la respuesta inflamatoria pulmonar (Smith, *Biol Signals.* 1996 julio-agosto; 5 (4): 223-31, "Chemotactic cytokines mediate leukocyte recruitment in fibrotic lung disease"). Se han informado niveles elevados de MIP-1 alfa en pacientes con fibrosis quística y mieloma múltiple (ver, por ejemplo: Mrugacz et al., *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Jun; 27(6): 491-5), apoyando la noción de que MIP-1α se asocia con respuestas inflamatorias localizadas o sistémicas.

[0384] Las líneas de evidencia apuntan a la participación de las quimiocinas C-C en la progresión/metástasis tumoral. Por ejemplo, MCP-1/CCL2 derivado de tumor puede promover fenotipos "pro-cáncer" en macrófagos. Por ejemplo, en el cáncer de pulmón, se ha demostrado que MCP-1/CCL2 es producida por células estromales y promueve la metástasis. En el cáncer de páncreas humano, los tumores secretan CCL2 y los macrófagos inmunosupresores CCR2 positivos se infiltran en estos tumores. Los pacientes con tumores que exhiben alta expresión de CCL2/bajo infiltrado de células T CD8 tienen una supervivencia significativamente menor. Sin desear ceñirse a una teoría particular, se contempla que los monocitos que se reclutan en un entorno de tejido lesionado o enfermo pueden polarizarse posteriormente en respuesta a señales locales (como en respuesta a citoquinas derivadas de tumores), contribuyendo así aún más a la progresión de la enfermedad. Es probable que estos macrófagos de tipo M2 contribuyan a la evasión inmunitaria al suprimir las células efectoras, como las células T CD4+ y CD8+. En algunas formas de realización, este proceso está mediado en parte por LRRC33-TGFβ1 expresado por macrófagos activados. En algunas formas de realización, el proceso está mediado en parte por GARP-TGFβ1 expresado por Tregs.

[0385] Del mismo modo, en ciertos carcinomas, como el cáncer de mama (p. ej., el cáncer de mama triple negativo), el reclutamiento mediado por CXCL2/CCL22 de MDSCs se ha demostrado a promover la angiogénesis y la metástasis (véase, por ejemplo, Kumar et al. (2018) *J Clin Invest* 128 (11): 5095-5109). Por lo tanto, se contempla que este proceso está mediado al menos en parte por TGFβ1, como LRRC33-TGFβ1. Además, debido a que las proteasas como MMP9 están implicadas en el proceso de remodelación de la matriz que contribuye a la invasión tumoral y la metástasis, las mismas vías de señalización o superpuestas también pueden desempeñar un papel en la fibrosis.

[0386] La participación de PAI-1/Serpine1 se ha implicado en una variedad de afecciones fibróticas, cánceres, angiogénesis, inflamación, así como enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de Alzheimer). La expresión elevada de PAI-1 en el tumor y/o suero se correlaciona con un mal pronóstico (p. ej., supervivencia más corta, aumento de metástasis) en varios cánceres, como cáncer de mama y cáncer de vejiga (p. ej., carcinoma de células de transición) así como mielofibrosis. En el contexto de las condiciones fibróticas, el PAI-1 ha sido reconocido como un importante efector descendente de la fibrosis inducida por TGFβ1, y se ha observado un aumento de la expresión de PAI-1 en diversas formas de fibrosis tisular, incluida la fibrosis pulmonar (como la FPI), fibrosis renal, fibrosis hepática y esclerodermia. En algunas formas de realización, el proceso está en parte mediado por TGFβ1 asociado a ECM, por ejemplo, a través de LTBP1-proTGFβ1 y/o LTBP3-proTGFβ1.

[0387] En algunas formas de realización, efectos in vivo de la terapia de inhibidores de TGFβ1 pueden evaluarse midiendo los cambios en los niveles de expresión de marcadores genéticos adecuados. Los marcadores adecuados incluyen TGFβ (p. ej., TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3). Los marcadores adecuados también pueden incluir una o más moléculas presentadoras de TGFβ (p. ej., TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3), tales como LTBP1, LTBP3, GARP (o LRRC32) y LRRC33. En algunas formas de realización, los marcadores adecuados incluyen genes de transición mesenquimáticos (p. ej., AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN y/o FAP), genes inmunosupresores (p. ej., IL10, VEGFA, VEGFC), genes quimiotácticos de monocitos y macrófagos (p. ej., CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8, CCL13 y CCL22) y/o varios marcadores fibróticos discutidos en este documento. Los marcadores preferidos son los marcadores de plasma/suero.

[0388] Como se muestra en el Ejemplo en el presente documento, inhibidores de TGFβ1 específicos a isoformas,

independientes del contexto descritos en este documento pueden utilizarse para reducir los niveles de expresión de muchos de estos marcadores en modelos preclínicos adecuados, incluyendo modelos animales mecanicistas, tales como la OUU, que ha demostrado ser dependiente de TGFβ1. Por lo tanto, tales inhibidores se pueden usar para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por una expresión anormal (p. ej., sobreexpresión/regulación positiva o subexpresión/regulación negativa) de uno o más de los marcadores de expresión génica de la enfermedad.

[0389] Por tanto, en algunas formas de realización, un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma, independiente del contexto, de acuerdo con la invención, se usa en el tratamiento de una enfermedad asociada con la sobreexpresión de uno o más de los siguientes: PAI-1 (codificado por Serpina1), MCP-1 (también conocido como CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFB1, CTGF, α-SMA, ITGA11 y ACTA2, donde el tratamiento comprende la administración del inhibidor a un sujeto que padece la enfermedad en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad. En algunas formas de realización, el inhibidor se usa para tratar una enfermedad asociada con la sobreexpresión de PAI-1, MCP-1/CCL2, CTGF y/o α-SMA. En algunas formas de realización, la enfermedad es mielofibrosis. En algunas formas de realización, la enfermedad es cáncer, por ejemplo, cáncer que comprende un tumor sólido. En algunas formas de realización, la enfermedad es fibrosis de órganos, por ejemplo, fibrosis del hígado (p. ej., asociada con EHNA), el riñón, el pulmón, el músculo, la piel y/o el tejido cardíaco o cardiovascular.

[0390] La implicación de la ruta del TGFβ1 en el control de facetas clave tanto de la ECM como de los componentes inmunitarios puede explicar las observaciones de que un número notable de genes desregulados se comparten en una amplia gama de patologías tales como trastornos proliferativos y trastornos fibróticos. Esto apoya la idea de que el patrón de expresión abarcadora en los genes que involucran la señalización de TGFβ1 es probablemente un fenómeno generalizable. Estos genes marcadores pueden clasificarse en varias categorías, tales como: genes implicados en la transición mesenquimatosas (p. ej., EndMT y EMT); genes implicados en la angiogénesis; genes implicados en la hipoxia; genes implicados en la cicatrización de heridas; y genes implicados en la respuesta inflamatoria desencadenada por lesiones tisulares.

[0391] Un amplio estudio realizado por Hugo et al. (Cell, 165 (1): 35-44) demostró elegantemente la correlación entre los patrones de expresión génica diferencial de estas clases de marcadores y la capacidad de respuesta a la terapia de bloqueo de puntos de control (TCC) en el melanoma metastásico. Los autores encontraron que el co-enriquecimiento del conjunto de genes acuñados "firmas IPRES" definió un subconjunto transcriptómico no sólo dentro del melanoma, sino también de todas las principales neoplasias malignas humanas comunes analizadas. De hecho, el trabajo vincula la plasticidad fenotípica de las células tumorales (es decir, la transición mesenquimatosas) y los impactos resultantes en el microambiente (p. ej., remodelación de la ECM, adhesión celular y características de angiogénesis de la cicatrización de heridas inmunosupresoras) con la resistencia a la TCC.

[0392] Reconociendo que cada una de estas categorías de genes IPRES se ha implicado en enfermedades que implican la desregulación de TGFβ, el solicitante contempla previamente que la isoforma de TGFβ1 en particular, puede mediar estos procesos en condiciones de enfermedad (véase, por ejemplo, el documento WO 2017/156500). El trabajo descrito en el presente documento respalda aún más esta noción (p. ej., Ejemplo 17; **FIG. 43A**), confirmando además que las terapias que se dirigen selectivamente al TGFβ1 (en oposición a las alternativas no selectivas) pueden ofrecer una ventaja tanto con respecto a la eficacia como a la seguridad.

[0393] Por consiguiente, la presente divulgación incluye un método/proceso para seleccionar o identificar un paciente candidato o una población de pacientes que probablemente responda a una terapia de inhibición de TGFβ1, y administrar al paciente o pacientes una cantidad eficaz de un inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de TGFβ1. La observación de la falta de respuesta de un paciente a una CBT (p. ej., resistencia) puede indicar que el paciente es un candidato para la terapia de inhibición de TGFβ1 descrita en este documento. Por tanto, un inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de TGFβ1, tal como los descritos en el presente documento, puede usarse en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el sujeto responde poco a una CBT. El sujeto puede tener un cáncer avanzado, como un tumor sólido localmente avanzado o un cáncer metastásico. Se dice que un paciente tiene "mala respuesta" cuando no se logran efectos terapéuticos significativos o se logran pocos (p. ej., no cumple con los criterios de respuesta parcial o respuesta completa según las pautas estándar, como RECIST e iRECIST) después de un período de tiempo que se espera sea suficiente para mostrar efectos terapéuticos significativos de la terapia particular. Normalmente, dicha duración de tiempo para las TCC es de al menos aproximadamente 3 meses de tratamiento, con o sin terapias adicionales como la quimioterapia. Estos pacientes pueden denominarse "no respondedores". Cuando dichos pacientes responden mal a la TCC inicial, los pacientes pueden denominarse "no respondedores primarios". El cáncer (o los pacientes con dicho cáncer) en esta categoría pueden caracterizarse por tener "resistencia primaria" a la TCC. En algunas formas de realización, el sujeto es un no respondedor primario después de recibir al menos aproximadamente 3 meses de tratamiento con TCC, en donde opcionalmente, después de al menos aproximadamente 4 meses de tratamiento con TCC. En algunas formas de realización, el sujeto también recibió terapia adicional en combinación con la TCC, como quimioterapia.

[0394] Tras la identificación del sujeto como un no respondedor de un CBT, el inhibidor selectivo para isoformas de alta afinidad de TGFβ1 puede administrarse al sujeto en conjunción con un CBT, que puede o no puede comprender el mismo inhibidor de punto de control como la primera TCC a la que el sujeto no respondió. Puede usarse cualquier inhibidor de puntos de control inmunológico adecuado, por ejemplo, inhibidores de puntos de control aprobados. En algunas formas

de realización, el inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 se administra al sujeto junto con una CBT que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. El inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad del TGFβ1 tiene como objetivo superar la resistencia haciendo que el cáncer sea más susceptible a la CBT.

5 **[0395]** El proceso de selección o identificación de una población de pacientes candidato o pacientes que es probable que respondan a una terapia de inhibición de TGFβ1 puede comprender un paso de análisis de una muestra biológica obtenida del paciente (o población de pacientes), tales como muestras de biopsia, para la expresión de uno o más de los marcadores aquí discutidos. De manera similar, dichos marcadores genéticos pueden usarse con el propósito de
10 monitorear la capacidad de respuesta del paciente a una terapia. La monitorización puede incluir pruebas de dos o más muestras biológicas recogidas del paciente, por ejemplo, antes y después de la administración de una terapia, y durante el curso de un régimen terapéutico con el tiempo, para evaluar los cambios en los niveles de expresión génica de uno o más de los marcadores indicativos de respuesta o eficacia terapéutica. En algunas formas de realización, se puede utilizar una biopsia líquida.

15 **[0396]** En algunos casos, un método para seleccionar un paciente candidato o una población de pacientes que probablemente responda a una terapia de inhibición de TGFβ1 puede comprender un paso de identificar un paciente o una población de pacientes previamente probados para los marcadores genéticos, tales como los descritos en el presente documento, que mostraron una expresión aberrante de los mismos. Estos mismos métodos también son aplicables para confirmar o correlacionar posteriormente con la respuesta de los pacientes a la terapia.

20 **[0397]** Los niveles en algunos casos, la expresión del marcador aberrante incluye niveles elevados de al menos uno de los siguientes: TGFβ1, LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3, CCL2, CCL3, PAI-1/Serpina1. En algunos casos, el paciente o la población de pacientes (p. ej., muestras biológicas recogidas de los mismos) muestra una activación elevada de TGFβ1, fosfo-Smad2/3 o una combinación de los mismos. En algunos casos, el paciente o la población de pacientes (p. ej.,
25 muestras biológicas recogidas de los mismos) muestra MDSC elevadas. En algunos casos, tal paciente o población de pacientes tiene cáncer, que puede comprender un tumor sólido que es TGFβ1 positivo. El tumor sólido puede ser un tumor dominante de TGFβ1, en donde TGFβ1 es la isoforma predominante expresada en el tumor, en relación con las otras isoformas. En algunos casos, el tumor sólido puede ser un tumor codominante de TGFβ1, en donde TGFβ1 es la isoforma codominante expresada en el tumor, por ejemplo, TGFβ1+/TGFβ3+. En algunos casos, tal paciente o población de
30 pacientes exhibe resistencia a una terapia contra el cáncer, como quimioterapia, radioterapia y/o terapia de puntos de control inmunológico, por ejemplo, anti-PD-1 (p. ej., Pembrolizumab y Nivolumab), anti-PD-L1 (p. ej., atezolizumab), anti-CTLA4 (p. ej., ipilimumab), terapia con células inmunitarias modificadas (p. ej., CAR-T) y vacunas contra el cáncer, etc. De acuerdo con la invención, el inhibidor de TGFβ1 de alta afinidad e independiente del contexto supera la resistencia desbloqueando la inmunosupresión para permitir que las células efectoras obtengan acceso a las células cancerosas
35 logrando así efectos antitumorales. Por tanto, la terapia con inhibidores de TGFβ1 puede promover la infiltración y/o expansión de células efectoras en el tumor. Además, la terapia con inhibidores de TGFβ1 puede reducir la frecuencia de células inmunodepresoras inmunosupresoras, como Tregs y MDSC, en el tumor.

40 **[0398]** En algunos casos, la expresión del marcador aberrante incluye uno o más paneles de genes: marcadores de transición mesenquimales (p. ej., AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN, FAP); genes inmunosupresores (p. ej., IL10, VEGFA, VEGFC); genes quimiotácticos de monocitos y macrófagos (p. ej., CCL2, CCL7, CCL8, CCL13); genes implicados en la angiogénesis y la cicatrización de heridas (p. ej., supresores de células T); marcadores de adhesión celular; remodelación de ECM; marcadores de desarrollo óseo y del sistema esquelético; y genes implicados en la
45 respuesta inflamatoria desencadenada por lesiones tisulares.

[0399] En algunos casos, la falta o la regulación por disminución de la expresión de MHC (tales como MHC de clase 1) puede servir como un biomarcador para condiciones asociadas a TGFβ1 para el cual los anticuerpos o fragmentos de
50 unión a antígeno abarcados por la presente divulgación pueden ser utilizados como terapia. Los niveles reducidos de MHC pueden indicar un escape inmunológico, lo que puede correlacionarse con una respuesta deficiente de los pacientes a las terapias inmunitarias, como la TCC. Por tanto, la inhibición selectiva de TGFβ1 puede restaurar al menos en parte la función de las células efectoras.

Enfermedades que implican transición mesenquimal

55 **[0400]** La transición mesenquimal es un proceso de cambio fenotípico de las células, tales como células epiteliales y células endoteliales, hacia un fenotipo mesenquimal (como miofibroblastos). Ejemplos de marcadores genéticos indicativos de transición mesenquimatosos incluyen AXL, ROR2, WNT5, LOXL2, TWIST2, TAGLN y FAP. En el cáncer, por ejemplo, la transición mesenquimatosos (p. ej., aumento de firmas de EndMT y EMT) indica plasticidad fenotípica de
60 células tumorales. Por lo tanto, inhibidores de alta afinidad y específicos de isoforma de TGFβ1, como los descritos en el presente documento, se pueden usar para tratar una enfermedad que se inicia o impulsa por la transición mesenquimatosos, como EMT y EndMT.

[0401] La EMT (transición epitelial a mesenquimal) es el proceso mediante el cual las células epiteliales con uniones estrechas cambian a propiedades mesenquimales (fenotipos) tales como contactos célula-célula sueltos. El proceso se
65 observa en una serie de procesos biológicos normales, así como en situaciones patológicas, incluida la embriogénesis, la cicatrización de heridas, la metástasis del cáncer y la fibrosis (revisada, por ejemplo, en Shiga et al. (2015) "Cancer-

Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth." *Cancers*, 7: 2443-2458). Generalmente, se cree que las señales de EMT son inducidas principalmente por TGF β . Muchos tipos de cáncer, por ejemplo, parecen implicar la transdiferenciación de células hacia el fenotipo mesenquimatoso (como los miofibroblastos y los CAF) que se correlacionan con un peor pronóstico. Por tanto, los inhibidores independientes del contexto, específicos de la isoforma de TGF β 1, tales como los descritos en el presente documento, pueden usarse para tratar una enfermedad iniciada o impulsada por EMT. De hecho, los datos ejemplificados en este documento (p. ej., **FIGs. 7A-9**) muestran que tales inhibidores tienen la capacidad de suprimir la expresión de marcadores de miofibroblasto/CAF in vivo, tales como α -SMA, LOXL2, Col1 (colágeno de tipo I) y FN (fibronectina). Por tanto, inhibidores de alta afinidad, específicos de isoforma, de TGF β 1, tales como los descritos en este documento, pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por EMT. Una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor puede ser una cantidad suficiente para reducir la expresión de marcadores como α -SMA/ACTA2, LOXL2Col1 (colágeno de tipo I) y FN (fibronectina). En algunas formas de realización, la enfermedad es un trastorno fibrótico. En algunas formas de realización, la enfermedad es un trastorno proliferativo, como el cáncer.

[0402] Del mismo modo, TGF β también es un regulador clave de la transición endotelial a mesenquimal (EndMT) observada en el desarrollo normal, tales como la formación del corazón. Sin embargo, el mismo o similar fenómeno también se observa en muchos tejidos asociados a enfermedades, tales como el estroma de cáncer y sitios fibróticos. En algunos procesos patológicos, los marcadores endoteliales como CD31 se regulan negativamente con la exposición a TGF β 1 y, en cambio, se induce la expresión de marcadores mesenquimales como FSP-1, α -SMA/ACTA2 y fibronectina. De hecho, los CAF del estroma pueden derivarse de células endoteliales vasculares. Por tanto, inhibidores de alta afinidad, específicos de isoforma, de TGF β 1, tales como los descritos en este documento, pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por EndMT. Una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor puede ser una cantidad suficiente para reducir la expresión de marcadores tales como FSP-1, α -SMA/ACTA2 y fibronectina. En algunas formas de realización, la enfermedad es un trastorno fibrótico. En algunas formas de realización, la enfermedad es un trastorno proliferativo, como el cáncer.

Enfermedades que implican endurecimiento y remodelado de la matriz

[0403] La progresión de diversas indicaciones relacionadas con TGF β 1, tales como afecciones fibróticas y cáncer, implica niveles aumentados de componentes de la matriz depositados en la ECM y/o mantenimiento/remodelación de la ECM. Se ha informado que el aumento de la deposición de componentes de la ECM, como los colágenos, puede alterar las propiedades mecánicas de la ECM (p. ej., la rigidez de la matriz/sustrato) y este fenómeno está asociado con la señalización de TGF β 1. El solicitante demostró previamente el papel de la rigidez de la matriz en la activación dependiente de integrina de TGF β , utilizando fibroblastos primarios transfectados con proTGF β 1 y LTBP1 y cultivados en sustratos basados en silicio con rigidez definida (p. ej., 5 kPa, 15 kPa o 100 kPa). Como se describe en el documento WO 2018/129329, las matrices con mayor rigidez mejoran la activación de TGF β 1, y esto puede ser suprimido por inhibidores específicos de isoforma de TGF β 1. Estas observaciones sugieren que TGF β 1 influye en las propiedades de la ECM (como la rigidez), que a su vez, puede inducir aún más la activación de TGF β 1, lo que refleja la progresión de la enfermedad.

[0404] Por lo tanto, los inhibidores específicos a las isoformas de alta afinidad de TGF β 1, tales como los descritos en el presente documento, se pueden utilizar para bloquear este proceso para contrarrestar la progresión de la enfermedad que implica alteraciones de ECM, tales como fibrosis, crecimiento tumoral, invasión, metástasis y desmoplasia. El brazo de LTBP de tales inhibidores puede bloquear directamente los complejos de TGF β 1 pro/latente asociados a ECM que son presentados por LTBP1 y/o LTBP3, evitando así la activación/liberación del factor de crecimiento del complejo en el nicho de la enfermedad. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 específicos de isoforma de alta afinidad pueden normalizar la rigidez de la ECM para tratar una enfermedad que implica señalización dependiente de integrina. En algunas formas de realización, la integrina comprende una cadena α 11, cadena β 1, o ambos. La arquitectura de la ECM, por ejemplo, los componentes y la organización de la ECM, también puede ser alterada por proteasas asociadas a la matriz.

[0405] Como se revisó en Lampi y Reinhart-King (*Science Translational Medicine*, 10 (422): eaao0475, "*Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials*"), el aumento de la rigidez de los ECM tisulares se produce durante la progresión patológica de cáncer, fibrosis y enfermedades cardiovasculares. Las propiedades mecánicas asociadas con el proceso involucran miofibroblastos fenotípicamente convertidos, TGF β y reticulación de la matriz. Una causa principal del aumento de la rigidez de la ECM durante el cáncer y las enfermedades fibróticas es la síntesis de matriz desregulada y la remodelación por fibroblastos activados que se han desdiferenciado en miofibroblastos (p. ej., CAF y FAF). La remodelación del estroma tumoral y la fibrosis de órganos exhiben sorprendentes similitudes con la respuesta de cicatrización de heridas, excepto que la respuesta se mantiene en el estado patológico. Las miofibras de vidrio son una población celular heterogénea con células precursoras específicas de patología que se originan a partir de múltiples fuentes celulares, como las células derivadas de la médula ósea y las células residentes en tejidos. Los marcadores de miofibroblastos de uso común incluyen alfa-actina de músculo liso (α -SMA). Como se muestra en el presente documento, los inhibidores de TGF β 1 específicos de isoforma de alta afinidad pueden reducir la expresión de ACTA2 (que codifica α -SMA), colágenos, así como FN (fibronectina) en estudios in vivo. La fibronectina es importante en el anclaje de los complejos de proTGF β 1 asociados a LTBP en la estructura de la matriz.

[0406] La importancia de la vía TGF β en la regulación del ECM está bien establecida. Debido a que TGF β 1 (y TGF β 3)

puede ser activado mecánicamente por ciertas integrinas (p. ej., integrinas α_v), la interacción de integrina-TGF β 1 se ha convertido en un objetivo terapéutico. Por ejemplo, se está investigando un anticuerpo monoclonal contra $\alpha_v\beta_6$ para determinar la fibrosis pulmonar idiopática. Sin embargo, tal enfoque también puede interferir con la señalización de TGF β 3 que comparte el mismo motivo de unión a integrina, RGD, y además, dicho anticuerpo no será eficaz para bloquear el TGF β 1 activado a través de otros modos, como la activación inducida por proteasa. En comparación, los inhibidores de TGF β 1 específicos de isoforma de alta afinidad pueden bloquear la activación de TGF β 1 dependiente de proteasa (FIGS. 5A y 5B), así como la activación de TGF β 1 dependiente de integrina (FIGS. 1A-4B y 33B). Por lo tanto, los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGF β 1 pueden proporcionar atributos superiores. Los datos presentados en el presente documento, junto con el trabajo anterior del solicitante, apoyan que los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGF β 1 pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades asociadas con la rigidez de la ECM.

[0407] Así, la invención incluye el uso terapéutico de la alta afinidad de los inhibidores selectivos de isoformas de TGF β 1 según la invención en el tratamiento de una enfermedad asociada con la rigidez de la matriz, o en un método para reducir la rigidez de la matriz, en un sujeto. Dicho uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de TGF β 1.

Enfermedades que involucran proteasas

[0408] La activación de TGF β a partir de su complejo latente puede ser desencadenada por la integrina de una manera dependiente de la fuerza y/o por proteasas. La evidencia sugiere que ciertas clases de proteasas pueden estar involucradas en el proceso, incluidas, entre otras, proteasas Ser/Thr como calicreínas, quimiotripsina, elastasas, plasmina, así como metaloproteasas de zinc de la familia MMP, como MMP-2, MMP-9 y MMP-13, y la familia de proteasas Adam, como Adam10 y Adam17. La MMP-2 degrada el componente más abundante de la membrana basal, el colágeno IV, lo que aumenta la posibilidad de que pueda desempeñar un papel en la regulación del TGF β 1 asociado a la ECM. Se ha implicado que la MMP-9 desempeña un papel central en la progresión tumoral, la angiogénesis, la remodelación del estroma y la metástasis, incluso en el carcinoma, como el cáncer de mama. Por tanto, la activación de TGF β 1 dependiente de proteasa en la ECM puede ser importante para el tratamiento del cáncer.

[0409] Las calicreínas (KLK) son serina proteasas de tipo tripsina o quimiotripsina que incluyen calicreínas plasmáticas y calicreínas tisulares. El ECM juega un papel en la homeostasis tisular actuando como un andamio estructural y de señalización y una barrera para suprimir el crecimiento maligno. Las KLK pueden desempeñar un papel en la degradación de las proteínas ECM y otros componentes que pueden facilitar la expansión e invasión del tumor. Por ejemplo, KLK1 está altamente regulado en ciertos cánceres de mama y puede activar pro-MMP-2 y pro-MMP-9. KLK2 activa el TGF β 1 latente, lo que hace que el cáncer de próstata adyacente a los fibroblastos sea permisivo para el crecimiento del cáncer. KLK3 se ha estudiado ampliamente como marcador de diagnóstico del cáncer de próstata (PSA). KLK3 puede activar directamente TGF β 1 procesando plasminógeno en plasmina, que escinde proteolíticamente LAP, provocando así que el factor de crecimiento TGF β 1 se libere del complejo latente. KLK6 puede ser un marcador potencial de la enfermedad de Alzheimer.

[0410] Además, los datos proporcionados en el Ejemplo 3 indican que tales proteasas pueden ser una calicreína. Por tanto, la invención abarca el inhibidor de TGF β 1, independiente del contexto, específico de isoforma de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad asociada con calicreína o una proteasa similar a calicreína. El inhibidor de TGF β 1 puede ser Ab6 o derivados del mismo.

[0411] Activadores conocidos de TGF β 1, tales como plasmina, TSP-1 e integrina $\alpha_v\beta_6$, todos interactúan directamente con LAP. Se postula que la escisión proteolítica de LAP puede desestabilizar la interacción de LAP-TGF β , liberando así TGF β 1 activo. Se ha sugerido que la región que contiene 54-LSKLRL-59 es importante para mantener la latencia del TGF β 1. Por tanto, los agentes (p. ej., anticuerpos) que estabilizan la interacción o bloquean la escisión proteolítica de LAP pueden prevenir la activación de TGF β 1.

[0412] Muchas de estas proteasas asociadas con condiciones patológicas (p. ej., cáncer) funcionan a través de distintos mecanismos de acción. Por tanto, la inhibición dirigida de proteasas particulares, o combinaciones de proteasas, puede proporcionar beneficios terapéuticos para el tratamiento de afecciones que implican el eje proteasa-TGF β . Por consiguiente, se contempla que los inhibidores (p. ej., anticuerpos de TGF β 1) que inhiben selectivamente la activación inducida por proteasa de TGF β 1 pueden ser ventajosos en el tratamiento de tales enfermedades (p. ej., cáncer). De manera similar, también se puede preferir la inhibición selectiva de la activación de TGF β 1 por una proteasa sobre otra proteasa, dependiendo de la afección que se esté tratando.

[0413] La plasmina es una serina proteasa producida como una forma precursora llamada plasminógeno. Tras su liberación, la plasmina entra en circulación y, por lo tanto, se detecta en el suero. Los niveles elevados de plasmina sérica parecen correlacionarse con la progresión del cáncer, posiblemente a través de mecanismos que implican la alteración de la matriz extracelular (p. ej., la membrana basal y las barreras estromales) que facilitan la motilidad, la invasión y la metástasis de las células tumorales. La plasmina también puede afectar la adhesión, la proliferación, la apoptosis, la nutrición del cáncer, el suministro de oxígeno, la formación de vasos sanguíneos y la activación de VEGF (Didiasova et al., Int. J. Mol. Sci., 2014, 15, 21229-21252). Además, Plasmina puede promover la migración de macrófagos al

microambiente tumoral (Philips et al., Cancer Res. 2011, 1 de noviembre; 71 (21): 6676-83 y Choong et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 2003, 415S, S46-S58). De hecho, los macrófagos asociados a tumores (TAM) son impulsores bien caracterizados de la tumorigénesis a través de su capacidad para promover el crecimiento, la invasión, la metástasis y la angiogénesis del tumor.

[0414] Las actividades de la plasmina se han relacionado principalmente con la alteración de la ECM. Sin embargo, existe una creciente evidencia de que plasmina también regula la activación de MMP y TGF β corriente abajo. Específicamente, se ha sugerido que la plasmina causa la activación de TGF β a través de la escisión proteolítica del péptido asociado a latencia (LAP), que se deriva de la región N-terminal del producto del gen TGF β (Horiguchi et al., J Biochem. 2012 Oct; 152 (4): 321-9), resultando en la liberación de factor de crecimiento activo. Dado que TGF β 1 puede promover la progresión del cáncer, esto plantea la posibilidad de que la activación de TGF β inducida por plasmina pueda al menos en parte mediar este proceso.

[0415] TGF β 1 también se ha demostrado que regulan la expresión de uPA, que es un jugador crítico en la conversión de plasminógeno en plasmina (Santibanez, Juan F, ISRN Dermatology, 2013: 597 927). Se ha demostrado de forma independiente que uPA promueve la progresión del cáncer (p. ej., adhesión, proliferación y migración) al unirse a su receptor de superficie celular (uPAR) y promover la conversión de plasminógeno en plasmina. Además, los estudios han demostrado que la expresión de uPA y/o inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) son predictores de mal pronóstico en el cáncer colorrectal (DQ Seetoo, et al., Journal of Surgical Oncology, vol. 82, N° 3, págs. 184-193, 2003), cáncer de mama (N. Harbeck et al., Clinical Breast Cancer, vol. 5, N° 5, págs. 348-352, 2004) y cáncer de piel (Santibáñez, Juan F, Dermatología ISRN, 2013: 597927). Por tanto, sin desear estar ligado a una teoría particular, la interacción entre Plasmina, TGF β 1 y uPA puede crear un bucle de retroalimentación positiva hacia la promoción de la progresión del cáncer. Por consiguiente, los inhibidores que inhiben selectivamente la activación de TGF β 1 dependiente de Plasmina pueden ser particularmente adecuados para el tratamiento de cánceres que dependen del eje de señalización Plasmina/TGF β 1.

[0416] Los inhibidores de la isoforma específica de TGF β 1 de la invención descrita en el presente documento incluyen inhibidores que pueden inhibir la activación de la proteasa dependiente de TGF β 1. En algunas formas de realización, los inhibidores pueden inhibir la proteasa dependiente de TGF β 1 de activación en una integrina de manera independiente. En algunas formas de realización, tales inhibidores pueden inhibir TGF β 1 de activación irrepetitiva del modo de activación, por ejemplo, inhiben tanto activación dependiente de integrina como la activación dependiente de proteasa de TGF β 1. En algunas formas de realización, la proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en: serina proteasas, tales como calicreínas, quimiotripsina, tripsina, elastasas, plasmina, así como metaloproteasas de zinc (familia MMP) tales como MMP-2, MMP-9 y MMP-13.

[0417] En algunas formas de realización, los inhibidores pueden inhibir la activación inducida por plasmina de TGF β 1. En algunas formas de realización, los inhibidores pueden inhibir la activación de TGF β 1 inducida por plasmina e integrina. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al proTGF β 1. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une al proTGF β 1 latente inhibiendo de ese modo la liberación del factor de crecimiento maduro del complejo latente. En algunas formas de realización, el inhibidor independiente del contexto de alta afinidad de la activación de TGF β 1 adecuado para su uso en el método de inhibición de la activación de TGF β 1 dependiente de plasmina es Ab6 o un derivado o variante del mismo.

[0418] En algunas formas de realización, el inhibidor (p. ej., anticuerpo TGF β 1) inhibe la migración de células de cáncer. En algunas formas de realización, el inhibidor inhibe la migración de macrófagos. En algunas formas de realización, el inhibidor inhibe la acumulación de TAM.

[0419] En otro aspecto, se proporciona aquí un método para tratar cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de TGF β 1 (p. ej., anticuerpo TGF β 1), en donde el inhibidor inhibe la activación inducida por proteasa de TGF β 1 (p. ej., Plasmina), tratando así el cáncer en el sujeto.

[0420] En otro aspecto, se proporciona aquí un método para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de TGF β 1 (p. ej., anticuerpo TGF β 1), en donde el inhibidor inhibe la activación inducida por proteasa de TGF β 1 (p. ej., Plasmina), reduciendo así el crecimiento tumoral en el sujeto.

Cáncer / neoplasias malignas

[0421] Varios cánceres implican actividades de TGF β 1 y pueden tratarse con anticuerpos y/o composiciones de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a cualquiera de las diversas neoplasias malignas, asociadas con células positivas para TGF β 1. Tales neoplasias malignas se caracterizan por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y metastatizar a nuevos sitios corporales y también se refiere a la condición patológica caracterizada por tales crecimientos neoplásicos malignos. La fuente de TGF β 1 puede variar y puede incluir las propias células malignas (cancerosas), así como sus células/tejidos circundantes o de soporte, incluyendo, por ejemplo, la matriz extracelular, diversas células inmunitarias y cualquier combinación de las mismas.

[0422] Identificación afirmativa de cáncer como "TGFβ1-positivo" no se requiere para llevar a cabo los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Por lo general, se sabe o se sospecha que ciertos tipos de cáncer, en base a evidencia creíble, están asociados con la señalización de TGFβ1.

[0423] Los cánceres pueden ser localizados (tumores por ejemplo, sólidos) o sistémicos. En el contexto de la presente divulgación, el término "localizado" (como en "tumor localizado") se refiere a anomalías/lesiones anatómicamente aisladas o aislables, tales como neoplasias malignas sólidas, en oposición a enfermedad sistémica (p. ej., los denominados tumores líquidos o cánceres de sangre). Ciertos cánceres, como ciertos tipos de leucemia (p. ej., mielofibrosis) y mieloma múltiple, por ejemplo, pueden tener un componente localizado (p. ej., la médula ósea) y un componente sistémico (p. ej., células sanguíneas circulantes) de la enfermedad. En algunas formas de realización, los cánceres pueden ser sistémicos, como las neoplasias malignas hematológicas. Los cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la presente divulgación son TGFβ1 positivos e incluyen, pero no se limitan a todos los tipos de linfomas/leucemias, carcinomas y sarcomas, tales como los cánceres o tumores que se encuentran en el ano, la vejiga, el conducto biliar, hueso, cerebro, mama, cuello uterino, colon/recto, endometrio, esófago, ojo, vesícula biliar, cabeza y cuello, hígado, riñón, laringe, pulmón, mediastino (pecho), boca, ovarios, páncreas, pene, próstata, piel, intestino delgado, estómago, médula espinal, coxis, testículos, tiroides y útero. En algunas formas de realización, el cáncer puede ser un cáncer avanzado, como un tumor sólido localmente avanzado y un cáncer metastásico.

[0424] Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos abarcados por la presente divulgación pueden usarse en el tratamiento del cáncer, incluyendo, sin limitación: mielofibrosis, melanoma, melanoma adyuvante, carcinoma de células renales (RCC), cáncer de vejiga, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de ano, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de mama HER2 negativo, cáncer de mama con mutación BRCA, neoplasias hematológicas, carcinoma de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas en estadio extenso (SCLC-ES), linfoma (clásico de Hodgkin y no Hodgkin), linfoma mediastínico primario de células B grandes (PMBCL), linfoma de células T, linfoma difuso de células B grandes, sarcoma histiocítico, sarcoma de células dendríticas foliculares, sarcoma de células dendríticas interdigitantes, mieloma, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma linfocítico pequeño (LLP), cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, carcinoma de células merkel, cáncer de piel de células de merkel, cáncer con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H), cáncer con deficiencia de reparación de desajustes (dMMR), mesotelioma, cáncer gástrico, cáncer de la unión gastroesofágica (GEJ), adenocarcinoma gástrico, tumores neuroendocrinos, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), adenocarcinoma de cardias gástrico, cáncer renal, cáncer biliar, colangiocarcinoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células no escamosas, carcinoma de células escamosas cutáneo (CSCC), cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer peritoneal, cáncer de estómago, cánceres cerebrales, glioma maligno, glioblastoma, gliosarcoma, neuroblastoma, cáncer de tiroides, carcinoma adrenocortical, neoplasia intraepitelial oral, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas de cavidad nasal y seno paranasal, carcinoma de nasofaringe, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de hígado y cáncer hepatocelular (HCC). Sin embargo, cualquier cáncer (p. ej., pacientes con dicho cáncer) en donde TGFβ1 se sobreexpresa o es al menos una isoforma predominante, según se determina mediante, por ejemplo, biopsia, puede tratarse con un inhibidor selectivo de isoforma de TGFβ1 de acuerdo con la presente divulgación.

[0425] En el cáncer, TGFβ (p. ej., TGFβ1) puede ser o bien promotor del crecimiento o inhibidor del crecimiento. Como ejemplo, en los cánceres de páncreas, los tumores de tipo salvaje SMAD4 pueden experimentar un crecimiento inhibido en respuesta al TGFβ, pero a medida que la enfermedad progresa, típicamente está presente el receptor de tipo II activado constitutivamente. Además, existen cánceres de páncreas sin SMAD4. En algunas formas de realización, los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos y/o las composiciones de la presente divulgación se diseñan para dirigirse selectivamente a componentes de las rutas de señalización de TGFβ que funcionan de forma única en una o más formas de cáncer. Las leucemias, o cánceres de la sangre o la médula ósea que se caracterizan por una proliferación anormal de glóbulos blancos, es decir, leucocitos, se pueden dividir en cuatro clasificaciones principales que incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda leucemia o leucemia mieloide aguda (LMA) (LMA con translocaciones entre los cromosomas 10 y 11 [t(10, 11)], los cromosomas 8 y 21 [t(8; 21)], los cromosomas 15 y 17 [t(15; 17)], e inversiones en el cromosoma 16 [inv(16)]; LMA con displasia multilineal, que incluye pacientes que han tenido un síndrome mielodisplásico (SMD) o enfermedad mieloproliferativa que se transforma en LMA; LMA y síndrome mielodisplásico (SMD), relacionado con terapia, cuya categoría incluye pacientes que han recibido quimioterapia y/o radiación previamente y posteriormente desarrollaron LMA o SMD; d) LMA no clasificada de otra manera, que incluye subtipos de LMA que no se incluyen en las categorías anteriores; y e) leucemias agudas de linaje ambiguo, que se producen cuando las células leucémicas no pueden clasificarse como células mieloides o linfoides, o cuando están presentes ambos tipos de células; y leucemia mielógena crónica (LMC).

[0426] En algunas formas de realización, uno cualquiera del cáncer TGFβ1 positivo mencionado anteriormente puede también ser TGFβ3 positivo. En algunas formas de realización, los tumores que son tanto TGFβ1 positivos como TGFβ3 positivos pueden ser TGFβ1/TGFβ3 codominantes. En algunas formas de realización, dicho cáncer es un carcinoma que comprende un tumor sólido. En algunas formas de realización, tales tumores son carcinoma de mama. En algunas formas de realización, el carcinoma de mama puede ser de genotipo triple negativo (cáncer de mama triple negativo). En algunas formas de realización, los sujetos con cáncer TGFβ1 positivo tienen niveles elevados de MDSC. Por ejemplo, tales

tumores pueden comprender MDSC reclutadas en el sitio del tumor dando como resultado un mayor número de infiltrados de MDSC. En algunas formas de realización, los sujetos con cáncer de mama muestran niveles elevados de Proteína C-Reactiva (CRP), un marcador inflamatorio asociado con recurrencia y mal pronóstico. En algunas formas de realización, los sujetos con cáncer de mama muestran niveles elevados de IL-6.

[0427] Los inhibidores de TGFβ1 selectivos para isoforma de la invención pueden usarse para tratar a los pacientes que sufren de leucemia mieloide crónica, que es una enfermedad de células madre, en donde BCR/ABL oncogénica se considera esencial para el crecimiento anormal y la acumulación de células neoplásicas. Imatinib es una terapia aprobada para tratar esta afección; sin embargo, una fracción significativa de los pacientes con leucemia mieloide muestra resistencia a imatinib. La inhibición de TGFβ1 lograda por el inhibidor, como los descritos en el presente documento, puede potenciar la repoblación/expansión para contrarrestar el crecimiento anormal impulsado por BCR/ABL y la acumulación de células neoplásicas, proporcionando así un beneficio clínico.

[0428] Los inhibidores específicos de isoforma de TGFβ1, tales como los descritos en este documento, pueden usarse para tratar mieloma múltiple. El mieloma múltiple es un cáncer de linfocitos B (p. ej., células plasmáticas, plasmablastos, células B de memoria) que se desarrolla y se expande en la médula ósea, provocando lesiones óseas destructivas (es decir, lesión osteolítica). Típicamente, la enfermedad manifiesta una resorción ósea osteoclástica mejorada, diferenciación osteoblástica suprimida (p. ej., detención de la diferenciación) y formación ósea alterada, caracterizada en parte por lesiones osteolíticas, osteopenia, osteoporosis, hipercalcemia, así como plasmocitoma, trombocitopenia, neutropenia y neuropatía. La terapia inhibidora independiente del contexto, selectiva de TGFβ1 descrita en el presente documento puede ser eficaz para mejorar una o más de tales manifestaciones o síntomas clínicos en pacientes. El inhibidor de TGFβ1 puede administrarse a pacientes que reciben terapia o terapias adicionales para tratar el mieloma múltiple, incluidos los enumerados en otra parte del presente documento. En algunas formas de realización, el mieloma múltiple puede tratarse con un inhibidor de TGFβ1 (tal como un inhibidor independiente del contexto específico de isoforma) en combinación con un inhibidor de miosostatina o un inhibidor de IL-6. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 puede usarse junto con terapias tradicionales de mieloma múltiple, tales como bortezomib, lenalidomida, carfilzomib, pomalidomida, talidomida, doxorubicina, corticosteroides (p. ej., dexametasona y prednisona), quimioterapia (p. ej., melfalán), radioterapia, trasplante de células madre, plitidepsina, Elotuzumab, Ixazomib, Masitinib y/o Panobinostat.

[0429] Los tipos de carcinomas que se pueden tratar por los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a papiloma/carcinoma, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, teratoma, adenoma/adenocarcinoma, melanoma, fibroma, lipoma, leiomioma, rhabdomioma, mesotelioma, angioma, osteoma, condroma, glioma, linfoma/leucemia, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, carcinomas indiferenciados de células grandes, carcinoma de células basales y carcinoma indiferenciado nasosinusal.

[0430] Los tipos de sarcomas incluyen, pero no se limitan a sarcoma de tejido blando, tal como sarcoma alveolar de partes blandas, angiosarcoma, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, tumor de células redondas pequeñas desmoplásico, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, Sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial y tumor de Askin, sarcoma de Ewing (tumor neuroectodérmico primitivo), hemangioendotelio maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma y condrosarcoma.

[0431] Los inhibidores independientes del contexto, selectivos de isoformas de la activación de TGFβ1, tales como los descritos en el presente documento, pueden ser adecuados para tratar neoplasias que involucran células de origen de la cresta neural. Los cánceres del linaje de la cresta neural (es decir, tumores derivados de la cresta neural) incluyen, entre otros: melanoma (cáncer de melanocitos), neuroblastoma (cáncer de precursores simpatoadrenales), ganglioneuroma (cáncer de ganglios del sistema nervioso periférico), tiroides medular carcinoma (cáncer de células C de tiroides), feocromocitoma (cáncer de células cromafines de la médula suprarrenal) y MPNST (cáncer de células de Schwann). En algunas formas de realización, los anticuerpos y los métodos de la divulgación se pueden usar para tratar uno o más tipos de cáncer o afecciones relacionadas con el cáncer que pueden incluir, entre otros, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer de mama, melanoma maligno y glioblastomas (Schlingensiepen et al., 2008; Ouhit et al., 2013).

[0432] En condiciones normales, las células T reguladoras (Tregs) representan un pequeño subconjunto de la población total de linfocitos CD4 positivos y desempeñan un papel clave para el mantenimiento del sistema inmunitario en la homeostasis. En casi todos los cánceres, sin embargo, el número de Treg aumenta notablemente. Si bien las Tregs desempeñan un papel importante en la atenuación de las respuestas inmunitarias en individuos sanos, un número elevado de Tregs en el cáncer se ha asociado con un mal pronóstico. Las Treg elevadas en el cáncer pueden disminuir la inmunidad anticancerosa del huésped y pueden contribuir a la progresión del tumor, la metástasis, la recurrencia del tumor y/o la resistencia al tratamiento. Por ejemplo, la ascitis por cáncer de ovario humano se infiltra con Foxp3 + GARP + Tregs (Downs-Canner et al., Nat Commun, 2017, 8: 14649). De manera similar, Tregs se correlacionó positivamente con un fenotipo más inmunosupresor y más agresivo en el carcinoma hepatocelular avanzado (Kalathil et al., Cancer Res. 2013, 73 (8): 2435-44). Las Treg pueden suprimir la proliferación de células T efectoras (**FIG. 32B**). Además, las Treg ejercen una inhibición dependiente del contacto de las células inmunitarias (p. ej., células T CD4+ naive) a través de la producción de TGFβ1 (véase, por ejemplo, la **FIG. 32A**). Por lo tanto, para combatir un tumor, es ventajoso inhibir las Treg de modo que puedan estar disponibles suficientes células T efectoras para ejercer efectos antitumorales.

[0433] El aumento de líneas de evidencia sugieren que el papel de los macrófagos en la progresión del tumor/cáncer. La presente invención abarca la noción de que esto está mediado en parte por la activación de TGFβ1 en el entorno de la enfermedad, tal como TME. Los monocitos derivados de la médula ósea (p. ej., CD11b+) se reclutan en los sitios del tumor en respuesta a las citoquinas/quimiocinas derivadas del tumor (como CCL2, CCL3 y CCL4), donde los monocitos se diferencian y polarizan para adquirir un fenotipo procáncer (p. ej., macrófagos M2 sesgados o similares a M2, TAM). Como se demostró anteriormente (documento WO 2018/129329), se puede inducir a los monocitos aislados de PBMC humanas a polarizarse en diferentes subtipos de macrófagos, por ejemplo, M1 (profibrótico, anticancerígeno) y M2 (procáncer). La mayoría de los TAM en muchos tumores están sesgados hacia M2. Entre los macrófagos de tipo M2, se encuentra que los subtipos M2c y M2d, pero no M1, expresan un LRRC33 elevado en la superficie celular. Además, los macrófagos pueden sesgarse o activarse aún más por la exposición a ciertas citoquinas, como M-CSF, lo que da como resultado un marcado aumento en la expresión de LRRC33, que coincide con la expresión de TGFβ1. También se han observado niveles elevados de M-CSF circulante (es decir, concentraciones séricas de M-CSF) en pacientes con enfermedad mieloproliferativa (p. ej., mielofibrosis). Generalmente, los tumores con alto macrófago (TAM) y/o infiltrado de MDSC se asocian con un mal pronóstico. De manera similar, los niveles elevados de M-CSF también son indicativos de un mal pronóstico. Por tanto, el inhibidor de TGFβ1 isoformoselectivo de alta afinidad, tal como los incluidos en este documento, puede usarse en el tratamiento del cáncer que se caracteriza por niveles elevados de macrófagos pro-cancerosos y/o MDSC. El brazo LRRC33 del inhibidor puede mediar al menos en parte sus efectos inhibidores contra las células mieloides inmunosupresoras asociadas a la enfermedad, por ejemplo, macrófagos M2 y MDSC.

[0434] Se recapitula una alta prevalencia de macrófagos de tipo M2 asociados a tumores en modelos de tumores singénicos murinos descritos en el presente documento. En los tumores MBT-2, por ejemplo, casi el 40% de las células tóxicas CD45 aisladas de un tumor establecido son macrófagos M2 (**FIG. 34B**). Esto se reduce a la mitad en animales tratados con una combinación de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad y anti-PD-1. En comparación, no se observa ningún cambio significativo en el número de macrófagos M1 asociados a tumores en los mismos animales. Al igual que los macrófagos M2, las MDSC asociadas a tumores también se elevan en tumores establecidos (alrededor del 10-12% de las células CD45+) y se reducen notablemente (a niveles despreciables) al inhibir tanto la PD-1 como el TGFβ1 en los animales tratados (**FIG. 34B**). Como se describe en el presente documento, la mayoría de los macrófagos M2 que infiltran el tumor y las MDSC expresan el complejo de LRRC33 y/o LRRC33-proTGFβ1 de la superficie celular (**FIGS. 34C y 34D**). Curiosamente, la expresión en la superficie celular de LRRC33 (o complejo de LRRC33-proTGFβ1) parece estar muy regulada. El inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas de alta afinidad, Ab6, es capaz de internalizarse rápidamente en las células que expresan LRRC33 y proTGFβ1, y la tasa de internalización lograda con Ab6 es significativamente mayor que con un anticuerpo de referencia que reconoce LRRC33 de células-superficie (**FIG. 6**). Se obtienen resultados similares a partir de macrófagos humanos primarios. Esta observación muestra que Ab6 puede promover la internalización al unirse a su objetivo, LRRC33-proTGFβ1, eliminando así los complejos que contienen LRRC33 de la superficie celular. Por tanto, el acoplamiento de la diana por un inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoforma de alta afinidad (tal como Ab6) puede inducir una regulación a la baja dependiente de anticuerpos de la proteína diana (p. ej., complejos de proTGFβ1 asociados a células). En los loci de la enfermedad, esto puede reducir la disponibilidad de niveles latentes activables de LRRC33-proTGFβ1. Por lo tanto, los inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas pueden inhibir el brazo LRRC33 de TGFβ1 mediante mecanismos duales de acción: i) bloquear la liberación del factor de crecimiento maduro del complejo latente; y ii) eliminar los complejos LRRC33-proTGFβ1 de la superficie celular mediante internalización. En el microambiente tumoral, los anticuerpos pueden dirigirse a complejos de proTGFβ1 latentes asociados a células, aumentando los efectos inhibidores sobre las células diana, tales como macrófagos M2 (p. ej., TAM), MDSC y Tregs. Fenotípicamente, estas son células inmunosupresoras, que contribuyen al microambiente tumoral inmunosupresor, que está al menos en parte mediado por la vía TGFβ1. Dado que muchos tumores están enriquecidos con estas células, los anticuerpos que son capaces de dirigirse a múltiples brazos de la función TGFβ1 deberían proporcionar una ventaja funcional.

[0435] Se sabe que muchos cánceres humanos causan niveles elevados de MDSCs en pacientes, en comparación con el control sano (revisado, por ejemplo, en Elliott et al (2017) "Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity". *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, Artículo 86). Estos cánceres humanos incluyen, entre otros: cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, NSCL, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y carcinoma de células renales. Pueden detectarse niveles elevados de MDSC en muestras biológicas tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y muestras de tejido (p. ej., biopsia de tumor). Por ejemplo, la frecuencia o los cambios en el número de MDSC se pueden medir como: porcentaje (%) de PBMC totales, porcentaje (%) de células CD14+, porcentaje (%) de células CD45+; porcentaje (%) de células mononucleares, porcentaje (%) de células totales, porcentaje (%) de células CD11b+, porcentaje (%) de monocitos, porcentaje (%) de MNC no linfocíticas, porcentaje (%) de células KLA-DR, utilizando marcadores de superficie celular adecuados (fenotipo).

[0436] Por otro lado, la infiltración de macrófagos en un tumor puede también significar la eficacia de una terapia. Como se ejemplifica en las **FIGS. 29A-29B, 30A-30D y 33B**, tumores que son penetrados eficazmente por células T efectoras (p. ej., células T CD8+) después del tratamiento con una combinación de un inhibidor de punto de control y un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto. Las células T efectoras intratumorales pueden conducir al reclutamiento de monocitos/macrófagos fagocíticos que limpian los desechos celulares.

[0437] Como se desprende de las **FIGS. 29A-29B**, la combinación de anti-PD-1 y un inhibidor de TGFβ1 dio como

resultado una fuerte entrada/expansión de células T CD8 por todo el tumor, en comparación con el tratamiento anti-PD-1 solo. En consecuencia, se puede lograr un fuerte aumento de los genes efectores de CD8 mediante el tratamiento de combinación. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para promover la infiltración de células T efectoras en tumores.

[0438] Además, se observa una extensa infiltración/expansión del tumor mediante macrófagos F4/80 positivos (véase la **FIG. 30A-30D**). Esto puede ser indicativo de que los macrófagos M1 (antitumorales) eliminan los restos de células cancerosas generados por células citotóxicas y es presumiblemente una consecuencia directa de la inhibición de TGFβ1. Como se describe con más detalle en los Ejemplos de este documento, estos macrófagos infiltrantes de tumores se identifican predominantemente como macrófagos no M2 por su falta de expresión de CD163, lo que indica que los monocitos circulantes se reclutan en el sitio del tumor tras el tratamiento con inhibidor de punto de control e inhibidor de TGFβ1 y diferenciarse en macrófagos M1, y esta observación se acompaña de un marcado influxo de células T CD8+ en el sitio del tumor. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para aumentar los macrófagos no M2 asociados con el tumor.

[0439] Recientemente, la terapia de punto de control de bloqueo (CBT) se ha convertido en un estándar de cuidado para el tratamiento de un número de tipos de cáncer (véase, por ejemplo, la **FIG. 25B**). A pesar de los profundos avances en la inmunoterapia contra el cáncer, la resistencia primaria a la TCC sigue siendo una de las principales necesidades insatisfechas de los pacientes; la mayoría de los cánceres de los pacientes aún no responden a la inhibición de PD-(L)1. El análisis retrospectivo del cáncer de urotelio y los tumores de melanoma ha implicado recientemente la activación de TGFβ como un impulsor potencial de la resistencia primaria, muy probablemente a través de múltiples mecanismos que incluyen la exclusión de las células T citotóxicas del tumor, así como su expansión dentro del microambiente del tumor (exclusión inmune). Estas observaciones y la posterior validación preclínica han apuntado a la inhibición de la vía del TGFβ como una vía prometedora para superar la resistencia primaria a la TCC. Sin embargo, el direccionamiento terapéutico de la vía del TGFβ se ha visto obstaculizado por cardiotoxicidades preclínicas limitantes de la dosis, muy probablemente debido a la inhibición de la señalización de una o más isoformas del TGFβ.

[0440] Muchos tumores carecen de respuesta primaria a CBT. En este escenario, las células T CD8+ comúnmente se excluyen del parénquima tumoral, lo que sugiere que los tumores pueden cooptar las funciones inmunomoduladoras de la señalización del TGFβ para generar un microambiente inmunosupresor. Estos conocimientos de los análisis de muestras de tumores clínicos retrospectivos proporcionaron el fundamento para investigar el papel de la señalización de TGFβ en la resistencia primaria a la TCC.

[0441] Varias conclusiones clave pueden extraerse basándose en los resultados del presente estudio. Primero, el análisis de expresión génica de los datos de TCGA indica que TGFβ1 es la isoforma más prevalente en la mayoría de los tipos de tumores humanos y, por lo tanto, es el impulsor más probable de la señalización de TGFβ, por lo tanto, el culpable inmunosupresor que impulsa la resistencia primaria a CBT en estos tumores.

[0442] En segundo lugar, la inhibición selectiva de la activación de TGFβ1 parece suficiente para superar la resistencia primaria a CBT. Al dirigirse al prodominio de TGFβ1 latente, un inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad del TGFβ1 logra una especificidad de isoforma exquisita e inhibe la activación de TGFβ1 latente en todos los contextos moleculares conocidos. La evaluación farmacológica de uno de estos anticuerpos en modelos de tumores singénicos demostró que el tratamiento con este anticuerpo es suficiente para hacer que los tumores resistentes a anti-PD-1 sean sensibles a la terapia de bloqueo de puntos de control. Es importante destacar que la eficacia antitumoral de la combinación de inhibidor anti-PD-1/TGFβ1 se demostró en tres tipos de tumores diferentes, incluido un modelo en donde TGFβ1 no era la única isoforma de TGFβ presente en el tumor. Esto sugiere que, dentro del microambiente tumoral, es probable que TGFβ1 juegue un papel inmunomodulador mientras que otras isoformas pueden no ser relevantes para esta biología. Esta observación abre la posibilidad de que la inhibición selectiva TGFβ1 puede tener un potencial terapéutico en la superación de la resistencia primaria a la TCC a través de un amplio espectro de cánceres, independientemente de la expresión de otras isoformas de TGFβ.

[0443] En tercer lugar, la inhibición selectiva de la actividad de la ruta impulsada por TGFβ1 da como resultado una seguridad preclínica significativamente mejorada frente a una amplia inhibición de toda la actividad de isoformas. Los efectos pleiotrópicos asociados con una amplia inhibición de la vía del TGFβ han obstaculizado el direccionamiento terapéutico de la ruta del TGFβ. La mayoría de los tratamientos experimentales hasta la fecha (p. ej., Galunisertib, LY3200882, fresolimumab) carecen de selectividad para una única isoforma de TGFβ, lo que contribuye potencialmente a las toxicidades limitantes de la dosis observadas en estudios clínicos y no clínicos. Los datos genéticos de ratones knockout y mutaciones de pérdida de función humana en los genes TGFβ2 o TGFβ3 sugieren que las toxicidades cardíacas observadas con inhibidores inespecíficos del TGFβ pueden deberse a la inhibición de TGFβ2 o TGFβ3. La divulgación enseña que la inhibición selectiva de la activación de TGFβ1 con dicho anticuerpo tiene un perfil de seguridad mejorado y es suficiente para provocar respuestas antitumorales sólidas cuando se combina con el bloqueo de PD-1, lo que permite la evaluación de la eficacia del inhibidor de TGFβ1 a niveles de dosis clínicamente tratables.

[0444] Para diseccionar los procesos inmunológicos asociados con la inmunidad anti-tumor durante el tratamiento de combinación de inhibidor de TGFβ1/anti-PD-1, se llevó a cabo un análisis más detallado de las respuestas en el modelo de cáncer de vejiga MBT-2. El bloqueo simultáneo de la actividad de PD-1 y TGFβ1 indujo un cambio profundo en la

contextura inmune intratumoral, impulsado en gran parte por un aumento de 10 veces en las células T CD8+. Estas células T CD8+ probablemente participaron en la destrucción de las células tumorales, ya que los genes citolíticos clave, la perforina y la granzima B, también se regularon positivamente en los tumores mediante el tratamiento de combinación. En particular, el enriquecimiento significativo de células Treg por el tratamiento de combinación con inhibidor anti-PD-1/TGFβ1 fue algo inesperado, dada la importancia de la señalización de TGFβ para el mantenimiento periférico de Treg. Sin embargo, a medida que las células Treg se reclutan en los sitios de inflamación, su aumento numérico puede interpretarse como un marcador de una respuesta inmunitaria sólida. No obstante, las células T CD8+ pudieron adoptar un fenotipo activado y provocar una fuerte respuesta antitumoral a pesar de un aumento en el número de células Treg. Una posible explicación podría ser que las células Treg no contribuyen significativamente al microambiente inmunosupresor del tumor MBT-2 y que otras poblaciones de células inmunitarias supresoras, por ejemplo, las células mieloides, desempeñan un papel más importante. Alternativamente, y sin excluir mutuamente esta posibilidad, dado que TGFβ1 es un mediador clave de la inmunosupresión impulsada por Treg, la presencia del inhibidor de TGFβ1 también puede anular esta actividad a pesar del aumento en el número de Treg.

[0445] Un resultado sorprendente proporcionado en este documento incluye la observación histológica de una estrecha asociación de las células T CD8+ con vasculatura tumoral CD31+. Este patrón de enriquecimiento respalda la hipótesis de que una ruta clave de entrada de células T en el tumor es a través de la vasculatura del tumor, y que las células comienzan a migrar radialmente hacia afuera en el tumor una vez que se extravasan de los vasos sanguíneos del tumor. Mariathasan et al. encontraron que las células T CD8+ parecían acumularse a lo largo de la matriz de colágeno y la capa rica en fibroblastos en el borde de ataque del tumor en el modelo de cáncer de mama EMT-6, lo que llevó a la especulación de que esta matriz contribuyó a la exclusión de las células T. En contraste con esta observación, no fue posible detectar de manera consistente un área fibroblástica densa cerca del borde de ataque de los tumores MBT-2. La observación del solicitante del enriquecimiento de células T en las proximidades de la vasculatura (p. ej., enriquecimiento perivascular) sugiere que, además de la capa de fibroblastos asociada al cáncer, las células endoteliales vasculares que responden al TGFβ1 o las células endoteliales vasculares sensibles al cáncer también podrían imponer la exclusión inmune en proximidad cercana al endotelio. De acuerdo con la posibilidad de que la señalización de TGFβ1 pueda estar influyendo en la función endotelial, la observación de Applan incluye que la tinción con fosfo-SMAD3 en los tumores de control fue más fuerte en los núcleos dentro de lo que parecen ser células endoteliales vasculares tumorales. Esta tinción fue sensible a la inhibición selectiva de TGFβ1, lo que sugiere que estas células responden al TGFβ1 y pueden ser clave para hacer cumplir la exclusión inmunitaria, quizás al influir en la extravasación de células T mediante la regulación del rendimiento de la integridad de la barrera vascular. Además, también se ha descrito que los macrófagos asociados a tumores están muy próximos a la vasculatura del tumor y pueden estar involucrados en la generación de un microambiente tumoral excluido inmunológicamente, ya sea por activación de TGFβ1 o liberando otras proteínas de superficie inmunosupresoras o factores secretados en o cerca de la vasculatura. Es probable que estén en juego múltiples rutas para que las células T entren en un tumor, y una mejor comprensión de estos mecanismos ayudará en la identificación de nuevos objetivos terapéuticos o informará sobre posibles mecanismos de resistencia tumoral.

[0446] Además del impacto esperado y observado en la disposición de las células T citotóxicas dentro de los tumores, el tratamiento de combinación de inhibidor de TGFβ1/anti-PD-1 también beneficiosamente impacta los inmunosupresores de compartimento mieloides. Las células mieloides CD11b+ comprendían casi el 80% del infiltrado inmunitario en los tumores MBT-2 no tratados, pero su representación se redujo a menos del 40% con el tratamiento de combinación. Esto fue impulsado completamente por una pérdida de macrófagos inmunosupresores similares a M2 y una reducción aún más profunda de las MDSC, mientras que la población de macrófagos proinflamatorios similares a M1 permaneció sin cambios en la representación. El mecanismo por el cual el tratamiento combinado impulsa la reducción específica de células mieloides inmunosupresoras no está claro, al igual que el papel de la señalización del TGFβ1 en el reclutamiento, desarrollo o mantenimiento de estas células en el microambiente tumoral. Se sabe que la señalización de TGFβ, entre otros factores, polariza a los macrófagos en un tipo M2. Además, existe evidencia que sugiere que TGFβ es parcialmente responsable del desarrollo de MDSC y la adquisición de funciones supresoras. Además, es probable que el flujo de células T secretoras de IFNγ emparejado con el microambiente tumoral alterado contribuyó tanto a la repolarización como a la reducción del tráfico de células mieloides inmunosupresoras. Independientemente del mecanismo subyacente, sería muy deseable una reducción de las células mieloides inmunosupresoras intratumorales como parte de un enfoque de inmunoterapia tumoral, ya que la presencia de esta población celular se correlaciona con un mal pronóstico del paciente y resistencia a la terapia de bloqueo de puntos de control. Por lo tanto, una estrategia terapéutica que incluye la orientación de estos importantes tipos de células inmunosupresoras puede tener un efecto mayor que dirigidas a un único tipo de célula inmunosupresor (es decir, sólo las células Treg) en el microambiente tumoral. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para reducir células inmunosupresoras asociadas a tumores, tales como macrófagos M2 y MDSC.

[0447] Como se mencionó anteriormente, es importante tener en cuenta que el TGFβ1 es probable expresa por múltiples tipos de células en el microambiente del tumor, incluyendo células Treg, células mieloides supresoras, fibroblastos, así como células tumorales. Cada una de estas fuentes celulares produce TGFβ1 en diferentes LLC: las células Treg activadas expresan GARP LLC en su superficie; las células mieloides supresoras expresan LLC de LRRC33 en su superficie, y es probable que los fibroblastos expresen y depositen LLC de LTBP en la matriz extracelular circundante. Es probable que cada una de estas fuentes de TGFβ1 "activable" pueda desempeñar un papel en la promoción de la exclusión inmunitaria y la supresión inmunitaria en el tumor, y que las contribuciones relativas de cada fuente podrían variar entre diferentes tipos de tumores. Curiosamente, el perfil de ARNm de los tumores MBT-2 y EMT6 usados en estos

estudios indicó que LRRC33 y LTBP1 son los componentes LLC más altamente expresados, y los tumores Cloudman S91 parecen expresar exclusivamente LRRC33 (FIG. 25H). Como tal, los profundos efectos antitumorales de la combinación de inhibidor selectivo de TGFβ1/anti-PD-1 en estos modelos, junto con la capacidad demostrada del inhibidor de TGFβ1 descrito en este documento para bloquear de forma potente la activación de TGFβ1 en todos los contextos de LLC conocidos, sugieren fuertemente que la inhibición selectiva de LLC específicas (p. ej., GARP en células Treg) puede no ser suficiente para crear una respuesta antitumoral máxima en algunos tumores.

[0448] Por lo tanto, los estudios preclínicos y los resultados presentados en este documento demuestran que la inhibición altamente específica de TGFβ1 de activación permite que el sistema inmunitario del huésped supere un mecanismo clave de la resistencia primaria a la terapia de bloqueo de punto de control, evitando al mismo tiempo las toxicidades previamente reconocidas de inhibición de TGFβ más amplia que ha sido una limitación clave para la aplicación clínica. Los resultados descritos en el presente documento sugieren que el tratamiento con un inhibidor de TGFβ1 de alta afinidad puede expandir significativamente el número de pacientes que podrían beneficiarse de las terapias de bloqueo de puntos de control.

[0449] Por consiguiente, como se demuestra en los Ejemplos de este documento, pueden usarse inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGFβ1 para contrarrestar la resistencia primaria a la CBT, haciendo así que el tumor/cáncer sea más susceptible a la CBT. Dichos efectos pueden ser aplicables al tratamiento de un amplio espectro de tipos de enfermedad maligna, donde el cáncer/tumor es TGFβ1 positivo. En algunas formas de realización, dicho tumor/cáncer puede expresar además una isoforma adicional, como TGFβ3. Los ejemplos no limitantes de este último pueden incluir ciertos tipos de carcinoma, como el cáncer de mama.

[0450] Por consiguiente, la divulgación proporciona criterios de selección preferidos para identificar o seleccionar un paciente o poblaciones/subpoblaciones de pacientes para las que es probable que los inhibidores de TGFβ1 de alta afinidad, independientes del contexto, logren un beneficio clínico. En algunas formas de realización, los fenotipos adecuados de tumores humanos incluyen: i) se muestra que un subconjunto o subconjuntos son representativos de CBT (p. ej., bloqueo del eje PD-(L)1); ii) evidencia de exclusión inmunitaria; y/o, iii) evidencia de expresión de TGFβ1 y/o señalización de TGFβ. Varios tipos de cáncer se ajustan al perfil, incluidos, por ejemplo, el melanoma y el cáncer de vejiga.

[0451] Como se mencionó anteriormente, los inhibidores independientes del contexto de TGFβ1 de activación pueden ser utilizados en el tratamiento del melanoma. Los tipos de melanoma que pueden tratarse con tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a: Lentigo maligno; Melanoma lentigo maligno; Melanoma de extensión superficial; Melanoma lentiginoso acral; Melanoma de mucosas; Melanoma nodular; Melanoma polipoide y Melanoma desmoplásico. En algunas formas de realización, el melanoma es un melanoma metastásico.

[0452] Más recientemente, inhibidores de punto de control inmunitario se han utilizado para tratar con eficacia pacientes con melanoma avanzado. En particular, los anticuerpos de muerte anti-programada (PD)-1 (p. ej., Nivolumab y pembrolizumab) se han convertido ahora en el estándar de atención para ciertos tipos de cáncer, como el melanoma avanzado, que han demostrado una actividad significativa y una respuesta duradera con un perfil de toxicidad manejable. Sin embargo, la aplicación clínica eficaz de los antagonistas de PD-1 se ve obstaculizada por una alta tasa de resistencia innata (~ 60-70%) (véanse Hugo et al. (2016) Cell165: 35-44), lo que ilustra que los desafíos en curso continúan incluyendo las cuestiones de selección de pacientes y predictores de respuesta y resistencia, así como la optimización de estrategias de combinación (Perrot et al. (2013) Ann Dermatol 25(2): 135-144). Además, los estudios han sugerido que aproximadamente el 25% de los pacientes con melanoma que respondieron inicialmente a una terapia anti-PD-1 finalmente desarrollaron resistencia adquirida (Ribas et al. (2016) JAMA 315: 1600-9).

[0453] El número de células T CD8+ infiltrantes de tumores que expresan aparece PD-1 y/o CTLA-4 para ser un indicador clave del éxito con la inhibición de punto de control, y el bloqueo tanto de PD-1 como de CTLA-4 puede aumentar las células T infiltrantes. En pacientes con mayor presencia de macrófagos asociados a tumores, sin embargo, se pueden suprimir los efectos anticancerígenos de las células CD8.

[0454] Se contempla que las células, tales como células mieloides, incluyendo precursores mieloides, MDSC y TAM, pueden crear o apoyar un entorno inmunosupresor (como TME y la médula ósea mielofibrótica) LRRC33 expresan mediante la inhibición de las células T (p. ej., depleción de células T), como las células T CD4 y/o CD8, que pueden subrayar al menos en parte la resistencia anti-PD-1 observada en determinadas poblaciones de pacientes. De hecho, la evidencia sugiere que la resistencia a la monoterapia anti-PD-1 estuvo marcada por la incapacidad de acumular células T citotóxicas CD8+ y una proporción reducida de Teff/Treg. En particular, los presentes inventores han reconocido que existe una bifurcación entre ciertos pacientes con cáncer, como una población de pacientes con melanoma, con respecto a los niveles de expresión de LRRC33: un grupo exhibe una expresión de LRRC33 alta (LRRC33 alta), mientras que el otro grupo exhibe una expresión de LRRC33 relativamente baja (LRRC33 baja). Por tanto, la invención incluye la noción de que la población de pacientes de LRRC33 alta puede representar aquellos que responden mal o son resistentes a la terapia inhibidora del punto de control inmunológico. Por consiguiente, los agentes que inhiben LRRC33, como los descritos en este documento, pueden ser particularmente beneficiosos para el tratamiento del cáncer, como el melanoma, el linfoma y los trastornos mieloproliferativos, que es resistente a la terapia con inhibidores de puntos de control (p. ej., anti-PD-1).

[0455] En algunas formas de realización, el cáncer/tumor es intrínsecamente resistente o que no responde a un inhibidor de punto de control inmune (p. ej., la resistencia primaria). Para dar solo un ejemplo, ciertos linfomas parecen responder poco a la inhibición de los puntos de control inmunológico, como la terapia anti-PD-1. De manera similar, se sabe que un subconjunto de la población de pacientes con melanoma muestra resistencia a los inhibidores de los puntos de control inmunitarios. Sin pretender ceñirse a una teoría particular, los inventores de la presente divulgación contemplan que esto puede deberse al menos en parte a la regulación positiva de las vías de señalización de TGFβ1, que pueden crear un microambiente inmunosupresor donde los inhibidores de puntos de control no ejercen sus efectos. La inhibición de TGFβ1 puede hacer que dicho cáncer responda mejor a la terapia con inhibidores de puntos de control. Ejemplos no limitantes de tipos de cáncer que pueden beneficiarse de una combinación de un inhibidor del punto de control inmunológico y un inhibidor de TGFβ1 incluyen: mielofibrosis, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de colon, neoplasias hematológicas, carcinoma de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma (clásico de Hodgkin y no Hodgkin), cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer con alta inestabilidad de microsatélites, cáncer con deficiencia de reparación de desajustes, cáncer gástrico, cáncer renal y cáncer hepatocelular. Sin embargo, cualquier cáncer (p. ej., pacientes con dicho cáncer) en donde TGFβ1 se sobreexpresa o es la isoforma dominante sobre TGFβ2/3, según lo determinado, por ejemplo, mediante biopsia, puede tratarse con un inhibidor selectivo de isoformas de TGFβ1. de acuerdo con la presente divulgación.

[0456] En algunas formas de realización, un cáncer/tumor se vuelve resistente en el tiempo. Este fenómeno se conoce como resistencia adquirida. Al igual que la resistencia primaria, en algunas formas de realización, la resistencia adquirida es al menos en parte mediada por vías dependientes de TGFβ1, inhibidores de TGFβ1 específicos a isoformas descritos en este documento puede ser eficaz en la restauración de la inmunidad contra el cáncer en estos casos. Los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para reducir la recurrencia del tumor. Los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para mejorar la durabilidad de la terapia contra el cáncer como CBT. El término "durabilidad" utilizado en el contexto de las terapias se refiere al tiempo entre los efectos clínicos (p. ej., control de tumores) y el recrecimiento del tumor (p. ej., recurrencia). Presumiblemente, la durabilidad y la recurrencia pueden correlacionarse con la resistencia secundaria o adquirida, donde la terapia a la que el paciente respondió inicialmente deja de funcionar. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para aumentar la duración del tiempo que la terapia del cáncer permanece efectiva. Los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para reducir la probabilidad de desarrollar resistencia adquirida entre los respondedores a la terapia. Los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención pueden usarse para mejorar la supervivencia libre de progresión en pacientes.

[0457] En algunas formas de realización, los inhibidores TGFβ1 de la presente invención se pueden usar para mejorar las tasas o proporciones de respuestas completas en comparación con parciales entre los respondedores de una terapia del cáncer. Por lo general, incluso en los tipos de cáncer donde las tasas de respuesta a una terapia contra el cáncer (como la TCC) son relativamente altas (p. ej., ≥ 35%), las tasas de CR son bastante bajas. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 de la presente invención se utilizan para aumentar la fracción de respondedores completos dentro de la población de respondedores.

[0458] Además, los inhibidores pueden ser también eficaces para mejorar o aumentar el grado de respuestas parciales entre los respondedores parciales.

[0459] En algunas formas de realización, la terapia de combinación que comprende un inhibidor de punto de control inmunitario y un inhibidor de LRRC33 (tales como los descritos en el presente documento) puede ser eficaz para tratar dicho cáncer. Además, un alto infiltrado de células positivas para LRRC33 en tumores, o en otros sitios/tejidos con proliferación celular anormal, puede servir como un biomarcador para la inmunosupresión del huésped y la resistencia a los puntos de control inmunológico. De manera similar, las células T efectoras pueden excluirse del nicho inmunosupresor que limita la capacidad del cuerpo para combatir el cáncer. Además, como se demuestra en la sección de Ejemplos a continuación, las Treg que expresan TGFβ1 presentado por GARP suprimen la proliferación de células T efectoras. Juntos, TGFβ1 es probablemente un impulsor clave en la generación y mantenimiento de un microambiente de la enfermedad inmunológico inhibidor (como TME), y múltiples contextos de presentación de TGFβ1 son relevantes para los tumores. En algunas formas de realización, la terapia de combinación puede lograr relaciones Teff/Treg más favorables.

[0460] Los anticuerpos, o porciones de unión de antígeno de los mismos de acuerdo con la invención, como se describe en el presente documento, se puede utilizar en métodos para el tratamiento de cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método la administración del anticuerpo, o porción de unión de antígeno del mismo, al sujeto de manera que se trate el cáncer. En determinadas formas de realización, el cáncer es cáncer de colon. En determinadas formas de realización, el cáncer es un melanoma. En determinadas formas de realización, el cáncer es cáncer de vejiga. En determinadas formas de realización, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello. En determinadas formas de realización, el cáncer es cáncer de pulmón.

[0461] Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden usarse en métodos para el tratamiento de tumores sólidos. En algunas formas de realización, los tumores sólidos pueden ser tumores desmoplásicos, que normalmente son densos y difíciles de penetrar para las moléculas terapéuticas. Al dirigirse al componente ECM de tales tumores, dichos anticuerpos pueden "aflojar" el tejido tumoral denso para desintegrarse, facilitando el acceso terapéutico para ejercer sus efectos anticancerígenos. Por tanto, pueden usarse en combinación agentes terapéuticos adicionales,

tales como cualquier fármaco antitumoral conocido.

[0462] Adicional o alternativamente, anticuerpos independientes del contexto, específicos de isoforma para fragmentos de los mismos que son capaces de inhibir la activación de TGFβ1, tales como los descritos en este documento, pueden usarse junto con el receptor de antígeno quimérico de células T ("CAR-T") como la inmunoterapia basada en células, como la inmunoterapia contra el cáncer para combatir el cáncer.

[0463] Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la invención, como se describen en este documento, se pueden usar en métodos para inhibir o disminuir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto que tiene un tumor sólido, comprendiendo dicho método la administración del anticuerpo o antígeno de unión del mismo, al sujeto de manera que se inhiba o disminuya el crecimiento del tumor sólido. En determinadas formas de realización, el tumor sólido es un tumor de carcinoma de colon.

[0464] La invención incluye el uso de inhibidores específicos a las isoformas independientes del contexto de TGFβ1 según la invención en el tratamiento de cáncer que comprende un tumor sólido en un sujeto. En algunas formas de realización, tal inhibidor específico de isoforma, independiente del contexto, puede inhibir la activación de TGFβ1. En formas de realización preferidas, tal inhibidor de activación es un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une a un complejo de proTGFβ1. La unión puede ocurrir cuando el complejo está asociado con cualquiera de las moléculas de presentación, por ejemplo, LTBP1, LTBP3, GARP o LRRC33, inhibiendo así la liberación del factor de crecimiento TGFβ1 maduro del complejo. En algunas formas de realización, el tumor sólido se caracteriza por tener un estroma enriquecido con células T CD8+ que hacen contacto directo con los CAF y las fibras de colágeno. Dicho tumor puede crear un entorno inmunosupresor que evita que las células inmunitarias antitumorales (p. ej., células T efectoras) se infiltran eficazmente en el tumor, lo que limita la capacidad del cuerpo para combatir el cáncer. En cambio, estas células pueden acumularse dentro o cerca del estroma del tumor. Estas características pueden hacer que dichos tumores respondan mal a una terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios. Como se analiza con más detalle a continuación, los inhibidores de TGFβ1 descritos en el presente documento pueden desbloquear la supresión para permitir que las células efectoras alcancen y destruyan las células cancerosas, por ejemplo, si se usan junto con un inhibidor de puntos de control inmunológico.

[0465] TGFβ1 se contempla para desempeñar papeles multifacéticos en un microambiente tumoral, incluyendo el crecimiento de tumores, supresión inmune del huésped, la proliferación de células malignas, la vascularidad, la angiogénesis, migración, invasión, metástasis y quimiorresistencia. Por tanto, cada "contexto" de presentación de TGFβ1 en el medio ambiente puede participar en la regulación (o desregulación) de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, el eje GARP es particularmente importante en la respuesta Treg que regula la respuesta de las células T efectoras para mediar la respuesta inmunitaria del huésped para combatir las células cancerosas. El eje LTBP1/3 puede regular la ECM, incluido el estroma, donde los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) desempeñan un papel en la patogénesis y progresión del cáncer. El eje LRRC33 puede desempeñar un papel crucial en el reclutamiento de monocitos circulantes en el microambiente tumoral, la posterior diferenciación en macrófagos asociados a tumores (TAM), la infiltración en el tejido tumoral y la exacerbación de la enfermedad.

[0466] En algunas formas de realización, TGFβ1 que expresan las células se infiltran en el tumor, creando o contribuyendo a un medio ambiente local inmunosupresor. El grado en donde se observa dicha infiltración puede correlacionarse con un peor pronóstico. En algunas formas de realización, una mayor infiltración es indicativa de una peor respuesta al tratamiento a otra terapia contra el cáncer, como los inhibidores de puntos de control inmunitarios. En algunas formas de realización, las células que expresan TGFβ1 en el microambiente tumoral comprenden células inmunitarias inmunosupresoras tales como Tregs y/o células mieloides. En algunas formas de realización, las células mieloides incluyen, pero no se limitan a: macrófagos, monocitos (residentes en tejidos o derivados de la médula ósea) y MDSC.

[0467] En algunas formas de realización, las células que expresan LRRC33 en el TME son células supresoras mieloides derivadas (MDSCs). La infiltración de MDSC (p. ej., infiltrado de tumor sólido) puede subrayar al menos un mecanismo de escape inmunitario, al crear un nicho inmunosupresor del que quedan excluidas las células inmunitarias antitumorales del huésped. La evidencia sugiere que las MDSC son movilizadas por señales asociadas con la inflamación, como los factores inflamatorios asociados con el tumor, la movilización de Opon, las MDSC pueden influir en los efectos inmunosupresores al alterar las células que combaten enfermedades, como las células T CD8+ y las células NK. Además, las MDSC pueden inducir la diferenciación de Tregs secretando TGFβ e IL-10, lo que se suma a los efectos inmunosupresores. Por tanto, un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma, como los descritos en este documento, puede administrarse a pacientes con evasión inmunitaria (p. ej., vigilancia inmunitaria comprometida) para restaurar o potenciar la capacidad del cuerpo para combatir la enfermedad (como un tumor). Como se describe con más detalle en el presente documento, esto puede mejorar aún más (p. ej., restaurar o potenciar) la capacidad de respuesta o sensibilidad del cuerpo a otra terapia, como la terapia del cáncer.

[0468] En algunas formas de realización, frecuencias elevadas (p. ej., número) de circulación MDSCs en pacientes son predictivos de la pobre capacidad de respuesta a las terapias de bloqueo de punto de control, tal como antagonistas PD-1 y antagonistas de PD-L1. Por ejemplo, los estudios de biomarcadores mostraron que las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) HLA-DR lo/CD14 +/-CD11b+ antes del tratamiento circulantes se asociaron con progresión y peor SG (p = 0,0001 y 0,0009). Además, la resistencia al bloqueo del punto de control de PD-1 en el carcinoma inflamado de

cabeza y cuello (HNC) se asocia con la expresión de marcadores de GM-CSF y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). Esta observación sugirió que las estrategias para reducir las MDSC, como la quimioterapia, deben considerarse en combinación o secuencialmente con anti-PD-1. Los complejos LRRC33 o LRRC33-TGFP representan un nuevo objetivo para la inmunoterapia del cáncer debido a la expresión selectiva en células mieloides inmunosupresoras. Por lo tanto, sin pretender ceñirse a una teoría particular, la selección de este complejo puede mejorar la eficacia de las terapias con inhibidores de puntos de control de atención estándar en la población de pacientes.

[0469] La invención proporciona por lo tanto un inhibidor de TGFβ1 específico a isoforma de alta afinidad de acuerdo con la invención descrita en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende un tumor sólido. Dicho tratamiento comprende la administración del inhibidor de TGFβ1 a un sujeto diagnosticado con cáncer que incluye al menos un tumor localizado (tumor sólido) en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. Preferiblemente, el sujeto se trata además con una terapia contra el cáncer, como CBT, quimioterapia y/o radioterapia. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 aumenta la tasa/fracción de una población de pacientes con respuesta primaria a la terapia contra el cáncer. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 aumenta el grado de respuesta de los respondedores primarios a la terapia del cáncer. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 aumenta la proporción de respondedores completos a respondedores parciales a la terapia del cáncer. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 aumenta la durabilidad de la terapia contra el cáncer de manera que se prolonga la duración antes de la recurrencia y/o antes de que la terapia contra el cáncer se vuelva ineficaz. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 reduce las apariciones o la probabilidad de resistencia adquirida a la terapia del cáncer entre los respondedores primarios.

[0470] La evidencia sugiere que la progresión del cáncer (p. ej., proliferación/crecimiento tumoral, invasión, angiogénesis y metástasis) puede estar impulsada al menos en parte por la interacción tumor-estroma. En particular, los CAF pueden contribuir a este proceso mediante la secreción de diversas citoquinas y factores de crecimiento y la remodelación de la ECM. Los factores involucrados en el proceso incluyen, entre otros, el factor 1 derivado de células estromales (SCD-1), MMP2, MMP9, MMP3, MMP-13, TNF-α, TGFβ1, VEGF, IL-6, M- LCR. Además, los CAF pueden reclutar TAM secretando factores como CCL2/MCP-1 y SDF-1/CXCL12 en el sitio del tumor; posteriormente, se crea un nicho de pro-TAM (p. ej., áreas estromales enriquecidas con hialuronano) donde los TAM se unen preferentemente. Dado que se ha sugerido que el TGFβ1 promueve la activación de fibroblastos normales en CAF similares a miofibroblastos, la administración de un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto y específico de isoforma, como los descritos en este documento, puede ser eficaz para contrarrestar las actividades de los CAF que promueven el cáncer. De hecho, los datos presentados aquí sugieren que un anticuerpo independiente del contexto específico de isoforma que bloquea la activación de TGFβ1 puede inhibir la regulación positiva inducida por UUO de genes creadores tales como CCL2/MCP-1, α-SMA, FN1 y Col1, que también están implicados en muchos cánceres.

[0471] En ciertas formas de realización, los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se administran a un sujeto que tiene cáncer o un tumor, ya sea solo o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 (p. ej., una antagonista anti-PD-1). Otras terapias de combinación que se incluyen en la invención son la administración de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo según la invención descrita en el presente documento, con radiación (Radioterapia) o un agente quimioterapéutico (quimioterapia). Agentes adicionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a un antagonista de PD-1, un antagonista de PDL1, una proteína de fusión de PD-L1 o PDL2, un antagonista de CTLA4, un agonista de GITR, un anticuerpo anti-ICOS, un anticuerpo anti-ICOSL, un anticuerpo anti-B7H3, un anticuerpo anti-B7H4, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-OX40 (agonista de OX40), un anticuerpo anti-CD27, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD47 anticuerpo, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CD20, un inhibidor de CDK, un virus oncolítico y un inhibidor de PARP. Los ejemplos de virus oncolíticos útiles incluyen adenovirus, reovirus, sarampión, herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, senecavirus, enterovirus y vaccinia. En formas de realización preferidas, el virus oncolítico se modifica por ingeniería genética para la selectividad tumoral.

[0472] En algunas formas de realización, la determinación o selección de un enfoque terapéutico para la terapia de combinación que se adapte a tipos de cáncer o población de pacientes particulares puede implicar lo siguiente: a) consideraciones con respecto a los tipos de cáncer para los que está disponible una terapia de atención estándar (p. ej., indicaciones aprobadas para inmunoterapia); b) consideraciones con respecto a subpoblaciones resistentes al tratamiento (p. ej., tumores inmunes excluidos/resfriados); y c) consideraciones con respecto a cánceres/tumores que son o generalmente se sospecha que son "activos en la vía del TGFβ1" o de otra manera al menos en parte dependientes de TGFβ1 (p. ej., sensibles a la inhibición de TGFβ1). Por ejemplo, muchas muestras de cáncer muestran que TGFβ1 es la isoforma predominante mediante, por ejemplo, análisis TCGA RNAseq. En algunas formas de realización, más del 50% (p. ej., más del 50%, 60%, 70%, 80% y 90%) de las muestras de cada tipo de tumor son positivas para la expresión de la isoforma de TGFβ1. En algunas formas de realización, los cánceres/tumores que son "vías activas para TGFβ1" o de otra manera al menos en parte dependientes de TGFβ1 (p. ej., TGFβ1 sensible a la inhibición) contienen al menos una mutación Ras, tal como mutaciones en K-ras, N-ras y/o H-ras. En algunas formas de realización, el cáncer/tumor comprende al menos una mutación K-ras.

[0473] La confirmación de la expresión de TGFβ1 en muestras clínicas recogidas de pacientes (tales como muestras de biopsia) no es un requisito previo para la terapia de inhibición de TGFβ1, donde se sabe o se sospecha que la afección particular implica generalmente la vía de TGFβ.

[0474] En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto específicos a isoformas se administra en conjunción con la terapia inhibidora de punto de control a los pacientes con diagnóstico de cáncer para los que se aprobaron o muestran eficaz de una o más terapias de inhibidor de puntos de control. Estas incluyen, pero no se limitan a: carcinoma urotelial de vejiga, carcinoma de células escamosas (como cabeza y cuello), carcinoma de células claras de riñón, carcinoma de células papilares de riñón, carcinoma hepatocelular de hígado, adenocarcinoma de pulmón, melanoma cutáneo de piel y adenocarcinoma de estómago. En formas de realización preferidas, dichos pacientes responden mal o no responden a la terapia con inhibidores de puntos de control. En algunas formas de realización, la escasa capacidad de respuesta se debe a la resistencia primaria. En algunas formas de realización, el cáncer que es resistente al bloqueo de puntos de control muestra una regulación a la baja de la expresión de TCF7. En algunas formas de realización, la regulación a la baja de TCF7 en tumores resistentes a la inhibición de puntos de control puede correlacionarse con un número bajo de linfocitos T CD8+ intratumorales.

[0475] El inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto específico a isoformas puede ser utilizado en el tratamiento de los cánceres de la quimioterapia o radioterapia-resistente. Por tanto, en algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto y específico de isoformas se administra a pacientes diagnosticados con cáncer para los que reciben o han recibido quimioterapia y/o radioterapia. En particular, el uso del inhibidor de TGFβ1 es ventajoso cuando el cáncer (paciente) es resistente a dicha terapia. En algunas formas de realización, dicho cáncer comprende células cancerosas de propagación tumoral en reposo (TPC), en las que la señalización de TGFβ controla su entrada reversible en un estado de detención del crecimiento, que protege a los TPC de la quimioterapia o la radioterapia. Se contempla que tras la inhibición farmacológica de TGFβ1, los TPC comprometidos no logran entrar en reposo y, por lo tanto, se vuelven susceptibles a quimioterapia y/o radioterapia. Dicho cáncer incluye varios carcinomas, por ejemplo, carcinomas de células escamosas. Véase, por ejemplo, Brown et al. (2017) "TGF-β-Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma." *Cell Stem Cell*. 21(5): 650-664.

[0476] En algunas formas de realización, cáncer de TGFβ1 positivo a ser tratado con el inhibidor de TGFβ1 también es TGFβ3 positivo (es decir, cáncer TGFβ1+/TGFβ3+) caracterizado porque el tejido de la enfermedad (p. ej., tumor) coexpresa ambas isoformas. En algunas formas de realización, tales tumores son codominantes con las isoformas de TGFβ1 y TGFβ3. Por consiguiente, la invención incluye el uso de un inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas junto con un inhibidor de TGFβ3 selectivo de isoformas en el tratamiento de tales afecciones. Los ejemplos no limitantes de cánceres TGFβ1+/TGFβ3+ incluyen, pero no se limitan a: carcinoma de mama (p. ej., carcinoma invasivo de mama), colangiocarcinoma, glioblastoma multiforme, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células claras de riñón, carcinoma de células escamosas pulmonares, mesotelioma, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de próstata, sarcoma, timoma y carcinosarcoma uterino.

Trastornos mieloproliferativos / mielofibrosis

[0477] La presente divulgación proporciona el uso terapéutico de alta afinidad, los inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1 tales como los descritos en el presente documento en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Estos incluyen, por ejemplo, síndrome mielodisplásico (SMD) y mielofibrosis (p. ej., mielofibrosis primaria y mielofibrosis secundaria).

[0478] La mielofibrosis, también conocida como osteomielofibrosis, es un trastorno proliferativo de la médula ósea (cáncer) relativamente raro, que pertenece a un grupo de enfermedades denominadas trastornos mieloproliferativos. La mielofibrosis se clasifica en la rama de neoplasias mieloproliferativas con cromosoma Filadelfia negativo (-). La mielofibrosis se caracteriza por mieloproliferación clonal, producción aberrante de citoquinas, hematopoyesis extramedular y fibrosis de la médula ósea. La proliferación de un clon anormal de células madre hematopoyéticas en la médula ósea y otros sitios da como resultado fibrosis o el reemplazo de la médula con tejido cicatricial. El término mielofibrosis, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a mielofibrosis primaria (PMF). Esto también puede denominarse mielofibrosis idiopática crónica (cIMF) (los términos idiopático y primario significan que en estos casos la enfermedad es de origen desconocido o espontáneo). Esto contrasta con la mielofibrosis que se desarrolla como consecuencia de policitemia vera o trombocitemia esencial. La mielofibrosis es una forma de metaplasia mieloide, que se refiere a un cambio en el tipo de células en el tejido formador de sangre de la médula ósea y, a menudo, los dos términos se utilizan como sinónimos. Los términos metaplasia mieloide agnógena y mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) también se utilizan para referirse a la mielofibrosis primaria. En algunas formas de realización, los trastornos proliferativos hematológicos que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen trastornos mieloproliferativos, tales como mielofibrosis. El grupo denominado "clásico" de trastornos mieloproliferativos crónicos BCR-ABL (Ph) negativos incluye trombocitemia esencial (ET), policitemia vera (PV) y mielofibrosis primaria (PMF).

[0479] La mielofibrosis altera la producción normal de células sanguíneas del cuerpo. El resultado es una cicatrización extensa en la médula ósea, que provoca anemia grave, debilidad, fatiga y, a menudo, agrandamiento del bazo. La producción de citoquinas como el factor de crecimiento de fibroblastos por el clon de células hematopoyéticas anormales (particularmente por megacariocitos) conduce a la sustitución del tejido hematopoyético de la médula ósea por tejido conectivo a través de la fibrosis de colágeno. La disminución del tejido hematopoyético afecta la capacidad del paciente para generar nuevas células sanguíneas, lo que resulta en una pancitopenia progresiva, una escasez de todos los tipos de células sanguíneas. Sin embargo, se cree que la proliferación de fibroblastos y la deposición de colágeno es un

fenómeno secundario, y es posible que los propios fibroblastos no formen parte del clon celular anormal.

[0480] La mielofibrosis puede estar causada por células madre sanguíneas anormales en la médula ósea. Las células madre anormales producen células maduras y poco diferenciadas que crecen rápidamente y se apoderan de la médula ósea, causando tanto fibrosis (formación de tejido cicatricial) como inflamación crónica.

[0481] Mielofibrosis primaria se asocia con mutaciones en Janus quinasa 2 (JAK2), receptor de trombopoyetina (MPL) y calreticulina (CALR), que puede conducir a la activación constitutiva de la vía JAK-STAT, cicatrización progresiva, o fibrosis de la médula ósea se produce. Los pacientes pueden desarrollar hematopoyesis extramedular, es decir, formación de células sanguíneas que se produce en sitios distintos de la médula ósea, ya que las células hematopoyéticas se ven obligadas a migrar a otras áreas, particularmente el hígado y el bazo. Esto provoca un agrandamiento de estos órganos. En el hígado, el tamaño anormal se llama hepatomegalia. El agrandamiento del bazo se llama esplenomegalia, que también contribuye a causar pancitopenia, particularmente trombocitopenia y anemia. Otra complicación de la hematopoyesis extramedular es la poiquilocitosis o la presencia de glóbulos rojos de forma anormal.

[0482] El sitio principal de hematopoyesis extramedular en la mielofibrosis es el bazo, que normalmente está muy agrandado en pacientes que padecen mielofibrosis. Como resultado del agrandamiento masivo del bazo, a menudo ocurren múltiples infartos subcapsulares en el bazo, lo que significa que debido a la interrupción del suministro de oxígeno al bazo ocurre la muerte parcial o completa del tejido. A nivel celular, el bazo contiene precursores de glóbulos rojos, precursores de granulocitos y megacariocitos, siendo los megacariocitos prominentes en su número y en sus formas anormales. Los megacariocitos pueden estar involucrados en la causa de la fibrosis secundaria que se observa en esta afección.

[0483] Se ha sugerido que el TGF β puede estar implicado en el aspecto fibrótico de la patogénesis de la mielofibrosis (ver, por ejemplo, Agarwal et al., "Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF β " (2016) Stem Cell Investig 3:5). La patología de la médula ósea en la mielofibrosis primaria se caracteriza por la fibrosis, neoangiogenesis y osteosclerosis, y la fibrosis se asocia con un aumento en la producción de colágenos depositado en el ECM.

[0484] Un número de marcadores biológicos se han descrito, alternancias de los cuales son indicativos de o se correlacionan con la enfermedad. En algunas formas de realización, los biomarcadores son marcadores celulares. Dichos biomarcadores asociados a la enfermedad son útiles para el diagnóstico y/o el seguimiento de la progresión de la enfermedad, así como la eficacia de la terapia (p. ej., la capacidad de respuesta de los pacientes a la terapia). Estos biomarcadores incluyen varios marcadores fibróticos, así como marcadores celulares. En el cáncer de pulmón, por ejemplo, se informa que las concentraciones de TGF β 1 en el líquido de lavados broncoalveolares (BAL) son significativamente más altas en pacientes con cáncer de pulmón en comparación con pacientes con enfermedades benignas (aumento de ~2+ veces), lo que también puede servir como un biomarcador para diagnosticar y/o controlar la progresión o los efectos del tratamiento del cáncer de pulmón.

[0485] Debido a que la mielofibrosis se asocia con el desarrollo de megacariocitos anormales, ciertos marcadores celulares de megacariocitos, así como sus progenitores del linaje de células madre pueden servir como marcadores para el diagnóstico y/o seguimiento de la progresión de la enfermedad así como la eficacia de la terapia. En algunas formas de realización, los marcadores útiles incluyen, pero no se limitan a: (marcadores celulares de megacariocitos diferenciados p. ej., CD41, CD42 y Tpo R), los marcadores celulares de células progenitoras de megacariocitos-eritroide (p. ej., CD34, CD38, y CD45RA-), marcadores celulares de células progenitoras mieloides comunes (p. ej., IL-3 α /CD127, CD34, SCF R/c-kit y Flt-3/Flk-2) y marcadores celulares de células madre hematopoyéticas (p. ej., CD34, CD38-, Flt-3/Flk-2). En algunas formas de realización, los biomarcadores útiles incluyen marcadores fibróticos. Estos incluyen, sin limitación: TGF β 1/TGFB1, PAI-1 (también conocido como Serpina1), MCP-1 (también conocido como CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, CTGF, α -SMA, ACTA2, Timp1, Mmp8, y Mmp9. En algunas formas de realización, los biomarcadores útiles son marcadores de suero (p. ej., proteínas o fragmentos encontrados y detectados en muestras de suero).

[0486] En base al resultado de que TGF β es un componente del nicho de la médula ósea leucémica, se contempla que dirigirse al microambiente de la médula ósea con inhibidores de TGF β puede ser un enfoque prometedor para reducir las células leucémicas que expresan moléculas presentadoras que regulan la disponibilidad de TGF β local en el tejido afectado.

[0487] De hecho, debido a la naturaleza polifacética de la patología que se manifiesta desregulación dependiente de TGF β en ambos aspectos mielo-proliferativos y fibróticos (como el término "*mielofibrosis*" lo indica), isoforma específica, los inhibidores independientes del contexto de TGF β 1, como los descritos en el presente documento, pueden proporcionar efectos terapéuticos particularmente ventajosos para pacientes que padecen mielofibrosis. Se contempla que el brazo LTBP de dicho inhibidor puede dirigirse al complejo TGF β 1 asociado a ECM en la médula ósea, mientras que el brazo LRRRC33 del inhibidor puede bloquear el TGF β 1 asociado a células mieloides. Además, la biología anormal de megacariocitos asociada con mielofibrosis puede implicar actividades de TGF β 1 mediadas tanto por GARP como por LTBP. El inhibidor de TGF β 1 específico de isoforma, independiente del contexto, es capaz de dirigirse a tales complejos inhibiendo así la liberación de TGF β 1 activo en el nicho.

[0488] Por tanto, tales inhibidores de TGFβ1 son útiles para el tratamiento de pacientes con mielofibrosis primaria y secundaria, que han tenido una respuesta inadecuada o son intolerantes a otros tratamientos (o de atención estándar), como la hidroxiurea y los inhibidores de JAK. Dichos inhibidores también son útiles para el tratamiento de pacientes con mielofibrosis (MF) de riesgo intermedio o alto, que incluyen MF primaria, MF pospolicitemia vera y MF posttrombocitemia esencial.

[0489] Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a inhibidores de TGFβ1 de acuerdo con la invención para su uso en métodos para tratar la mielofibrosis primaria. El método comprende administrar a un paciente que padece mielofibrosis primaria una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de TGFβ que provoca una disponibilidad reducida de TGFβ. Se puede administrar a pacientes con mielofibrosis un anticuerpo monoclonal específico de isoforma, independiente del contexto, inhibidor de la activación de TGFβ1. Dicho anticuerpo puede administrarse en dosis que oscilan entre 0,1 y 100 mg/kg, tales como entre 1 y 30 mg, por ejemplo, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, etc. Por ejemplo, los regímenes de dosificación adecuados incluyen entre 1 y 30 mg/kg administrados semanalmente. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGFβ1 se dosifica a aproximadamente 10 mg/kg por semana. Opcionalmente, la frecuencia de administración se puede ajustar después de la fase inicial, por ejemplo, desde aproximadamente una vez a la semana (durante una fase inicial) a una vez al mes (durante una fase de mantenimiento).

[0490] Las vías preferidas de administración de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo es la administración intravenosa o subcutánea. Cuando la composición se administra por vía intravenosa, el paciente puede recibir el tratamiento durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo, aproximadamente 30-120 minutos (p. ej., 30 minutos, 60 minutos, 75 minutos, 90 minutos y 120 minutos), por tratamiento, y luego se repite cada varias semanas, por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, etc. para un total de varios ciclos, por ejemplo, 4 ciclos, 6 ciclos, 8 ciclos, 10 ciclos, 12 ciclos, etc. En algunas formas de realización, los pacientes se tratan con una composición que comprende el anticuerpo inhibidor a un nivel de dosis de 1 a 10 mg/kg (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg por dosificación) por vía intravenosa cada 28 días (4 semanas) durante 6 ciclos o 12 ciclos. En algunas formas de realización, dicho tratamiento se administra como una terapia crónica (a largo plazo) (p. ej., para continuar indefinidamente, siempre que se considere beneficioso) en lugar de interrumpir después de un número determinado de ciclos de administración.

[0491] Mientras que la mielofibrosis se considera un tipo de leucemia, también se caracteriza por la manifestación de fibrosis. Debido a que se sabe que el TGFβ regula aspectos de la homeostasis de la ECM, cuya desregulación puede conducir a fibrosis tisular, es deseable inhibir las actividades de TGFβ asociadas con la ECM. Por consiguiente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la invención se unen e inhiben el proTGFβ presentado por las LTBP (tales como LTBP1 y LTBP3). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos adecuados para tratar la mielofibrosis son "independientes del contexto" en el sentido de que pueden unirse a múltiples contextos del complejo proTGFβ, tales como los asociados con LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3 o cualquier combinación de los mismos. Dicho anticuerpo es un inhibidor independiente del contexto de activación de TGFβ de acuerdo con la invención.

[0492] Datos tempranos in vivo indican que un inhibidor independiente del contexto selectivo para isoformas de TGFβ1, tales como los descritos en el presente documento, pueden usarse para tratar mielofibrosis en un modelo murino traducible de mielofibrosis primaria. A diferencia del inhibidor JAK2 estándar de atención actual, que solo proporciona alivio sintomático pero no proporciona beneficios clínicos o de supervivencia, el inhibidor del TGFβ1, independiente del contexto y selectivo de isoformas, logra efectos antifibróticos significativos en la médula ósea de los ratones enfermos y también puede prolongar la supervivencia, lo que respalda la idea de que el inhibidor de TGFβ1 puede ser eficaz para tratar trastornos mieloproliferativos en pacientes humanos.

[0493] Poblaciones de pacientes adecuadas de síndrome mieloproliferativo crónico que pueden ser tratadas con las composiciones y métodos descritos aquí pueden incluir, pero no se limitan a: a) una población de pacientes que es Filadelfia(+); b) una población de pacientes que es Filadelfia (-); c) una población de pacientes que se clasifica como "clásica" (PV, ET y PMF); d) una población de pacientes que porta la mutación JAK2V617F(+); e) una población de pacientes portadores de JAK2V617F (-); f) una población de pacientes con el exón 12(+) de JAK2; g) una población de pacientes con MPL(+); y h) una población de pacientes con CALR(+).

[0494] En algunas formas de realización, la población de pacientes incluye pacientes con mielofibrosis de intermedio-2 o de alto riesgo. En algunas formas de realización, la población de pacientes comprende sujetos con mielofibrosis que son refractarios o no candidatos a la terapia disponible. En algunas formas de realización, el sujeto tiene recuentos de plaquetas entre 100-200 x 10⁹/L. En algunas formas de realización, el sujeto tiene recuentos de plaquetas >200 x 10⁹/L antes de recibir el tratamiento.

[0495] En algunas formas de realización, un sujeto para recibir (y que pueden beneficiarse de recibir) una isoforma específica, terapia de inhibidor TGFβ1 independiente de contexto se diagnostica con mielofibrosis primaria de intermedio-1 o superior (PMF), o post-policitemia vera/mielofibrosis de trombocitemia esencial (post-PV/ET MF). En algunas formas de realización, el sujeto ha documentado fibrosis de la médula ósea antes del tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene MF-2 o superior según lo evaluado por la puntuación de clasificación de consenso europeo y grado 3 o superior mediante la escala de Bauermeister modificada antes del tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene el estado funcional ECOG de 1 antes del tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un

recuento de glóbulos blancos ($10^9/L$) que varía entre 5 y 120 antes del tratamiento. En algunas formas de realización, el sujeto tiene la carga del alelo *JAK2V617F* que varía entre el 10 y el 100%.

[0496] En algunas formas de realización, un sujeto para recibir (y que pueden beneficiarse de recibir) una isoforma específica, terapia de inhibidor de TGF β 1 independiente de contexto es dependiente de transfusiones (antes del tratamiento), caracterizado porque el sujeto tiene una historia de al menos dos unidades de transfusiones de glóbulos rojos en el último mes para un nivel de hemoglobina de menos de 8,5 g/dl que no está asociado con sangrado clínicamente evidente.

[0497] En algunas formas de realización, un sujeto para recibir (y que pueden beneficiarse de recibir) una isoforma específica, terapia con inhibidores de TGF β 1 independiente de contexto recibida previamente una terapia para el tratamiento de mielofibrosis. En algunas formas de realización, el sujeto ha sido tratado con una o más de las terapias, que incluyen pero no se limitan a: AZD1480, panobinostat, EPO, IFN α , hidroxiurea, interferón pegilado, talidomida, prednisona e inhibidor de JAK2 (p. ej., Lestaurtinib, CEP-701).

[0498] En algunas formas de realización, el paciente tiene la hematopoyesis extramedular. En algunas formas de realización, la hematopoyesis extramedular está en el hígado, pulmón, bazo y/o ganglios linfáticos. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención se administra localmente a uno o más de los sitios localizados de manifestación de la enfermedad.

[0499] La isoforma específica, inhibidor de TGF β 1 independiente del contexto se administra a pacientes en una cantidad eficaz para el tratamiento de mielofibrosis. La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para aliviar uno o más síntomas y/o complicaciones de la mielofibrosis en pacientes, que incluyen, entre otros: depósito excesivo de MEC en el estroma de la médula ósea (fibrosis de la médula ósea), neoangiogénesis, osteosclerosis, esplenomegalia, hematomegalia, anemia, hemorragia, dolor óseo y otra morbilidad relacionada con los huesos, hematopoyesis extramedular, trombocitosis, leucopenia, caquexia, infecciones, trombosis y muerte. Por tanto, las terapias de inhibición de TGF β 1 que comprenden los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la divulgación pueden lograr beneficios clínicos, que incluyen, entre otros, efectos antifibróticos y/o normalización de los recuentos de células sanguíneas. Tal terapia puede prolongar la supervivencia y/o reducir la necesidad de trasplante de médula ósea.

[0500] En algunas formas de realización, la cantidad es eficaz para reducir TGF β 1 de expresión y/o secreción (p. ej., de células megacariocíticas) en los pacientes. Por tanto, tal inhibidor puede reducir los niveles de ARNm de TGF β 1 en pacientes tratados. En algunas formas de realización, tal inhibidor reduce los niveles de ARNm de TGF β 1 en la médula ósea, como en las células mononucleares. Los pacientes con PMF suelen mostrar concentraciones plasmáticas elevadas de TGF β 1 por encima de ~2500 pg/ml, por ejemplo, por encima de 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 y 10.000 pg/ml (en contraste con los rangos normales de ~600-2.000 pg/mL medido por ELISA) (ver, por ejemplo, Mascarell et al. (Leukemia & Lymphoma, 2014, 55(2): 450-452)). Zingariello (Blood, 2013, 121 (17): 3345-3363) cuantificó el contenido de TGF β 1 bioactivo y total en el plasma de pacientes con PMF e individuos de control. De acuerdo con esta referencia, la mediana de TGF β 1 bioactivo en pacientes con PMF fue 43 ng/mL (rango entre 4-218 ng/mL) y el TGF β 1 total fue 153 ng/mL (32-1000 ng/mL), mientras que en contrapartes de control, los valores fueron 18 (0,05-144) y 52 (8-860), respectivamente. Por lo tanto, según estos informes, el contenido de TGF β 1 en plasma en pacientes con PMF se eleva varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc, en comparación con las muestras de plasma sanas o de control. Tratamiento con el inhibidor, por ejemplo, después de 4-12 ciclos de administración (p. ej., 2, 4, 6, 8, 10, 12 ciclos) o tratamiento crónico o a largo plazo, por ejemplo, cada 4 semanas, a dosis de 0,1-100 mg/kg, por ejemplo, 1-30 mg/kg de anticuerpo monoclonal) descrito en el presente documento puede reducir los niveles plasmáticos de TGF β 1 en al menos un 10% con respecto a la línea de base correspondiente (pretratamiento), por ejemplo, al menos un 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% y 50%.

[0501] Algunos de los efectos terapéuticos pueden observarse relativamente rápidamente después del comienzo del tratamiento, por ejemplo, después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas. Por ejemplo, el inhibidor puede aumentar eficazmente el número de células madre y/o células precursoras dentro de la médula ósea de los pacientes tratados con el inhibidor dentro de 1-8 semanas. Estos incluyen células madre hematopoyéticas y células precursoras de la sangre. Se puede realizar una biopsia de médula ósea para evaluar los cambios en la frecuencia/número de células de la médula. En consecuencia, el paciente puede mostrar una mejoría de los síntomas, como dolor de huesos y fatiga.

[0502] Los sujetos que padecen un trastorno mieloproliferativo (p. ej., mielofibrosis) pueden manifestar un nivel elevado de recuentos de glóbulos blancos (p. ej., leucémicos). En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de TGF β 1 es una cantidad que es eficaz para normalizar los recuentos de células sanguíneas. En algunas formas de realización, la cantidad es eficaz para reducir el recuento total de glóbulos blancos en el sujeto, en comparación con el tratamiento previo. En algunas formas de realización, la cantidad es eficaz para reducir el recuento total de plaquetas en el sujeto, en comparación con el pretratamiento. En algunas formas de realización, la cantidad es eficaz para aumentar (p. ej., normalizar o restaurar) los niveles de hemoglobina en el sujeto, en comparación con el pretratamiento. En algunas formas de realización, la cantidad es eficaz para aumentar (p. ej., normalizar o restaurar) los niveles de hematocrito en el sujeto, en comparación con el pretratamiento.

- [0503]** Una de las características morfológicas de la mielofibrosis es fibrosis en la médula ósea (p. ej., estroma de la médula), caracterizada en parte por ECM aberrante. En algunas formas de realización, la cantidad es eficaz para reducir la fibrosis, caracterizada por una deposición excesiva de colágeno, por ejemplo, por células estromales mesenquimales. En algunas formas de realización, el inhibidor es eficaz para reducir el número de células positivas para CD41, por ejemplo, megacariocitos, en sujetos tratados, en comparación con sujetos de control que no reciben el tratamiento. En algunas formas de realización, las frecuencias basales de megacariocitos en la médula ósea de PMF pueden oscilar entre 200-700 células por milímetro cuadrado (mm²) y entre 40-300 megacariocitos por milímetro cuadrado (mm²) en el bazo de PMF, según se determina con secciones elegidas al azar. Por el contrario, las frecuencias de megacariocitos en la médula ósea y el bazo de donantes normales son menos de 140 y menos de 10, respectivamente. El tratamiento con el inhibidor puede reducir el número (p. ej., frecuencias) de megacariocitos en la médula ósea y/o el bazo. En algunas formas de realización, los tratamientos con el inhibidor pueden provocar niveles reducidos de señalización del efector corriente abajo, como la fosforilación de SMAD2/3. En algunas formas de realización, el inhibidor es eficaz para reducir los niveles de expresión de marcadores fibróticos, como los descritos en el presente documento.
- [0504]** Los pacientes con mielofibrosis pueden sufrir de bazo agrandado. Por tanto, los efectos clínicos de un tratamiento pueden evaluarse controlando los cambios en el tamaño del bazo. El tamaño del bazo puede examinarse mediante técnicas conocidas, como la evaluación de la longitud del bazo mediante palpación y/o la evaluación del volumen del bazo mediante ecografía. En algunas formas de realización, el sujeto que se va a tratar con un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma, independiente del contexto, tiene una longitud basal del bazo (antes del tratamiento) de 5 cm o más, por ejemplo, que varía entre 5 y 30 cm según la evaluación por palpación. En algunas formas de realización, el sujeto que se va a tratar con un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma, independiente del contexto, tiene un volumen basal del bazo (antes del tratamiento) de 300 ml o más, por ejemplo, que varía entre 300-1500 ml, como evaluado por ultrasonido. Se describe el tratamiento con el inhibidor, por ejemplo, Después de 4-12 ciclos de administración (p. ej., 2, 4, 6, 8, 10, 12 ciclos), por ejemplo cada 4 semanas, a una dosis de 0,1-30 mg/kg de anticuerpo monoclonal) en este documento puede reducir el tamaño del bazo en el sujeto. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz del inhibidor es suficiente para reducir el tamaño del bazo en una población de pacientes que recibe el tratamiento con inhibidor en al menos un 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50% y 60%, en relación con los valores de referencia correspondientes. Por ejemplo, el tratamiento es eficaz para lograr una reducción ≥ 35% en el volumen del bazo desde el valor inicial en 12-24 semanas según lo medido por resonancia magnética o tomografía computarizada, en comparación con el control con placebo. En algunas formas de realización, el tratamiento es eficaz para lograr una reducción ≥ 35% en el volumen del bazo desde el valor inicial en 24-48 semanas según lo medido por resonancia magnética o tomografía computarizada, en comparación con el mejor control de terapia disponible. La mejor terapia disponible puede incluir hidroxurea, glucocorticoides, así como ningún medicamento, anagrelida, epoetina alfa, talidomida, lenalidomida, mercaptopurina, tioguanina, danazol, peginterferón alfa-2a, interferón-α, melfalán, ácido acetilsalicílico, citarabina y colchicina.
- [0505]** En algunas formas de realización, una población de pacientes tratados con un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto específico a isoformas muestra una respuesta de tratamiento estadísticamente mejorado según la evaluación de, por ejemplo, Grupo de Trabajo Internacional para los criterios de Investigación y Tratamiento de Mielofibrosis (GTI-MRT), grado de cambio en el grado de fibrosis de la médula ósea medido por la escala de Bauermeister modificada y el sistema de clasificación de consenso europeo después del tratamiento (p. ej., 4, 6, 8 o 12 ciclos), respuesta a los síntomas utilizando el Formulario de Evaluación de Síntomas de Neoplasias Mieloproliferativas (MPN-SAF).
- [0506]** En algunas formas de realización, el tratamiento con un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto específico de isoformas, logra una respuesta al tratamiento estadísticamente mejorado según la evaluación de, por ejemplo, en donde se miden los síntomas por el Formulario de Evaluación de Síntomas de Mielofibrosis modificado (MFSAF) mediante la herramienta MFSAF (como v2.0), un diario daukt que captura los síntomas debilitantes de la mielofibrosis (malestar abdominal, saciedad temprana, dolor debajo de las costillas izquierdas, prurito, sudores nocturnos y dolor óseo/muscular) utilizando una escala de 0 a 10, donde 0 está ausente y 10 es el peor imaginable. En algunas formas de realización, el tratamiento es eficaz para lograr una reducción ≥ 50% en la puntuación total de MFSAF desde la línea de base en, por ejemplo, 12-24 semanas. En algunas formas de realización, una fracción significativa de pacientes que reciben la terapia logra una mejora ≥ 50% en la puntuación total de síntomas, en comparación con los pacientes que toman placebo. Por ejemplo, la fracción del grupo de pacientes para lograr una mejora ≥ 50% puede ser superior al 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80%.
- [0507]** En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor es una cantidad suficiente para alcanzar mejoría clínica según la evaluación de una respuesta anemia. Por ejemplo, una respuesta mejorada a la anemia puede incluir duraciones más prolongadas de independencia de la transfusión, por ejemplo, 8 semanas o más, después del tratamiento de 4 a 12 ciclos, por ejemplo, 6 ciclos.
- [0508]** En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor es una cantidad suficiente para mantener la enfermedad estable durante una duración de tiempo, por ejemplo, 6 semanas, 8 semanas, 12 semanas, seis meses, etc. En algunas formas de realización, la progresión de la enfermedad puede evaluarse mediante cambios en la celularidad global de la médula ósea, el grado de reticulina o fibrosis de colágeno y/o un cambio en la carga del alelo JAK2V617F.
- [0509]** En algunas formas de realización, una población de pacientes tratados con una isoforma específica, inhibidor de

TGFβ1 independiente del contexto, muestra la supervivencia estadísticamente mejorada (prolongada), en comparación con una población de control que no recibe el tratamiento. Por ejemplo, en los grupos de control, la supervivencia media de los pacientes con PMF es de aproximadamente seis años (aproximadamente 16 meses en los pacientes de alto riesgo) y se espera que menos del 20% de los pacientes sobrevivan 10 años o más después del diagnóstico. El tratamiento con el inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma, independiente del contexto, como los descritos en este documento, puede prolongar el tiempo de supervivencia en al menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses o 48 meses. En algunas formas de realización, el tratamiento es eficaz para lograr una supervivencia global mejorada a las 26 semanas, 52 semanas, 78 semanas, 104 semanas, 130 semanas, 144 semanas o 156 semanas, en comparación con los pacientes que reciben placebo.

[0510] Los beneficios clínicos de la terapia, tales como los ejemplificados anteriormente, pueden verse en pacientes con o sin anemia de nuevo inicio.

[0511] Una de las características ventajosas del inhibidor de TGFβ1 específico de isoformas, independiente del contexto es que mantienen los perfiles de seguridad mejorados habilitados por la selectividad de isoformas, en comparación con antagonistas de TGFβ convencionales que carecen de la selectividad. Por lo tanto, se anticipa que el tratamiento con un inhibidor independiente del contexto específico de isoforma, como los descritos en este documento, puede reducir los eventos adversos en una población de pacientes, en comparación con poblaciones de pacientes equivalentes tratados con antagonistas de TGFβ convencionales, con respecto a la frecuencia y/o gravedad de tales eventos. Por tanto, los inhibidores de TGFβ1 independientes del contexto y específicos de isoforma pueden proporcionar una mayor ventana terapéutica en cuanto a la dosis y/o la duración del tratamiento.

[0512] Los eventos adversos pueden clasificarse mediante métodos adecuados reconocidos en la técnica, como Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 4. Los eventos adversos informados previamente en pacientes humanos que recibieron antagonistas de TGFβ, como GC1008, incluyen: leucocitosis (grado 3), fatiga (grado 3), hipoxia (grado 3), asistolia (grado 5), leucopenia (grado 1), lesiones cutáneas nodulares recurrentes, transitorias, eritematosas sensibles a la palpación, dermatitis supurativa y herpes zóster.

[0513] La terapia de inhibidor de TGFβ1 específico a isoformas, independiente del contexto, puede causar eventos adversos menos frecuente y/o (efectos secundarios) menos graves en comparación con la terapia de inhibidor de JAK en pacientes de mielofibrosis, con respecto a, por ejemplo, anemia, trombocitopenia, neutropenia, hipercolesterolemia, elevación de alanina transaminasa (ALT), elevación de aspartato transaminasa (AST), hematomas, mareos y dolor de cabeza, lo que ofrece una opción de tratamiento más segura.

[0514] Se contempla que los inhibidores de TGFβ1 de señalización puede ser usado en conjunción con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de la mielofibrosis como una terapia de combinación (p. ej., "añadida"). Un inhibidor de la activación de TGFβ1 descrito en el presente documento puede administrarse a pacientes que padecen mielofibrosis, que han recibido o son candidatos a recibir un inhibidor de JAK1, un inhibidor de JAK2 o un inhibidor de JAK1/JAK2. Dichos pacientes pueden responder a la terapia con inhibidor de JAK1, inhibidor de JAK2 o inhibidor de JAK1/JAK2, mientras que en otras formas de realización dichos pacientes responden mal o no responden a la terapia con inhibidor de JAK1, inhibidor de JAK2 o inhibidor de JAK1/JAK2. El uso de un inhibidor específico de isoforma de TGFβ1 descrito en el presente documento puede hacer que aquellos que responden mal o no responden al inhibidor de JAK1, inhibidor de JAK2 o terapia con inhibidor de JAK1/JAK2 más sensibles. El uso de un inhibidor específico de isoforma de TGFβ1 descrito en el presente documento puede permitir una dosis reducida del inhibidor de JAK1, el inhibidor de JAK2 o el inhibidor de JAK1/JAK2 que aún produce una eficacia clínica o beneficios equivalentes o significativos en pacientes pero con grados menores o más pequeños de toxicidades relacionadas con el fármaco o eventos adversos (como los enumerados anteriormente). El tratamiento con el inhibidor de la activación de TGFβ1 descrito en el presente documento utilizado junto con el inhibidor de JAK1, el inhibidor de JAK2 o la terapia con inhibidor de JAK1/JAK2 puede producir efectos terapéuticos sinérgicos o aditivos en los pacientes. El tratamiento con el inhibidor de la activación de TGFβ1 descrito en este documento puede potenciar los beneficios del inhibidor de JAK1, el inhibidor de JAK2 o el inhibidor de JAK1/JAK2 u otra terapia administrada para tratar la mielofibrosis. Además, los pacientes pueden recibir un tratamiento para tratar la anemia asociada con la mielofibrosis.

Condiciones fibróticas

[0515] En respuesta a la lesión tisular debida a daño físico/trauma, sustancias tóxicas y/o infección, comienza un proceso de reparación natural que involucra varios tipos de células, incluidos fibroblastos, varios tipos diferentes de células inmunitarias y células epiteliales y endoteliales residentes. Sin embargo, si no se controla, este proceso puede conducir a una acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) y fibrosis, lo que a su vez puede conducir a una pérdida progresiva de la función tisular y falla orgánica (Caja et al., Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1294).

[0516] La fibrosis puede ocurrir en varios órganos, incluidos pulmón, riñón, hígado, corazón y piel. Independiente del órgano, la respuesta fibrótica se caracteriza por la inflamación, interacciones epitelio-mesenquimales alteradas, y proliferación de fibroblastos. Una de las características distintivas de la fibrosis es la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, que contribuyen en gran medida a la desregulación de la ECM. Sin embargo, también se ha propuesto que los miofibroblastos provienen de otras fuentes celulares (p. ej., células endoteliales, células epiteliales y células madre

mesenquimales (Kim, K.K. et al., Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2017; Okabe, H. Histol. Histopathol, 2016, 31, 141-148; y Li, C et al., Nat Commun, 2016,7, 11455 y). Además, las células inmunitarias desempeñan un papel importante en el proceso al secretar citoquinas y quimiocinas que promueven la diferenciación de miofibroblastos, estimulan la deposición de ECM, y reclutar células inmunitarias adicionales para el tejido dañado (Caja et al., Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1294).

[0517] Al igual que en tejido fibrótico, la activación de los fibroblastos asociados al cáncer puede ocurrir en el medio tumoral, que produce cantidades excesivas de ECM. La ECM proporciona un andamio para la infiltración de otras células (p. ej., células inmunitarias pro-tumorígenas) y un sustrato para la migración celular. En otros casos, la ECM excesiva puede actuar como una barrera contra las células inmunitarias anti-tumorígenas.

[0518] El TGF β se reconoce como el orquestador central de la respuesta fibrótica. El TGF β puede promover la diferenciación de miofibroblastos, reclutar células inmunitarias y afectar la diferenciación de células epiteliales y endoteliales. Particularmente, TGF β regula al alza la producción de ECM y proteínas de la membrana basal, tales como fibronectina, colágeno, laminina, osteopontina, tenascina, elastina, decorina. La diferenciación de miofibroblasto inducida por TGF β puede conducir a un depósito adicional de proteínas ECM, secreción de metaloproteinasas matriciales (MMP) y proliferación de miofibroblasto (Fabregat et al., FEBS J. 2016, 283, 2219-2232; Meng et al., Nat. Rev. Nephrol, 2016, 12, 325-338; y Kulkarni y col, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2016, 54, 751-760). Además, TGF β media los cambios fenotípicos que afectan a las proteínas contráctiles y al colágeno I en las células del músculo liso vascular (CMVV), y puede activar los miofibroblastos y otras células del estroma para mejorar la síntesis de proteínas de reticulación del colágeno, como la lisil oxidasa (LOX) de la familia de enzimas remodeladoras de matriz (Busnadiego et al., Mol. Cell. Biol. 2013, 33, 2388-2401). Además, se ha demostrado que TGF β regula tanto la EMT como la EndMT, lo que contribuye a la diferenciación de tipos de células profibróticas, como los miofibroblastos y las CAF. Además, se ha demostrado que el TGF β induce la apoptosis epitelial, que puede promover la fibrosis pulmonar y hepática entre otros tejidos (Barbas-Filho et al., J. Clin. Pathol. 2001, 54, 132-138; y Wang et al., Dev. Dyn, 2017, 247, 492-508).

[0519] Ya sean innatos o reclutados, los macrófagos desempeñan un papel importante en la respuesta al daño y reparación tisular. Sin embargo, ante ciertas señales, pueden volverse profibróticos. También se ha demostrado que TGF β , entre otras citoquinas, activa los macrófagos M2, que son proinflamatorios. Tras la activación, estos macrófagos secretan sus propias citoquinas, que incluyen TGF β , componentes de ECM, factores angiogénicos y factores quimiotácticos. Se ha demostrado que los macrófagos M2 son esenciales para la fibrosis pulmonar impulsada por TGF β (Murray y col, Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011, 43, 154-162).

[0520] Por lo tanto, los inhibidores de TGF β 1 específicos a isoforma, tales como los descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de la fibrosis (p. ej., indicaciones fibróticas, afecciones fibróticas) en un sujeto. Los inhibidores adecuados incluyen anticuerpos y/o composiciones de acuerdo con la presente divulgación que pueden ser útiles para alterar o mejorar la fibrosis. Más específicamente, tales anticuerpos y/o composiciones son antagonistas selectivos de TGF β 1 que son capaces de dirigirse al TGF β 1 presentado por varios tipos de moléculas presentadoras.

[0521] Los anticuerpos que se dirigen a TGF β disminuyen fibrosis en numerosos modelos preclínicos. Dichos anticuerpos y/o compuestos basados en anticuerpos incluyen LY2382770 (Eli Lilly, Indianapolis, IN). También se incluyen los descritos en los números de patente de EE. UU. Publ. N° 2011/0008364. Los antagonistas de TGF β de la técnica anterior incluyen, por ejemplo, agentes que se dirigen y bloquean la activación de TGF β dependiente de integrina.

[0522] Sin embargo, la evidencia sugiere que tales agentes de la técnica anterior pueden no mediar en la inhibición específica de isoforma y pueden causar efectos no deseados al bloquear inadvertidamente la función normal de TGF β 2 y/o TGF β 3. De hecho, el solicitante señaló anteriormente que los tejidos pulmonares normales (sin enfermedad) contienen niveles relativamente bajos pero medibles de TGF β 2 y TGF β 3, pero notablemente menos TGF β 1. En comparación, en ciertas condiciones de enfermedad como la fibrosis, TGF β 1 se regula preferentemente al alza en relación con las otras isoformas (WO 2018/129329). Preferiblemente, los antagonistas de TGF β para su uso en el tratamiento de tales afecciones ejercen sus actividades inhibitorias solo hacia la isoforma inducida por la enfermedad o asociada a la enfermedad, mientras preservan la función de las otras isoformas que normalmente se expresan para mediar la señalización tónica en el tejido. Se ha demostrado que los inhibidores de la técnica anterior (LY2109761, un antagonista del receptor de TGF β de molécula pequeña y un anticuerpo monoclonal que se dirige a la integrina α V β 6) inhiben la señalización tónica corriente abajo del TGF β en BAL de rata no enferma, lo que aumenta la posibilidad de que estos inhibidores puedan causar efectos secundarios no deseados. Alternativa o adicionalmente, los agentes que se dirigen y bloquean la activación independiente de la integrina de TGF β pueden ser capaces de bloquear sólo un subconjunto de integrinas responsables de la activación de TGF β 1 asociada a la enfermedad, entre numerosos tipos de integrinas que son expresadas por varios tipos de células y juegan un papel en la patogénesis. Además, incluso cuando dichos antagonistas pueden bloquear selectivamente la activación mediada por integrinas de la isoforma de TGF β 1, puede ser ineficaz para bloquear la activación de TGF β 1 desencadenada por otros modos, como la activación dependiente de proteasa. Por el contrario, los inhibidores específicos de isoforma de TGF β 1 tales como los descritos en este documento tienen como objetivo prevenir el paso de activación de TGF β 1 independientemente del modo particular de activación, mientras se mantiene la selectividad de isoforma.

[0523] Se contempla además que los inhibidores de TGF β 3 específicos a isoformas pueden ofrecer un beneficio

terapéutico, en particular, estados de enfermedad. Por ejemplo, ciertas enfermedades fibróticas que se van a tratar con un inhibidor de TGFβ1 también pueden ser TGFβ3 positivo (es decir, tejido fibrótico TGFβ1+/TGFβ3+) caracterizadas porque el tejido de la enfermedad (p. ej., tejido fibrótico) expresa ambas isoformas. Por consiguiente, la divulgación incluye el uso de un inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoforma junto con un inhibidor de TGFβ3 selectivo de isoforma en el tratamiento de tales afecciones. Dichos inhibidores de TGFβ3 pueden ser independientes del contexto o estar sesgados por el contexto.

[0524] Las indicaciones fibróticas para las que los anticuerpos y/o composiciones de la presente divulgación se pueden usar terapéuticamente incluyen, pero no se limitan a indicaciones pulmonares (p. ej., fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, lesión pulmonar aguda, esofagitis eosinofílica, hipertensión arterial pulmonar y lesión química por gas), indicaciones renales (p. ej., glomeruloesclerosis diabética, glomeruloclerosis focal y segmentaria (FSGS), enfermedad renal crónica (ERC), fibrosis asociada con trasplante de riñón y rechazo crónico, nefropatía por IgA, y síndrome urémico hemolítico), fibrosis hepática (p. ej., asociada con o causada por esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), hepatitis viral crónica, parasitemia, errores innatos del metabolismo, fibrosis mediada por toxinas, como fibrosis por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica, carcinoma hepatocelular (EHNA-HCC), cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante), fibrosis cardiovascular (p. ej., miocardiopatía, miocardiopatía hipertrófica, aterosclerosis y reestenosis) esclerosis sistémica, fibrosis cutánea (p. ej., fibrosis cutánea en esclerosis sistémica, esclerosis sistémica cutánea difusa, esclerodermia, cicatrización cutánea patológica, queloides, cicatrización posquirúrgica, cirugía de revisión de cicatrices, cicatrices inducidas por radiación y heridas crónicas), afecciones relacionadas con los ojos como fibrosis subretiniana, síndrome de uveítis, uveítis asociada con fibrosis retroperitoneal idiopática, fibrosis de los músculos extraoculares, enfermedades oculares asociadas con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC clase I) o antígenos de histocompatibilidad, fibrosis subretiniana en la degeneración macular (p. ej., edad) degeneración macular relacionada) y cánceres o fibrosis secundaria (p. ej., mielofibrosis, cáncer de cabeza y cuello, leucemia megacarioblástica aguda M7 y mucositis). Otras enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con la fibrosis (incluidos los trastornos degenerativos) que pueden tratarse usando compuestos y/o composiciones de la presente divulgación incluyen, entre otros, adenomiosis, endometriosis, síndrome de Marfan, síndrome de piel rígida, esclerodermia, reumatoide artritis, fibrosis de la médula ósea, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, distrofia muscular (como DMD), enfermedad de Parkinson, ELA, contractura de Dupuytren, enfermedad de Camurati-Engelmann, cicatrización neural, demencia, vitreorretinopatía proliferativa, lesión corneal, complicaciones posteriores a la cirugía de drenaje de glaucoma y esclerosis múltiple (EM).

[0525] Muchas indicaciones fibróticas también están asociadas con la inflamación del tejido o tejidos afectados, lo que indica la participación de un componente inmunitario. Dicha inflamación puede ir acompañada de poblaciones de células inmunitarias aberrantes, como un mayor número de células Th17, un número reducido de células Treg y/o ambos. En cada caso, el paciente afectado puede presentar un aumento de las proporciones de células Th17/Treg. Las actividades dirigidas a GARP y/o LRRC33 de los anticuerpos selectivos de isoformas pueden proporcionar efectos inhibidores en estos contextos.

[0526] En algunas formas de realización, las indicaciones fibróticas que pueden tratarse con las composiciones y/o métodos descritos en este documento incluyen fibrosis de órganos, como fibrosis del pulmón (p. ej., FPI), fibrosis del riñón (p. ej., fibrosis asociada con ERC), fibrosis del hígado (p. ej., asociada con o debido a EHNA), fibrosis del corazón o de los tejidos cardíacos, fibrosis de la piel (p. ej., esclerodermia), fibrosis del útero (p. ej., endometrio, miometrio), fibrosis del músculo (p. ej., músculo esquelético) y fibrosis de la médula ósea. En algunas formas de realización, tal terapia puede reducir o retrasar la necesidad de trasplante de órganos en pacientes. En algunas formas de realización, tal terapia puede prolongar la supervivencia de los pacientes.

[0527] Para tratar la FPI, los pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento incluyen aquellos con FPI familiar y aquellos con FPI esporádica. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma puede reducir la acumulación de miofibroblastos en los tejidos pulmonares, reducir los depósitos de colágeno, reducir los síntomas de la FPI, mejorar o mantener la función pulmonar y prolongar la supervivencia. En algunas formas de realización, el inhibidor bloquea la activación de TGFβ1 asociado a ECM (p. ej., TGFβ1 pro/latente presentado por LTBP1/3) dentro del entorno fibrótico de IPF. Opcionalmente, el inhibidor puede bloquear adicionalmente la activación de TGFβ1 asociado a macrófagos (p. ej., TGFβ1 pro/latente presentado por LRRC33), por ejemplo, macrófagos alveolares. Como resultado, el inhibidor puede suprimir la liberación de fibronectina y otros factores asociados a la fibrosis. En algunas formas de realización, el inhibidor bloquea la activación de las células estrelladas hepáticas.

[0528] Está bien establecido que la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC) son los impulsores centrales de la fibrosis en la lesión hepática. En este proceso, las células quiescentes que almacenan vitamina A se transdiferencian en miofibroblastos fibrogénicos proliferativos (la principal fuente de acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC)). Sin embargo, se ha demostrado que este proceso está mediado por muchas vías diferentes, que incluyen autofagia, estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo, metabolismo del retinol y colesterol, epigenética y señales mediadas por receptores. Además, también se ha demostrado que las células inflamatorias, incluidos macrófagos, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células asesinas naturales, células T asesinas naturales, plaquetas y células B, modulan la activación de las HSC (Tsuchida y Friedman, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology volumen 14, páginas 397-411 (2017)). En solo un ejemplo particular, Seki et al demostraron que la activación

de TLR4 (que reconoce los LPS presentados por bacterias) conduce a la regulación positiva de la secreción de quimiocinas e induce la quimiotaxis de las células de Kupffer, y también sensibiliza a las HSC a las señales inducidas por TGF β y permite la activación sin restricciones de Células de Kupffer (Seki et al. Nature Medicine volumen 13, páginas 1324-1332 (2007)).

[0529] Es bien sabido que la inflamación juega un papel clave en el desarrollo y progresión de la fibrosis hepática. Específicamente, la lesión hepática provoca inflamación y el reclutamiento de monocitos/macrófagos (así como linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas) que producen factores profibróticos, incluido el TGF β . Además, la investigación indica que tanto los macrófagos residentes en tejido hepático (células de Kupffer) como los macrófagos reclutados derivados de la médula ósea desempeñan un papel importante en la progresión de la fibrosis hepática, y que la vía del TGF β puede promover la polarización y las funciones profibróticas de macrófagos durante la fibrosis hepática. De hecho, se ha demostrado que tanto las células de Kupffer como los macrófagos reclutados pueden activar las HSC e inducir su transdiferenciación en miofibroblastos mediante mecanismos paracrin, incluido el TGF β . Los miofibroblastos a su vez producen y depositan componentes de ECM que conducen a fibrosis (Fabregat y Caballero-Díaz, Front Oncol. 2018; 8: 357).

[0530] Sin embargo, miofibroblastos pueden proceder de otras fuentes, así, como los fibroblastos de portal y residente, fibroцитos derivados de médula ósea, células epiteliales hepáticas que se someten a EMT, las células endoteliales que se someten a EndMT, y células musculares lisas vasculares y pericitos. De hecho, también se ha demostrado que TGF β regula tanto la EndMT como la EMT, lo que da como resultado un aumento de los miofibroblastos, que impulsan la fibrosis hepática. (Pardali y col, Int J Mol Sci. Octubre de 2017; 18 (10): 2157). Por consiguiente, la orientación al TGF β ha sido una diana terapéutica atractiva para el tratamiento de afecciones fibróticas.

[0531] Se ha demostrado que TGF β desempeña muchas funciones en la fibrosis hepática y progresión de la enfermedad. Por ejemplo, se ha demostrado que TGF β es responsable de la activación de las HSC de los miofibroblastos. También se ha demostrado que TGF β media la transición epitelial-mesenquimatos (EMT) en los hepatocitos que pueden contribuir a aumentar la población de miofibroblastos. Además, se ha demostrado que TGF β induce cambios en la plasticidad de las células tumorales (Fabregat y Caballero-Díaz, Front Oncol. 2018; 8: 357).

[0532] Aunque TGF β se puede encontrar en muchas fuentes celulares diferentes en el microambiente fibrótico y/o tumoral, lo que sugiere la presentación de TGF β por múltiples moléculas presentadoras diferentes (p. ej., LTBP1, LTBP3, GARP y/o LRRC33), puede ser beneficioso en ciertas situaciones para apuntar a fuentes particulares de TGF β sobre otras. Por ejemplo, Henderson et al., mostraron que la supresión de integrina α V en HSC protegió los ratones frente a la fibrosis de hígado inducida por CCL4 (Henderson et al., Nat. Med. 2013, 19, 1617-16-24). Debido a que las integrinas son los principales activadores del TGF β presentado por LTBP, este resultado sugiere que dirigirse al TGF β presentado por LTBP puede ser suficiente para tratar la fibrosis en ciertas situaciones. Sin embargo, debido a que las células inmunitarias juegan un papel importante en la respuesta fibrótica, los inhibidores de TGF β que se dirigen al TGF β presentado por la mayoría o todos los complejos de TGF β de la molécula presentadora pueden ser beneficiosos.

[0533] En los últimos años, el tratamiento de la fibrosis hepática se ha convertido en un área de mayor interés debido a su creciente prevalencia en todo el mundo. Por ejemplo, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se asocia con anomalías metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina, hiperglucemia en ayunas, dislipidemia y perfiles de adipocinas alterados. La EHGNA se caracteriza por una acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos y es un espectro de enfermedades que progresa desde la esteatosis hepática (acumulación de gotas de lípidos/grasas en los hepatocitos) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), fibrosis hepática y eventualmente cirrosis en los casos más graves. EHNA con fibrosis o cirrosis aumenta el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC) (Starley BQ, et al. Hepatology 2010; 51:1820-1832). Se ha propuesto que la progresión de la esteatosis a la EHNA está regulada por un modelo de "impactos múltiples", en donde el primer impacto es la resistencia a la insulina y la alteración metabólica, que conduce a la esteatosis hepática, seguida de estrés oxidativo, lesión de hepatocitos mediada por citoquinas proinflamatorias, partición de lípidos alterada y hepatotoxicidad mediada por ácidos grasos libres, carga anormal de colesterol intrahepático, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia (Tilg H, Moschen AR, Hepatology 2010; 52: 1836-1846; y Yilmaz Y., Aliment Pharmacol Ther 2012; 36: 815-823).

[0534] Mientras que muchos modelos animales han sido desarrollados para el estudio de la fibrosis hepática, se puede emplear cualquiera de los modelos preclínicos adecuados. Por ejemplo, se ha demostrado que una dieta alta en grasas en ratones imita tanto la histopatología como la patogenia de la EHGNA humana. Además, algunos modelos genéticos también muestran características del síndrome metabólico humano y EHGNA, como los modelos de ratón *db/db* y *ob/ob*. También existen modelos animales para el estudio de la EHNA, que consisten principalmente en varios modelos inducidos por la dieta, que incluyen, entre otros, dieta deficiente en metionina y colina (MCD), dieta alta en colesterol (HCD), dieta alta deficiente en colina dieta de grasas (CDHFD), dieta deficiente en colina con deficiencia de L-aminoácidos, dieta deficiente en aminoácidos con deficiencia de colina + tetracloruro de carbono, dieta alta en grasas + estreptozotocina, dieta alta en grasas + colesterol alto (HFHC), dieta alta en fructosa (HFD) y una dieta alta en grasas y fructosa (HFHF). Los modelos genéticos de ratón para el estudio de EHNA incluyen, entre otros, ratones *foz/foz*, ratones deficientes en PTEN específicos de hepatocitos, ratones *Db/db* + dietilnitrosamina (DEN) y ratones *db/db* + MCD. Los detalles de todos estos modelos, incluidas las ventajas y desventajas de cada uno, se describen en Jennie Ka Ching Lau et al., J Pathol 2017; 241: 36-44.

[0535] Otro modelo útil para probar la eficacia de la isoforma específica de TGFβ inhibidores en la fibrosis hepática incluyen el modelo de tetracloruro de carbono (CCL₄). Otro modelo útil para probar la eficacia de los inhibidores de TGFβ específicos de isoformas en la fibrosis hepática incluye el modelo de ligadura de conductos biliares (BDL) (ver, por ejemplo, Tag et al., J Vis Exp. 2015; (96): 52438).

[0536] Los inhibidores de TGFβ1 específicos a isoformas, tales como los proporcionados en el presente documento se pueden usar para tratar condiciones fibróticas del hígado, tales como el hígado graso (por ejemplo, enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). El hígado graso puede o no estar inflamado. La inflamación del hígado debido al hígado graso (es decir, esteatohepatitis) puede convertirse en cicatrices (fibrosis), que luego a menudo progresan a cirrosis (cicatrices que distorsionan la estructura del hígado). Por lo tanto, el inhibidor puede usarse para tratar tales afecciones. En algunas formas de realización, el inhibidor bloquea la activación de TGFβ1 asociado a ECM (p. ej., TGFβ1 pro/latente presentado por LTBP1/3) dentro del entorno fibrótico del hígado. El inhibidor puede opcionalmente además bloquear la activación de macrófagos asociada a TGFβ1 (p. ej., TGFβ1 pro/latente presentado por LRRRC33), por ejemplo, células de Kupffer (también conocidos como macrófagos estrellados), así como la infiltración de macrófagos derivados de monocitos y MDSC. Como resultado, el inhibidor puede suprimir los factores asociados a la fibrosis (p. ej., los marcadores fibróticos descritos en este documento). La administración del inhibidor en un sujeto con tales condiciones puede reducir uno o más síntomas, prevenir o ralentizar la progresión de la enfermedad, reducir o estabilizar la acumulación de grasa en el hígado, reducir los biomarcadores asociados a la enfermedad (tales como fragmentos de colágeno en suero), reducir la cicatrización del hígado, reducir la rigidez del hígado y/o producir un resultado clínicamente significativo en una población de pacientes tratados con el inhibidor, en comparación con una población de control no tratada con el inhibidor. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz del inhibidor puede lograr tanto una reducción de la grasa hepática como una reducción de la fibrosis (p. ej., cicatrización) en pacientes con EHNA. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz del inhibidor puede lograr una mejora en la fibrosis en al menos un paso sin empeoramiento de la esteatohepatitis en pacientes con EHNA. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz del inhibidor puede reducir la tasa de aparición de insuficiencia hepática y/o cáncer de hígado en pacientes con EHNA.

[0537] En algunas formas de realización, una cantidad eficaz del inhibidor puede normalizar, en comparación con el control, los niveles de múltiples biomarcadores séricos inflamatorios o fibróticos como evaluados tras el inicio de la terapia, en, por ejemplo, 12-36 semanas. En algunas formas de realización, pueden usarse biomarcadores inflamatorios o fibróticos para evaluar la gravedad de EHGNA (midiendo los niveles de esteatosis hepática), seleccionar pacientes para el tratamiento y/o controlar la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, los biomarcadores sanguíneos y los paneles pueden incluir, entre otros:

- i) el índice de hígado graso (IMC, circunferencia de la cintura, triglicéridos séricos y gammaglutamiltransferasa (GGT);
- ii) el índice de esteatosis hepática (relación de aspartato aminotransferasa sérica (AST):alanina aminotransferasa (ALT), IMC, sexo y presencia de diabetes mellitus);
- i) la puntuación de grasa hepática EHGNA (ALT sérica, colesterol HDL, triglicéridos, hemoglobina A_{1c} y recuento de leucocitos);
- ii) SteatoTest (BioPredictive) (niveles séricos de bilirrubina total, GGT, α2-macroglobina, haptoglobina, ALT, apolipoproteína AI, colesterol total, triglicéridos, glucosa (ajustada por edad y sexo) e IMC); y
- iii) la puntuación de la cresta EHGNA (niveles séricos de ALT, colesterol HDL, triglicéridos, hemoglobina A_{1c}, recuento de leucocitos y datos de comorbilidad (y presencia de hipertensión)).

[0538] En algunas formas de realización, se pueden usar biomarcadores de formación de imágenes para evaluar los niveles de esteatosis hepática. Por ejemplo, los biomarcadores de imágenes pueden incluir, entre otros: ecografía, parámetro de atenuación controlada (CAP), fracción de grasa de densidad de protones estimada por MRI (MRI-PDFF) y espectroscopia de resonancia magnética (MRS).

[0539] Las biopsias de hígado son el estándar actual para el diagnóstico EHNA, sin embargo, la variabilidad entre los patólogos limita la eficacia de tal método de diagnóstico. Por consiguiente, el uso del algoritmo de inhibición de la progresión del hígado graso (FLIP) (que comprende esteatosis histológica, actividad y puntuaciones de fibrosis) puede usarse para mejorar la consistencia del diagnóstico de EHNA mediante biopsia. Además, muchos biomarcadores no invasivos también pueden ser útiles para diagnosticar y controlar enfermedades. Por consiguiente, en algunas formas de realización, se pueden usar biomarcadores inflamatorios o fibróticos para evaluar la gravedad de la EHNA, seleccionar pacientes para el tratamiento y/o controlar la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. Los biomarcadores sanguíneos pueden incluir:

- i) marcadores de apoptosis, tales como fragmentos de CK18, citoqueratina total y sFAS;
- ii) marcadores inflamatorios, como CRP, TNF, IL-8 y CXCL10;
- iii) productos de oxidación de lípidos, tales como 11-HETE, 9-HODE, 13-HODE, 12-oxo-ODE, LA-13-HODE (puntuación oxNASH) y 11,12-diHETrE;

- iv) enzimas lisosomales, tales como catepsina D; y
- v) paneles de combinación, tales como la prueba EHNA (BioPredictive) y Panel de diagnóstica de EHNA (que comprende la presencia de diabetes mellitus, sexo, IMC y niveles séricos de triglicéridos, fragmentos de CK18 y CK18 total).

5

10

[0540] En algunas formas de realización, los biomarcadores y paneles relacionados pueden ser útiles en los niveles de diagnóstico de la fibrosis y/o cirrosis, seleccionar los pacientes para el tratamiento, y/o realizar el seguimiento de la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, las pruebas no invasivas de fibrosis hepática y cirrosis incluyen, entre otras: relación AST:ALT, índice de relación AST:plaquetas, índice de fibrosis-4 (edad, AST, ALT y recuento de plaquetas), puntuación de fibrosis EHGNA (edad, IMC, alteración de la glucosa en ayunas y/o diabetes, AST ALT, recuento de plaquetas y albúmina), puntuación BARD (AST, ALT, IMC y diabetes).

15

20

[0541] Marcadores y paneles de fibrosis específicos también pueden ser útiles, e incluyen, pero no se limitan a: ácido hialurónico; PIINP; Pro-C3; TIMP1; Laminina; panel de fibrosis hepática mejorada (ELF) (PIINP, ácido hialurónico, TIMP1); FibroTest (GGT, bilirrubina total, α_2m , apolipoproteína A1 y haptoglobina); y FibroMeter EHGNA (peso corporal, índice de protrombina, ALT, AST, ferritina y glucosa en ayunas). Los biomarcadores de imágenes para la fibrosis hepática pueden incluir, entre otros: FibroScan (TE), elastografía de onda de corte puntual (pSWE) (también conocida como impulso de fuerza de radiación acústica (ARFI), SWE 2D-3D, elastografía por resonancia magnética (MRE) y IRM multiparamétrica.

25

[0542] En algunas formas de realización, los biomarcadores genéticos y genómicos pueden ser útiles para evaluar el riesgo y la gravedad de EHGNA, que incluyen la evaluación de varios SNP, ncARN libres de células y miARN. En VWS Wong et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol se resume una revisión completa de los biomarcadores genéticos y genómicos conocidos, así como de los biomarcadores sanguíneos, paneles, biomarcadores de imágenes y pruebas antes mencionados. 2018 agosto; 15(8):461-478.

30

[0543] En algunas formas de realización en pacientes con EHNA, los inhibidores de TGF β 1 específicos a isoforma pueden administrarse en pacientes que reciben una o más terapias adicionales, incluyendo, pero no se limitan a inhibidores de la miostatina, que en general puede mejorar la regulación metabólica en pacientes con manifestación clínica de síndrome metabólico, incluidos EHNA y EHGNA.

35

[0544] En algunas formas de realización, la terapia adicional puede comprender un inhibidor de TGF β 3. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGF β 3 es un inhibidor de TGF β 3 específico de isoforma. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGF β 3 es un inhibidor de TGF β 3 independiente del contexto o con sesgo de contexto. En algunas formas de realización, el paciente con EHNA tiene tejido fibrótico TGF β 1 positivo y TGF β 3 positivo. En algunas formas de realización, el paciente con EHNA es o se ha determinado que responde parcialmente a la terapia inhibidora de TGF β 1.

40

45

50

[0545] En algunas formas de realización, en pacientes con EHNA, los inhibidores de TGF β 1 específicos a isoformas, pueden administrarse en pacientes que reciben un inhibidor de acetil CoA carboxilasa (ACCI) (p. ej., firsocostat (GS-0976) o PF-05221304). Otras terapias que pueden ser útiles en combinación con los inhibidores mejorados de TGF β 1 específicos de isoforma descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a: agonistas o analgésicos del receptor de GLP-1 (p. ej., semaglutida), agonistas del receptor X de farnesiloide (FXR) (p. ej., GS-9674; también conocido como Cilofexor), inhibidores de ASK1 (p. ej., selonsertib); ácido obeticolico, agonistas de PPAR (p. ej., GFT505; también conocido como elafibranor); inhibidores de nitazoxanida, cetoheoxiquinasa (KHK) (p. ej., PF-06835919); y/o inhibidores de diacilglicerol O-aciltransferasa 2 (DGAT2) (p. ej., PF-06865571). En algunas formas de realización, uno o más de los agentes terapéuticos antes mencionados se pueden utilizar en combinación con un inhibidor de TGF β 1 específico a isoformas de la presente descripción, por ejemplo, un inhibidor de TGF β 1 específico a isoformas en combinación con un agonista de FXR, un inhibidor ACC y/o un análogo de GLP-1. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 selectivos de isoformas pueden usarse en combinación con un inhibidor de miostatina, como inhibidores de activación de miostatina (p. ej., SRK-015, por ejemplo, WO 2016/073853 y WO 2017/049011). En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 selectivos de isoformas pueden usarse en combinación con un inhibidor de GDF11, tal como inhibidores de activación de GDF11 (p. ej., WO 2017/015622).

55

60

[0546] En algunas formas de realización, el tratamiento con los inhibidores de TGF β 1 específicos a isoformas solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales reduce la grasa hepática medida por MRI-PDFF. En algunas formas de realización, la reducción de la grasa hepática es al menos del 20%, por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$, $\geq 35\%$, $\geq 40\%$, $\geq 45\%$ o $\geq 50\%$. En algunas formas de realización, el tratamiento con inhibidores de TGF β 1 específicos de isoformas solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales reduce ALT y/o GGT séricas en al menos un 20%, por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$, $\geq 35\%$, $\geq 40\%$, $\geq 45\%$ o $\geq 50\%$. En algunas formas de realización, el tratamiento con inhibidores de TGF β 1 específicos de isoformas solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales reduce la síntesis de ácidos biliares.

65

[0547] En algunas formas de realización, los pacientes con EHNA pueden tener fibrosis hepática avanzada (estadio F3/F4). En algunas formas de realización, dichos pacientes tienen fibrosis hepática avanzada en estadio F3. En algunas formas de realización, dichos pacientes tienen fibrosis hepática en estadio F4 caracterizada por cirrosis. En algunas

formas de realización, los pacientes con EHNA desarrollan o tienen riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular y/o várices esofágicas.

[0548] A continuación se proporciona la estadificación de la fibrosis en la enfermedad del hígado graso no alcohólico de acuerdo con la clasificación derivada del Comité de Patología de la Red de Investigación Clínica de Esteatohepatitis No Alcohólica:

Manifestación fibrótica	Estado de fibrosis
Fibrosis perisinusoidal o periportal	1
Fibrosis perisinusoidal leve (zona 3)	1A
Fibrosis perisinusoidal moderada (zona 3)	1B
Fibrosis portal/periportal	1C
Fibrosis perisinusoidal y portal/periportal	2
Fibrosis de puente	3
Cirrosis	4

[0549] Para permitir la evaluación de las diversas características histológicas durante la terapia y abarcar todo el espectro de EHNA, el Comité de Patología de la Red de Investigación Clínica EHNA (CRN) realizó un análisis exhaustivo univariado y multivariado sobre las asociaciones entre las diferentes características histológicas observadas en EHNA y el diagnóstico de EHNA según el Comité de Patología. El resultado fue un sistema de puntuación tanto de la actividad de EHNA (grado) como de la deposición de colágeno más remodelación arquitectónica (etapa). El sistema de clasificación, la Puntuación de Actividad EHNA (NAS), fue la suma no ponderada de tres componentes histológicos: esteatosis (0-3), inflamación lobulillar (0-3) y degeneración en globo (0-2). Varía de 0 a 8. NAS incluye las características de lesión activa que son potencialmente reversibles. Además, el sistema de estadificación de la fibrosis de Brunt et al. fue desarrollado aún más. En el sistema CRN de EHNA, la puntuación de fibrosis para el estadio 1 se subdividió en fibrosis perisinusoidal delicada (1A) y densa (1B), mientras que el estadio 1C se definió como fibrosis portal sin fibrosis perisinusoidal concomitante (revisado por Stål, World J Gastroenterol, 2015 21 de octubre; 21(39): 11077-11087).

[0550] La isoforma específica, inhibidores de TGFβ1 tales como los proporcionados en el presente documento se pueden usar para tratar condiciones fibróticas del riñón, por ejemplo, enfermedades caracterizadas por acumulación de matriz extracelular (nefropatía IgA, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, glomerulonefritis semilunar, nefritis lúpica y nefropatía diabética) en donde se ha observado un aumento de la expresión de TGFβ en los glomérulos y el tubulointersticio. Si bien la deposición glomerular y tubulointersticial de dos componentes de la matriz inducida por TGFβ, fibronectina EDA + y PAI-1, se elevó significativamente en todas las enfermedades con acumulación de matriz, el análisis de correlación ha revelado una estrecha relación principalmente con la isoforma TGFβ1. Por consiguiente, los inhibidores de TGFβ1 específicos de isoforma son útiles como terapéuticos para un espectro de trastornos glomerulares humanos, en los que el TGFβ está asociado con la acumulación patológica de matriz extracelular.

[0551] En algunas formas de realización, la afección fibrótica del riñón está asociada con enfermedad renal crónica (ERC). La ERC es causada principalmente por la presión arterial alta o la diabetes y se cobra más de un millón de vidas cada año. Los pacientes con ERC requieren atención médica de por vida que va desde dietas y medicamentos estrictos hasta diálisis y trasplantes. En algunas formas de realización, la terapia con inhibidor de TGFβ1 descrita en el presente documento puede reducir o retrasar la necesidad de diálisis y/o trasplante. En algunas formas de realización, tal terapia puede reducir la necesidad (p. ej., dosis, frecuencia) de otros tratamientos. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGFβ1 específicos de isoforma pueden administrarse en pacientes que reciben una o más terapias adicionales, que incluyen, pero no se limitan a inhibidores de miostatina, que generalmente pueden mejorar la regulación metabólica en pacientes con ERC.

[0552] Condiciones fibróticas que pueden ser tratadas con el inhibidor de TGFβ1 de la presente divulgación incluyen condiciones que involucran fibrosis y/o la inflamación crónica. Tales afecciones pueden ser trastornos neuromusculares, que incluyen, entre otros, distrofia muscular de Duchenne (DMD) y otros trastornos genéticos como la esclerosis múltiple (EM) y la fibrosis quística (FQ). Mediante la inhibición de los brazos de TGFβ1 asociados a células inmunitarias y ECM, se cree que el inhibidor de TGFβ1, como los descritos en el presente documento, suprime la progresión fibrótica y restaura la polarización de macrófagos M1/M2.

[0553] Los modelos útiles para estudiar la ERC y la fibrosis renal incluyen, pero no se limitan a NZB/W, MRL/lpr y cepas de ratón BXSB, modelos anti-GBM, modelos anti-Thy1, nefrectomía 5/6, nefropatía por radiación, nefrosis por puromicina aminonucleósido (PAN) y nefropatía por adriamicina, nefropatía por ácido fólico, nefropatía por CyA, modelo de ratón transgénico de nefropatía por sal DOCA, nefropatía asociada al VIH (HIVAN), ratas espontáneamente hipertensas (SHR), ratas Buffalo/mna, rata Munich Wistar Frömter (MWF), obstrucción ureteral unilateral (UUO), ratones knock-out para Col4A (síndrome de Alport) (ver Yang et al. Today Dis Models, 2010; 7 (1-2): 13-19).

[0554] La fibrosis de órganos que puede ser tratada con los métodos proporcionados en este documento incluye la fibrosis

cardíaca (p. ej., cardiovascular). En algunas formas de realización, la fibrosis cardíaca está asociada con insuficiencia cardíaca, por ejemplo, insuficiencia cardíaca crónica (ICC). En algunas formas de realización, la insuficiencia cardíaca puede estar asociada con enfermedades del miocardio y/o enfermedades metabólicas. En algunas formas de realización, los inhibidores de TGF β 1 específicos de isoforma se pueden administrar en pacientes que reciben una o más terapias adicionales, que incluyen, pero no se limitan a inhibidores de miostatina en pacientes con disfunción cardíaca que implica fibrosis cardíaca y trastorno metabólico.

[0555] Modelos genéticos útiles para el estudio de la fibrosis cardíaca incluyen, pero no se limitan a ratones FAK-KO específicos a miocitos cardíacos, ratones SR-BI / apoE doble KO (dKO) modificados genéticamente, ratones syndecan-1 nulo, ratones que sobreexpresan EC-SOD, ratones knockout para PKC- δ . Los modelos de ratón quirúrgico útiles para estudiar la fibrosis cardíaca incluyen, entre otros, ligadura de arterias coronarias, modelo de reperfusión isquémica (tórax abierto y cerrado), modelo de isquemia crónica, modelo de isquemia-reperfusión con preacondicionamiento isquémico, modelo de Langendorff, constricción aórtica transversal (TAC), constricción de la aorta ascendente, constricción de la aorta abdominal, banda de la arteria pulmonar, TAC con ligadura de la coronaria anterior izquierda distal, modelo de fístula aortocava (ACF) y modelo de insuficiencia aórtica (ver Rai et al., Mol Cell Biochem, 2017 enero; 424 (1-2): 123-145).

[0556] En algunas formas de realización, las condiciones fibróticas que pueden ser tratadas con las composiciones y/o métodos descritos en este documento incluyen desmoplasia. La desmoplasia puede ocurrir alrededor de una neoplasia, causando fibrosis densa alrededor del tumor (p. ej., estroma desmoplásico) o tejido cicatricial dentro del abdomen después de una cirugía abdominal. En algunas formas de realización, la desmoplasia está asociada con un tumor maligno. Debido a su formación densa que rodea la enfermedad maligna, es posible que las terapias convencionales contra el cáncer (p. ej., quimioterapia) no penetren de manera efectiva para alcanzar las células cancerosas y obtener efectos clínicos. Se pueden usar inhibidores específicos de isoformas de TGF β 1, tales como los descritos en este documento, para interrumpir la desmoplasia, de modo que la formación fibrótica se pueda aflojar para ayudar a los efectos de la terapia anticancerosa. En algunas formas de realización, los inhibidores específicos de isoforma de TGF β 1 pueden usarse como monoterapia (más abajo).

[0557] En algunas formas de realización, un paciente tiene un tumor sólido fibrótico (p. ej., desmoplasia) y es o ha sido excluido de un conjunto de candidatos quirúrgico, de manera que se considera que el tumor sólido fibrótico es no resecable o no operativo. Tal paciente puede ser un candidato para recibir una terapia de inhibición de TGF β 1 de la presente divulgación. El inhibidor de TGF β 1 de la presente invención puede hacer que el tumor se vuelva resecable u operable después de la administración, de modo que el paciente pueda convertirse en un candidato para la resección quirúrgica.

[0558] Para tratar pacientes con condiciones fibróticas, los inhibidores específicos a isoforma de TGF β 1, se administran a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar la fibrosis. La cantidad eficaz de tal anticuerpo es una cantidad eficaz para lograr tanto la eficacia terapéutica como la seguridad clínica en el sujeto. En algunas formas de realización, el inhibidor es un anticuerpo que puede bloquear la activación de un TGF β 1 mediado por LTBP localizado (p. ej., anclado) en la ECM y TGF β 1 mediado por GARP localizado en (p. ej., anclado a) células inmunitarias. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que puede bloquear la activación de un TGF β 1 mediado por LTBP localizado en la ECM y TGF β 1 mediado por LRRC33 localizado en (p. ej., anclado a) monocitos/macrófagos. En algunas formas de realización, LTBP es LTBP1 y/o LTBP3. En algunas formas de realización, puede ser beneficioso dirigir e inhibir el TGF β 1 presentado por LRRC33 en macrófagos profibróticos similares a M2 en el microambiente fibrótico.

[0559] Los ensayos útiles para determinar la eficacia de los anticuerpos y/o composiciones de la presente divulgación para la alteración de la fibrosis incluyen, pero no se limitan a ensayos histológicos para contar fibroblastos y análisis inmunohistoquímicos básicos conocidos en la técnica.

[0560] En algunas formas de realización, el (los) fragmento(s) de LAP circulante(s) se puede(n) utilizar como un marcador sérico de la fibrogénesis. Pueden usarse anticuerpos que reconocen específicamente los extremos escindidos de tales fragmentos para detectar fragmentos de LAP de muestras de suero. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 8.198.412.

Papel del TGF β en la diabetes

[0561] La pérdida de células β secretoras de insulina en el páncreas es un mecanismo principal de la diabetes tipo 2. Estudios recientes sugieren un papel de los ligandos de la familia TGF β en la regulación de la función de las células β y la homeostasis de la glucosa. Estos ligandos pueden influir en la proliferación de células β y/o la incorporación de nuevas células β a partir de progenitores en los adultos. Se ha informado que la manipulación genética para causar una sobreexpresión transgénica de TGF- β a través del promotor de la insulina causa una disminución del desarrollo del páncreas e islotes exocrinos y el mantenimiento del control de la glucosa. De manera similar, se ha informado que la sobreexpresión transgénica de TGF- β a través del promotor del glucagón causa hipoplasia de células B, disminución de la secreción de insulina, alteración de la tolerancia a la glucosa (revisado, por ejemplo, en Trends Endocrinol Metab. 2010 Jul; 21 (7): 441-448). La expansión y renovación de las células beta pancreáticas es crucial tanto para el desarrollo normal del páncreas como para el mantenimiento de la función en el islote adulto. Recientemente, varios estudios han identificado algunas de las funciones clave de la señalización de TGF β en el páncreas en desarrollo. Específicamente, la señalización de TGF β promueve el compromiso endocrino de las células progenitoras y su posterior maduración. Ratones que sobreexpresan la forma negativa dominante del receptor de TGF β tipo II Tulachan et al. inhibió la señalización

del TGF β a nivel del receptor y encontró un aumento en el número de precursores endocrinos, así como una proliferación de células endocrinas. En el islote adulto, las tres isoformas de TGF β se expresan en las células endocrinas en un patrón difuso. Sin embargo, la intensidad fue mayor para TGF β 2 y TGF β 3 en células positivas a insulina. En el páncreas exocrino, la mayoría de las células acinares fueron positivas para TGF β 1, mientras que los tres ligandos parecían expresarse por igual en las células ductales. Las células beta adultas tienen un recambio muy bajo y una tasa de proliferación baja. El inhibidor de TGF β 1 selectivo de isoformas, como los incluidos en el presente documento, puede usarse para promover la replicación de las células beta pancreáticas en el tratamiento o prevención de la diabetes y/o intolerancia a la glucosa. Debido a que la replicación de las células β es el mecanismo principal para el mantenimiento y la expansión de la masa de las células β en respuesta a las demandas cambiantes de insulina, y el fracaso de dicha expansión adaptativa puede resultar en diabetes (ver, por ejemplo, Dhawan et al., Diabetes, 2016 Mayo; 65 (5): 1208-1218), el inhibidor de TGF β 1 selectivo de isoformas puede usarse ventajosamente para mejorar la diabetes sin causar efectos secundarios no deseados asociados con la inhibición de la señalización de TGF β . En algunas formas de realización, el inhibidor de TGF β 1 selectivo de isoformas puede usarse junto con un inhibidor selectivo de miostatina (p. ej., anticuerpos que se unen selectivamente a miostatina pro/latente/GDH8 inhibiendo así la activación de miostatina), como se describe, por ejemplo, en PCT/US2015/059468 y PCT/US2016/052014, en el tratamiento o prevención de la diabetes o intolerancia a la glucosa. En algunas formas de realización, la diabetes es diabetes de tipo 2.

[0562] Las afecciones relacionadas con la diabetes incluyen la nefropatía diabética (ND), que también se denomina enfermedad renal diabética. La nefropatía diabética es una complicación grave relacionada con los riñones de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. Hasta el 40 por ciento de las personas con diabetes eventualmente desarrollan una enfermedad renal. Con el tiempo, la ND puede conducir a edema pulmonar, enfermedad cardiovascular y estadio renal en etapa terminal, que eventualmente requiere diálisis o un trasplante de riñón para supervivencia.

[0563] Las principales características clínicas de la ND humana incluyen albuminuria, reducción progresiva de la TFG e hipertensión y aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares. La patogenia de la ND se asocia con angiogénesis e hiperfiltración glomerular. Además, en pacientes con ND se observa engrosamiento de la membrana basal glomerular, expansión de células mesangiales, glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial. El TGF β 1 y sus receptores se regulan positivamente tanto en la nefropatía diabética experimental como en la humana. Se ha informado que la expresión mejorada de los receptores de TGF β 1, la bioactividad de TGF β 1 y la capacidad de respuesta al TGF β 1 exógeno se produce en respuesta a niveles altos de glucosa en las células glomerulares, y la adenosina extracelular está implicada para desempeñar un papel en este proceso (ver, para ejemplo, Roa et al., (2009) "Adenosine mediates transforming growth factor-beta 1 release in kidney glomeruli of diabetic rats" FEBS Let 583 (19): 3192-3198). En algunas formas de realización, ND comprende la desregulación de la biosíntesis o señalización de adenosina. En algunas formas de realización, la desregulación implica CD39 y/o CD73.

Papel del TGF β en afecciones musculoesqueléticas

[0564] En el sistema musculoesquelético, que está compuesto por los huesos del esqueleto, músculos, cartílagos, tendones, ligamentos, articulaciones y otro tejido conectivo que sostiene y une tejidos y órganos, TGF β juega una variedad de funciones que incluyen inhibición de la proliferación y diferenciación, inducción de atrofia y desarrollo de fibrosis. TGF β reduce la proliferación de células satélite y previene la diferenciación (mediante la inhibición de MyoD y miogenina) (Allen, R.E. y L.K. J Cell Physiol, 1987, 133 (3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU., 1991. 88 (9): p. 3822-6; Massague, J, et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU., 1986. 83 (21): p. 8206-10; Olson, EN, et al., J Cell Biol, 1986. 103 (5): p. 1799 - 805). La isoforma de TGF β (es decir, TGF β 1, 2 o 3) no se especifica en estos primeros trabajos, pero se presume que es TGF β 1. TGF β también contribuye a la fibrosis muscular; la inyección directa de TGF β 1 recombinante da como resultado fibrosis del músculo esquelético, y la inhibición de pan-TGF β disminuye la fibrosis en el músculo agudo y lesionado crónicamente (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164 (3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45 (1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611 -21). TGF β 1 es expresado por miofibras, macrófagos, células T reguladoras, fibroblastos y fibrocitos dentro del músculo esquelético (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164 (3): p. 1007-19; Lemos, D.R., et al., Nat Med, 2015. 21 (7): p. 786-94; Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014. 6 (258): p. 258ra142; Wang, X, et al., J Immunol, 2016. 197 (12): p. 4750-4761); y la expresión aumenta en caso de lesión y enfermedad (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164 (3): p. 1007-19; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Bernasconi, P, et al., J Clin Invest, 1995. 96 (2): p. 1137-44; Ishitobi, M., et al., Neuroreport, 2000. 11 (18): pág. 4033-5). TGF β 2 y TGF β 3 también están regulados positivamente (a nivel de ARNm) en el músculo mdx, aunque en menor grado que TGF β 1 (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011, 178(6): p 2611-21; Zhou, L. y col, Neuromuscul Disord, 2006. 16 (1): p. 32-8). Pessina, et al., Recientemente utilizaron experimentos de rastreo de linaje para mostrar que las células de múltiples orígenes dentro del músculo distrófico adoptan un destino fibrogénico a través de una vía dependiente de TGF β (Pessina, P, et al., Stem Cell Reports, 2015, 4(6): pág. 1046-60).

[0565] El hueso es el depósito más grande de TGF β en el cuerpo. De hecho, se cree que la vía del TGF β juega un papel importante en la homeostasis y remodelación ósea, al menos en parte, regulando la diferenciación de osteoblastos y/o la resorción ósea osteoclástica. Este proceso está involucrado tanto en situaciones normales como anormales que, cuando se desregulan, pueden causar o exacerbar enfermedades, como afecciones relacionadas con los huesos y cáncer. Por tanto, los inhibidores selectivos de TGF β 1 tales como los descritos en el presente documento pueden usarse para tratar tales afecciones. En algunas formas de realización, la administración de tales inhibidores es eficaz para restaurar o normalizar el equilibrio de formación-reabsorción ósea. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGF β 1 se

administra a sujetos junto con otra terapia, tal como un inhibidor de miostatina y/o agentes potenciadores de huesos, como terapia de combinación.

[0566] Las afecciones óseas (p. ej., enfermedades esqueléticas) incluyen osteoporosis, displasia, osteogénesis imperfecta y cáncer de huesos. Además del cáncer de hueso primario que se origina en el hueso, se sabe que muchas neoplasias malignas hacen metástasis en los huesos; estos incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de pulmón (p. ej., carcinoma de células escamosas), cáncer de tiroides, cáncer de testículo, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y mieloma múltiple.

[0567] Entre las afecciones relacionadas con los huesos, la osteogénesis imperfecta es una afección genética que generalmente está causada por mutaciones que afectan a los genes que codifican el colágeno de tipo I y hace que los huesos frágiles se rompan con extrema facilidad. Actualmente, hay pocas opciones de tratamiento en las que los bisfosfonatos siguen siendo el estándar de atención. Pueden usarse antígenos o fragmentos de unión a antígeno que inhiben selectivamente la activación de TGFβ1 para tratar la osteogénesis imperfecta ya sea solo como monoterapia o junto con otra terapia destinada para tratar la enfermedad.

[0568] Efectos terapéuticos de inhibidores de TGFβ1 tales como los descritos en el presente documento pueden ser monitoreados usando biomarcadores adecuados, tales como los marcadores séricos de la formación de hueso (actividad de la fosfatasa alcalina) o resorción (fosfatasa ácida resistente al tartrato).

[0569] En algunas formas de realización, tales condiciones están asociadas con debilidad muscular.

[0570] En algunas formas de realización, la condición musculoesquelética implica la desregulación de las células madre/progenitoras miogénicas y no miogénicas asociadas con el sistema musculoesquelético, tales como las células satélite. El inhibidor de TGFβ1 selectivo de isoformas puede usarse para promover la expansión/diferenciación de células madre/progenitoras miogénicas y no miogénicas.

[0571] El TGFβ1 puede desempeñar un papel en las afecciones fibróticas que acompañan a la inflamación crónica del tejido afectado, como las distrofias musculares humanas. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad grave, progresiva y, en última instancia, mortal causada por la ausencia de distrofina (Bushby, K, et al., *Lancet Neurol*, 2010. 9 (1): p. 77-93). La falta de distrofina da como resultado una mayor susceptibilidad a lesiones inducidas por contracciones, lo que conduce a una degeneración muscular continua (Petrof, BJ, et al., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*, 1993. 90 (8): p. 3710-4; Dellorusso, C, et al., *J Muscle Res Cell Motil*, 2001. 22 (5): p. 467-75; Pratt, SJ, et al., *Cell Mol Life Sci*, 2015. 72 (1): p. 153-64). Las rondas repetidas de reparación contribuyen a la inflamación crónica, fibrosis, agotamiento del conjunto de células satélite, eventual pérdida de movilidad y muerte (Bushby, K, et al., *Lancet Neurol*, 2010. 9 (1): p. 77-93; McDonald, C.M. y col, *Muscle Nerve*, 2013. 48 (3): págs. 343-56). La expresión de TGFβ1 aumenta significativamente en pacientes con DMD y se correlaciona con el grado de fibrosis observado en estos pacientes (Bernasconi, P, et al., *J Clin Invest*, 1995. 96 (2): p. 1137-44; Chen, Y.W. y col, *Neurology*, 2005. 65(6): p. 826-34). La deposición excesiva de ECM tiene efectos perjudiciales sobre las propiedades contráctiles del músculo y puede limitar el acceso a la nutrición ya que las miofibras se aíslan de su suministro de sangre (Klingler, W., et al., *Acta Myol*, 2012. 31 (3): p. 184-95). Recientemente, datos adicionales han implicado aún más al TGFβ1 en distrofias musculares. Se ha descubierto que las variantes de LTBP4 modifican la gravedad de la enfermedad en ratones y humanos. En ratón, una variante de LTBP4 es protectora en ratones que carecen de distrofina o γ-sarcoglicano (Coley, WD, et al., *Hum Mol Genet*, 2016, 25 (1): p. 130-45; Heydemann, A, et al., *J Clin Invest*, 2009. 119 (12): págs. 3703-12). En humanos, dos grupos identificaron de forma independiente una variante de LTBP4 como protectora en la DMD, retrasando la pérdida de la deambulación por varios años (Flanigan, KM, et al., *Ann Neurol*, 2013. 73 (4): p. 481-8; van den Bergen, JC, et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015. 86 (10): p. 1060-5). Aunque la naturaleza de las variantes genéticas en ratones y humanos difiere, en ambas especies la variante protectora da como resultado una disminución de la señalización del TGFβ (Heydemann, A, et al., *J Clin Invest*, 2009. 119 (12): p. 3703-12; Ceco, E. y col, *Sci Transl Med*, 2014. 6 (259): p. 259ra144). Muchas de las funciones del TGFβ1 en la biología del músculo esquelético se han deducido de experimentos en los que se inyecta factor de crecimiento activo purificado en animales o se añade a células en cultivo (Massague, J, et al., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*, 1986 83(21): p. 8206-10; Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164 (3): p. 1007-19; Mendias, CL, et al., *Muscle Nerve*, 2012 45 (1): pág. 55-9). Dada la importancia del contexto celular para funciones específicas de TGFβ1 (ver, por ejemplo, Hinck et al., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 2016, 8 (12)) es posible que algunos de los efectos observados en estos los experimentos no reflejan la función o funciones endógenas de la citocina in vivo. Por ejemplo, el tratamiento de fibroblastos dérmicos humanos con TGFβ1 recombinante, miostatina o GDF11 da como resultado cambios casi idénticos en la expresión génica en estas células, aunque in vivo las funciones de estas proteínas son bastante diferentes (Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., *Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation*, in *Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies*. 2016: Keystone, CO).

[0572] Múltiples investigadores han usado inhibidores de TGFβ para aclarar el papel del factor de crecimiento in vivo. El tratamiento de ratones mdx con el anticuerpo neutralizante pan-TGFβ1D11 claramente da como resultado una reducción de la fibrosis (por histología y contenido de hidroxiprolina), reducción del daño muscular (disminución de la creatina quinasa sérica y mayor densidad de miofibras) y mejora de la función muscular (por pletismografía, generación de fuerza). de músculos EDL aislados y mayor fuerza de agarre de las extremidades anteriores) (Nelson, CA, et al., *Am J Pathol*, 2011, 178(6): p. 2611-21; Andreetta, F, et al., *J Neuroimmunol*, 2006 175 (1-2): p. 77-86; Gumucio, JP, et al., *J Appl*

Physiol (1985), 2013. 115 (4): p. 539-45). Además, la expresión específica de miofibras de un receptor TGF β tipo II negativo dominante protege contra el daño muscular después de una lesión por cardiotoxina y en ratones δ -sarcoglicano -/- (Accornero, F, et al., Hum Mol Genet, 2014, 23(25): pág. 6903-15). La decorina de proteoglicano, que es abundante en el músculo esquelético e inhibe la actividad del TGF β , disminuye la fibrosis muscular en ratones mdx y después de una herida por laceración (Li, Y., et al., Mol Ther, 2007. 15 (9): p. 1616- 22; Gosselin, L.E. y col, Muscle Nerve, 2004. 30 (5): p. 645-53). Otras moléculas con actividad inhibidora de TGF β , como la suramina (un agente antineoplásico) y losartán (un bloqueador del receptor de angiotensina) han sido eficaces para mejorar la patología muscular y reducir la fibrosis en modelos de ratón de lesión, síndrome de Marfan y distrofia muscular (Spurney, C.F., et al., J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. 16 (1): p. 87-95; Taniguti, A.P., et al., Muscle Nerve, 2011. 43 (1): p. 82-7; Bedair, H.S., et al., Am J Sports Med, 2008. 36 (8): p. 1548-54; Cohn, R.D., et al., Nat Med, 2007. 13 (2): p. 204-10). Si bien todos los agentes terapéuticos descritos anteriormente inhiben el TGF β 1 o su señalización, ninguno de ellos es específico para la isoforma TGF β 1. Por ejemplo, 1D11 se une e inhibe las isoformas 1, 2 y 3 de TGF β (Dasch, J.R., et al., J Immunol, 1989. 142 (5): p. 1536-41). La suramina inhibe la capacidad de múltiples factores de crecimiento para unirse a sus receptores, incluidos PDGF, FGF y EGF, además de TGF β 1 (Hosang, M, J Cell Biochem, 1985,29 (3): p. 265-73; Olivier, S., y col, Eur J Cancer, 1990. 26 (8): p. 867-71; Scher, H.I. y W.D. Heston, Cancer Treat Res, 1992. 59: p. 131-51). La decorina también inhibe la actividad de la miostatina, tanto por unión directa como por regulación ascendente de la follistatina, un inhibidor de la miostatina (Miura, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006. 340 (2): p. 675-80; Brandan, E., C. Cabello-Verrugio y C. Vial, Matrix Biol, 2008. 27(8): p. 700-8; Zhu, J, et al., J Biol Chem, 2007. 282 (35): p. 25852-63). Losartán afecta vías de señalización adicionales a través de sus efectos sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, incluida la vía IGF-1/AKT/mTOR (Burks, TN, et al., Sci Transl Med, 2011. 3 (82): p. 82ra37; Sabharwal, R. y MW Chapleau, Exp Physiol, 2014,99 (4): p. 627-31; McIntyre, M, et al., Pharmacol Ther, 1997. 74 (2): p. 181-94). Por lo tanto, todas estas terapias inhiben moléculas adicionales que pueden contribuir a sus efectos terapéuticos, así como a sus toxicidades.

[0573] Teniendo en cuenta el papel postulado de TGF β en la homeostasis, reparación y regeneración muscular, los agentes, como los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, que modulan selectivamente la señalización de TGF β 1 pueden ser efectivos para tratar las fibras musculares dañadas, como en casos crónicos/genéticos. distrofias musculares y lesiones musculares agudas, sin las toxicidades asociadas con los inhibidores de TGF β de acción más amplia desarrollados hasta la fecha.

[0574] Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar las fibras musculares dañadas usando un agente que modula preferentemente un subconjunto, pero no todos, de los efectos del TGF β in vivo. Dichos agentes pueden modular selectivamente la señalización de TGF β 1 ("modulación específica de isoforma").

Reparación de fibras musculares en enfermedades musculares crónicas

[0575] La invención abarca un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, para uso en métodos para mejorar la calidad muscular y la función en los pacientes con DMD, mediante la limitación de la fibrosis y contribuyendo a una normalización de la morfología y la función muscular. Como TGF β 1 también inhibe la miogénesis, el bloqueo de TGF β 1 puede promover la regeneración en el músculo distrófico, lo que agrega un beneficio terapéutico adicional. Los inhibidores de TGF β 1 pueden usarse en combinación con terapias de regulación positiva de distrofina, como Exondys 51 (Eteplirsén). Dados los posibles beneficios terapéuticos de la inhibición de TGF β 1 en la distrofia muscular, es fundamental (1) diferenciar la función o funciones de TGF β 1 de las de TGF β 2 y TGF β 3, y (2) aclarar en qué contexto(s) molecular(es) la inhibición de TGF β 1 sería la más beneficiosa. Como se mencionó anteriormente, los inhibidores de pan-TGF β se han asociado con toxicidades significativas, lo que limita el uso clínico de estos compuestos (Anderton, M.J., et al., Toxicol Pathol, 2011. 39(6): p. 916-24; Stauber, A., et al., Clinical Toxicology, 2014. 4 (3): p. 1-10). No está claro cuál de las isoformas de TGF β causa estas toxicidades. Algunas de las toxicidades descritas pueden deberse a la inhibición de TGF β 1 en el sistema inmunológico. Por ejemplo, mientras que 1D11 redujo significativamente los niveles de fibrosis en el diafragma, el tratamiento también aumentó el número de células T CD4+ y CD8+ en el músculo, lo que sugiere un aumento de la respuesta inflamatoria tras la inhibición de pan-TGF β que podría ser perjudicial con el tratamiento a largo plazo (Andreetta, F. y col, J Neuroimmunol, 2006. 175 (1-2): p. 77-86). De hecho, el agotamiento de las células T del músculo mejora la patología muscular de los ratones mdx, lo que sugiere que las respuestas inflamatorias mediadas por células T son perjudiciales para el músculo distrófico (Spencer, M.J., et al., Clin Immunol, 2001. 98 (2): p. 235-43). Es probable que los aumentos en el número de células T tras la administración de 1D11 se deban a los efectos del TGF β 1 sobre las células T reguladoras (Treg). Los Treg presentan TGF β 1 en su superficie celular a través de GARP, y la liberación de TGF β 1 de este complejo mejora la actividad supresora de Treg, limitando así la inflamación mediada por células T (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39; Edwards, J.P., A.M. Thornton y E.M. Shevach, J Immunol, 2014. 193(6): p. 2843-9; Nakamura, K., et al., J Immunol, 2004. 172 (2): p. 834-42; Nakamura, K., A. Kitani y W. Strober, J Exp Med, 2001. 194 (5): p. 629-44). De hecho, el agotamiento de Treg usando el anticuerpo PC61 resultó en un aumento de la inflamación y el daño muscular en el diafragma de los ratones mdx, mientras que el aumento del número de Treg y la actividad redujo el daño muscular (Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014, 6(258): pág. 258ra142). Curiosamente, recientemente se ha identificado una población adicional de células T inmunosupresoras, las células Tr1. Estas células producen grandes cantidades de TGF β 3, que se requiere para su actividad supresora (Gagliani, N., et al., Nat Med, 2013. 19(6): p. 739-46; Okamura, T., et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU., 2009. 106(33): p. 13974-9; Okamura, T, et al., Nat Commun, 2015. 6: p. 6329). Si bien se desconoce el papel de las células Tr1 en el músculo esquelético, existe la posibilidad de que la inhibición de TGF β 1 y TGF β 3 por 1D11 pueda tener efectos proinflamatorios aditivos al inhibir tanto las células Tregs como las Tr1.

[0576] Los conocimientos estructurales descritos anteriormente con respecto a la latencia y activación de TGFβ1 permiten enfoques novedosos para el descubrimiento de fármacos que se dirigen específicamente a la activación de TGFβ1 (Shi, M, et al., Nature, 2011, 474 (7351): p 343-9). El alto grado de identidad de secuencia compartida entre los tres factores de crecimiento de TGFβ maduros no es compartido por los complejos latentes, lo que permite el descubrimiento de anticuerpos que son exquisitamente específicos para proTGFβ1. Usando enfoques patentados para el descubrimiento de anticuerpos, los presentes inventores han identificado anticuerpos (Ab1, Ab2 y Ab3) que se unen específicamente a proTGFβ1. Usando un sistema de cocultivo in vitro, se demostró que estos anticuerpos inhiben la liberación de TGFβ1 mediada por integrinas. En este sistema, fibroblastos derivados de los músculos esqueléticos de piel humana o de ratón son la fuente de TGFβ1 latente, una línea celular que expresa αvβ6 permite la liberación de TGFβ1 activo, que luego se mide usando una tercera línea celular que expresa un indicador de luciferasa sensible a SMAD2/3 (FIG. 15). Uno de estos anticuerpos, Ab1, ha sido probado in vivo y ha mostrado eficacia en el modelo de fibrosis renal en ratón UUO (obstrucción ureteral unilateral). En este modelo, el tratamiento de ratones (n=10) con 9 mg/kg/sem de Ab1 evitó la regulación positiva de los genes que responden a TGFβ1 y redujo la extensión de la fibrosis después de la lesión (mediante tinción con rojo picrosirius). Las terapias específicas de TGFβ1 pueden tener mejores perfiles de eficacia y seguridad en comparación con los inhibidores de pan-TGFβ, un aspecto crítico para una terapia que se usaría a largo plazo como en la población con DMD. Pueden usarse anticuerpos inhibidores de TGFβ1 para determinar si la inhibición específica de TGFβ1 tiene potencial como terapéutica para DMD u otras enfermedades musculares, y para aclarar el papel de TGFβ1 en la regeneración del músculo esquelético.

Lesiones de miofibras crónicas frente a agudas y selección de tratamientos óptimos

[0577] En un músculo normal, pero en regeneración, después de una lesión aguda (como una lesión traumática en músculos o neuronas motoras por lo demás sanos), se cree que se requiere la infiltración inicial de macrófagos inflamatorios para eliminar el tejido dañado y secretar factores (p. ej., citoquinas) necesarios para la activación de la célula satélite. Posteriormente, estas células cambian al fenotipo M2 para impulsar la resolución de la herida.

[0578] Por el contrario, en condiciones crónicas, como enfermedades que incluyen DMD, los macrófagos proinflamatorios predominaron en todo momento, y ese cambio a M2 no ocurre (o al menos no lo suficientemente eficiente), y los macrófagos proinflamatorios continúan para impulsar la inflamación y el daño muscular. En la DMD, la vía de NFκB es perpetuamente activa, lo que resulta en una inflamación constitutiva. En algunas formas de realización, por lo tanto, se puede administrar un inhibidor de NFκB a pacientes con DMD para reducir la inflamación crónica.

[0579] Por tanto, en afecciones crónicas como la DMD, el enfoque terapéutico puede estar en la reparación muscular en oposición a la regeneración muscular. Esto se debe a que las fibras musculares de la DMD están defectuosas pero no destruidas; están dañadas por desgarros en la membrana, desregulación de los transitorios de calcio y daño de ROS de los macrófagos. En comparación, en los casos de lesiones en músculos sanos, el enfoque terapéutico puede estar en la regeneración. Por ejemplo, en los modelos de cardiotoxina, las fibras musculares mueren y deben regenerarse. Esto simula el proceso de recuperación después de una lesión traumática, como una lesión por aplastamiento.

[0580] La evidencia sugiere que LRRC33 se expresa en macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato, que tienen un fenotipo similar a M2 (caracterizado porque expresan altos niveles de arginasa, no iNOS y altos niveles de CD206).

[0581] En situaciones en las que LRRC33 se expresa principalmente en las células M2 y donde su presentación de TGFβ1 ("contexto") es importante para los efectos de cicatrización de estas células a favor de la herida, puede ser beneficioso activar TGFβ1 mediado por LRRC33 para promover la reparación y/o la miogénesis. Por otro lado, en situaciones en las que LRRC33 también se expresa en las células proinflamatorias M1, entonces puede ser beneficioso inhibir el TGFβ1 mediado por LRRC33, dado que la inflamación impulsa la fibrosis, especialmente en el entorno distrófico, como la DMD. Por lo tanto, identificar la fuente/contexto del TGFβ1 asociado a la enfermedad puede ser un paso importante en la selección del modulador correcto de la señalización del TGFβ, que informará qué nivel de selectividad debe considerarse (p. ej., moduladores de TGFβ1 independientes de contexto, específicos a isoformas o moduladores específicos de contexto de TGFβ1; inhibidores o activadores de TGFβ1, etc.).

[0582] Aparte de la inflamación crónica, el sello distintivo de la DMD es la fibrosis excesiva y progresiva. En la enfermedad avanzada, la fibrosis es tan grave que en realidad puede aislar las fibras musculares individuales de su suministro de sangre. También altera las propiedades contráctiles del músculo. En pacientes humanos, existe una fuerte correlación entre el grado de regulación positiva de TGFβ1 y la fibrosis, y un fuerte vínculo entre el grado de fibrosis y los resultados de movilidad negativos. Por lo tanto, en algunas formas de realización, los inhibidores de LTBP-proTGFβ1 pueden administrarse a pacientes distróficos para la prevención y/o reducción de la fibrosis para apuntar selectivamente a los efectos de TGFβ1 asociados con ECM en la enfermedad. En algunas formas de realización, se pueden emplear varios agentes selectivos de isoforma y/o contexto descritos en este documento para lograr la inhibición de la señalización de TGFβ1 para prevenir la fibrosis y promover la miogénesis, pero sin tener efectos no deseados en el sistema inmunológico (p. ej., a través de GARP o LRRC33).

Condiciones que implican la regulación por disminución o mutación de MHC

[0583] Indicaciones relacionadas con TGF β también pueden incluir condiciones en las que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, se suprime o es deficiente (p. ej., regulados a la baja). Dichas afecciones incluyen trastornos genéticos en los que uno o más componentes de la señalización mediada por MHC están alterados, así como afecciones en las que la expresión de MHC se ve alterada por otros factores, tales como cáncer, infecciones, fibrosis y medicamentos.

[0584] Por ejemplo, la regulación a la baja del MHC I en un tumor se asocia con el escape del tumor de la vigilancia inmunitaria. De hecho, las estrategias de escape inmunológico destinadas a evitar el reconocimiento de las células T, incluida la pérdida de la expresión del tumor de MHC de clase I, se encuentran comúnmente en las células malignas. Se ha observado que el escape inmunológico tumoral tiene un efecto negativo en el resultado clínico de la inmunoterapia contra el cáncer, incluido el tratamiento con anticuerpos que bloquean las moléculas de puntos de control inmunitarios (revisado, por ejemplo, en: Garrido et al. (2017) Curr Opin Immunol 39: 44-51. "The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy"). Por lo tanto, los inhibidores de TGF β 1 selectivos de isoformas e independientes del contexto incluidos en la presente divulgación pueden administrarse como monoterapia o junto con otra terapia (como inhibidor de punto de control, quimioterapia, radioterapia, etc.) para desencadenar o reforzar inmunidad contra el cáncer y/o potenciar la respuesta o la eficacia de otra terapia.

[0585] En algunas formas de realización, la regulación a la baja del MHC se asocia con una resistencia adquirida a una terapia contra el cáncer, como la TCC. Se contempla que los inhibidores selectivos de isoformas de alta afinidad de TGF β 1 pueden usarse para tratar pacientes que son respondedores primarios de una terapia contra el cáncer tal como CBT, para reducir la probabilidad de desarrollar resistencia adquirida. Por tanto, entre los tratados con el inhibidor de TGF β 1, que son respondedores primarios de la terapia del cáncer, puede reducirse la aparición de resistencia secundaria o adquirida a la terapia del cáncer con el tiempo.

[0586] La regulación a la baja de las proteínas del MHC de clase I también se asocia con ciertas enfermedades infecciosas, incluidas las infecciones virales como el VIH. Véase, por ejemplo, Cohen et al. (1999) Immunity 10(6): 661-671. "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK Cells". Por lo tanto, los inhibidores de TGF β 1 independientes del contexto y selectivos de isoformas incluidos en la presente divulgación pueden administrarse como monoterapia o junto con otra terapia (como terapia antiviral, terapia con inhibidores de proteasa, etc.) para liberar o estimular la inmunidad del huésped y/o mejorar la respuesta o la eficacia de otra terapia.

Condiciones que implican la autorrenovación de células madre, la regeneración de tejidos y la repoblación de células madre

[0587] La evidencia sugiere que TGF β 1 juega un papel en la regulación de la homeostasis de diversas poblaciones de células madre y su diferenciación/repoblación dentro de un tejido. Durante la homeostasis, las células madre específicas de tejido se mantienen predominantemente inactivas, pero se activan para entrar en el ciclo celular ante cierto estrés. Se cree que TGF β 1 funciona como una "ruptura" durante el proceso que regula estrechamente la diferenciación y reconstitución de las células madre, y el estrés que desencadena la entrada del ciclo celular coincide con la inhibición de TGF β 1 que elimina la "ruptura". Por tanto, se contempla que los inhibidores selectivos de isoformas de TGF β 1, tales como los descritos en este documento, pueden usarse para sesgar o corregir el ciclo celular y la decisión de entrada de GO de células madre/células progenitoras dentro de un tejido particular.

[0588] Por consiguiente, los inventores de la presente divulgación contemplan el uso de inhibidores de TGF β 1 selectivos de isoformas en condiciones en las que: i) la diferenciación/reconstitución de células madre/células progenitoras se detiene o perturba debido a una enfermedad o se induce como un lado efecto de una terapia/mediación; ii) los pacientes reciben una terapia o mediación que provoca la muerte o el agotamiento de las células sanas; iii) los pacientes pueden beneficiarse de una mayor diferenciación/reconstitución de células madre/células progenitoras; iv) la enfermedad está asociada con una diferenciación o reconstitución anormal de células madre.

[0589] En tejidos autorrenovables, como la médula ósea (producción de células sanguíneas) y la epidermis, el equilibrio entre los procesos de proliferación y diferenciación está estrictamente regulado para asegurar el mantenimiento de la población de células madre durante la vida. Revisado por D'Arcangel et al. (2017) Int. J Mol Sci. 18 (7): 1591. TGF β 1 actúa como un potente regulador negativo del ciclo celular y supresor de tumores en parte a través de la inducción de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, p15/INK4b, p21 y p57. La evidencia sugiere que el TGF β 1 contribuye a la inducción de p16/INK4a y p19/ARF para mediar el crecimiento de detención y la senescencia en ciertos tipos de células. Por consiguiente, en algunas formas de realización, se usa un inhibidor selectivo de isoformas de alta afinidad de la activación de TGF β 1, como los descritos en el presente documento, para regular la senescencia celular dependiente de p16/INK4a y la dinámica de las células madre en diversas poblaciones de células madre.

[0590] Por ejemplo, las células madre/estromales mesenquimales (MSC) son una pequeña población de células estromales presentes en la mayoría de los tejidos conectivos adultos, como la médula ósea, el tejido graso y la sangre del cordón umbilical. Las CMM se mantienen en un estado relativo de inactividad in vivo pero, en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos, son capaces de proliferar y luego diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos u otros linajes de tipo mesodermo como las células del músculo liso (LMC) y cardiomiocitos. Múltiples redes de

señalización orquestan las MSC que se diferencian en linajes mesenquimales funcionales, entre los cuales el TGF- β 1 ha surgido como un actor clave (revisado, por ejemplo, por Zhao y Hantash (2011. Vitam Horm 87: 127-41).

[0591] De manera similar, las células madre hematopoyéticas sanguíneas son necesarias para la producción de células sanguíneas de por vida; para evitar el agotamiento, la mayoría de las células madre hematopoyéticas permanecen inactivas durante la hematopoyesis en estado estable. Sin embargo, durante el estrés hematológico, estas células se reclutan rápidamente en el ciclo celular y experimentan una amplia autorrenovación y diferenciación para satisfacer el aumento de las demandas hematopoyéticas. TGF β 1 puede funcionar como el "interruptor" para controlar la transición/equilibrio de quiescencia-repoblación.

[0592] Por lo tanto, los inhibidores selectivos de isoformas de TGF β 1 pueden usarse en el tratamiento de afecciones que involucran defectos de células madre hematopoyéticas e insuficiencia de la médula ósea. En algunas formas de realización, tales afecciones son trastornos de reparación del ADN caracterizados por insuficiencia progresiva de la médula ósea. En algunas formas de realización, tal condición está causada por el desgaste de las células madre y progenitoras. En algunas formas de realización, tales afecciones están asociadas con anemia. En algunas formas de realización, tal condición es Anemia de Fanconi (AF). En algunas formas de realización, tales afecciones se caracterizan por una ruta de TGF β hiperactiva que suprime la supervivencia de ciertos tipos de células tras el daño del ADN. Por tanto, se contempla que los inhibidores selectivos de isoformas de TGF β 1 pueden usarse para rescatar defectos de proliferación de células madre hematopoyéticas AF y/o insuficiencia de la médula ósea en sujetos con AF. Véase, por ejemplo, zhang et al. (2016), Cell Stem Cell, 18: 668-681, "TGF- β inhibition rescues hematopoietic stem cell defects and bone marrow failure in Fanconi Anemia".

Condiciones que implican una disregulación hematopoyética inducida por el tratamiento

[0593] Se reconoce que ciertos medicamentos que están diseñados para tratar diversas enfermedades, a menudo inducen o exacerban la anemia en el paciente que está siendo tratado (p. ej., anemia inducida por el tratamiento o por fármacos, como la anemia inducida por quimioterapia y anemia inducida por radioterapia). En algunas formas de realización, el paciente es tratado con un fármaco mielosupresor que puede provocar efectos secundarios que incluyen anemia. Tal paciente puede beneficiarse de la inhibición farmacológica de TGF β 1 con el fin de estimular la hematopoyesis. En algunas formas de realización, el inhibidor de TGF β 1 puede promover la hematopoyesis en pacientes evitando la entrada en un estado inactivo. En algunas formas de realización, el paciente puede recibir una terapia con G-CSF (p. ej., Filgrastim).

[0594] Por consiguiente, un inhibidor selectivo de isoformas de TGF β 1, como los descritos en este documento, puede administrarse a pacientes que reciben terapia mielosupresora (p. ej., terapia con efectos secundarios que incluyen efectos mielosupresores). Algunos ejemplos de terapias mielosupresoras incluyen, entre otros: peginterferón alfa-2a, interferón alfa-n3, peginterferón alfa-2b, aldesleucina, gemtuzumab ozogamicina, interferón alfacon-1, rituximab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, alemtuzumab, bevacizumab, L-Fenilalanina, bortezomib, cladribina, carmustina, amsacrina, clorambucilo, raltitrexed, mitomicina, bexaroteno, vindesina, floxuridina, tioguanina, vinorelbina, dexrazoxano, sorafenib, estreptozocina, gemcitabina, tenipósido, albiplaca, epirudidomido, fluorouracilo, propiltiouracilo, pentostatina, metotrexato, carbamazepina, vinblastina, linezolid, imatinib, clofarabina, pemetrexed, daunorubicina, irinotecan, metimazol, etopósido, dacarbazina, temozolomida, tatinolimulina, docamonicina, aclotolimulina, busulfán, topotecán, mercaptopurina, talidomida, melfalán, fludarabina, flucitosina, capecitabina, procarbazona, trióxido de arsénico, idarubicina, ifosfámid, mitoxantrona, lomustina, paclitaxel, docetaxel, dasatinib, decitabina, nelarabina, everolimus, vorinostat, tiotepa, ixabeumabona, belinostat, trastinustina, bendamustina, cabazitaxel, eribulina, ruxolitinib, carfilzomib, tofacitinib, ponatinib, pomalidomida, obinutuzumab, fosfato de tedizolid, blinatumomab, ibrutinib, palbociclib, olaparib, dinutuximab y colchicina.

[0595] Las indicaciones adicionales relacionadas con TGF β pueden incluir cualquiera de las descritas en la publicación de EE. UU. N° 2013/0122007, patente de EE. UU. N° 8.415.459 o Pub. Internacional. N° WO2011/151432.

[0596] Anticuerpos, porciones de unión a antígeno de los mismos, y composiciones de la descripción pueden ser utilizadas para tratar una amplia variedad de enfermedades, trastornos y/o condiciones asociadas con TGF β 1 de señalización. En algunos casos, los tejidos/células diana expresan preferentemente la isoforma TGF β 1 sobre las otras isoformas. Por lo tanto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención, para su uso en métodos para tratar tal condición asociada con la expresión de TGF β 1 (p. ej., disregulación de la señalización de TGF β 1 y/o regulación positiva de la expresión de TGF β 1).

[0597] En algunas formas de realización, la enfermedad implica TGF β 1 asociado con (p. ej., presentado o depositado desde) fuentes celulares múltiples. En algunas formas de realización, dicha enfermedad implica tanto un componente inmunitario como un componente de ECM de la función del TGF β 1. En algunas formas de realización, dicha enfermedad implica: i) disregulación de la ECM (p. ej., sobreproducción/deposición de componentes de ECM como colágenos y proteasas; rigidez alterada del sustrato de ECM; activación o diferenciación anormal o patológica de fibroblastos, como miofibroblastos, fibrocitos y CAF); ii) inmunosupresión debida al aumento de Tregs y/o células T efectoras suprimidas (Teff), por ejemplo, relaciones elevadas de Treg/Teff; aumento del infiltrado de leucocitos (p. ej., macrófagos y MDSC) que provoca la supresión de las células T CD4 y/o CD8; y/o iii) activación, diferenciación y/o reclutamiento anormales o

patológicos de células mieloides, tales como macrófagos (p. ej., monocíticos/macrófagos derivados de la médula ósea y macrófagos residentes en tejidos), monocitos, células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), neutrófilos, células dendríticas y células NK.

5 **[0598]** En algunas formas de realización, la condición implica TGFβ1 presentado por más de un tipo de moléculas que presentan (p. ej., dos o más de: GARP, LRRC33, LTBP1 y/o LTBP3). En algunas formas de realización, tejidos/órganos/células afectados que incluyen TGFβ1 de múltiples fuentes celulares. Para dar solo un ejemplo, un tumor sólido (que también puede incluir una enfermedad proliferativa que afecte a la médula ósea, por ejemplo, mielofibrosis y mieloma múltiple) puede incluir TGFβ1 de múltiples fuentes, como las células cancerosas, las células estromales, las
10 células sanas circundantes. y/o infiltración de células inmunitarias (p. ej., leucocitos CD45+), que involucran diferentes tipos de moléculas presentadoras. Las células inmunitarias relevantes incluyen, pero no se limitan a células mieloides y células linfoides, por ejemplo, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos (p. ej., células B, células T y células NK) y monocitos. Los inhibidores de TGFβ1 independientes del contexto pueden ser útiles para tratar tales afecciones.

15 **[0599]** Los ejemplos no limitantes de afecciones o trastornos que se pueden tratar con inhibidores independientes del contexto específicos a isoformas de TGFβ1, tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos en este documento, se proporcionan a continuación.

Régimen de tratamiento, administración

20 **[0600]** Para practicar el método descrito en este documento, se puede administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica descrita anteriormente a un sujeto (p. ej., un ser humano) que necesite el tratamiento a través de una vía adecuada, como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, inhalatoria o tópica. Los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluidos los
25 nebulizadores de chorro y los nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. Alternativamente, los anticuerpos, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 se pueden aerosolizar usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalado como un polvo liofilizado y molido.

[0601] El sujeto a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede ser un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas. Un sujeto humano que necesita el tratamiento puede ser un paciente humano que tiene, está en riesgo o se sospecha que tiene una indicación relacionada con TGFβ, como las indicadas anteriormente. Un sujeto que tiene una indicación relacionada con TGFβ puede identificarse mediante un examen médico de rutina, por ejemplo, pruebas de laboratorio, pruebas funcionales de órganos, tomografías computarizadas o ecografías. Un sujeto sospechoso de tener alguna de estas indicaciones puede mostrar uno o más síntomas de la indicación. Un
35 sujeto en riesgo para la indicación puede ser un sujeto que tenga uno o más de los factores de riesgo para esa indicación.

[0602] Como se usa en este documento, los términos "cantidad eficaz" y "dosis efectiva" se refieren a cualquier cantidad o dosis de un compuesto o composición que es suficiente para cumplir su finalidad prevista, es decir, una respuesta biológica o medicinal deseada en un tejido o sujeto con una relación beneficio/riesgo aceptable. Por ejemplo, en ciertas
45 formas de realización de la presente invención, el propósito pretendido puede ser inhibir la activación de TGFβ-1 in vivo, para lograr un resultado clínicamente significativo asociado con la inhibición de TGFβ-1. Las cantidades efectivas varían, como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la condición física, el tamaño, el sexo y el peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del médico. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden abordar sin más que experimentación rutinaria. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el juicio médico sólido. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, psicológicas o virtualmente por cualquier otra razón.

55 **[0603]** Las consideraciones empíricas, tales como la vida media, contribuirán generalmente a la determinación de la dosis. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunológico humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, pueden usarse para prolongar la vida media del anticuerpo y para prevenir que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmunológico del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse durante el curso de la terapia, y generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso de una indicación relacionada con TGFβ. Alternativamente, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación continua sostenida de un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1. Varias formulaciones y dispositivos para lograr una liberación sostenida serían evidentes para el experto en la técnica y están
60 dentro del alcance de esta descripción.

[0604] En un ejemplo, las dosificaciones para un anticuerpo como se describe en el presente documento se pueden determinar empíricamente en individuos que han recibido una o más de administración(es) del anticuerpo. Los individuos reciben dosis incrementales del antagonista. Para evaluar la eficacia, se puede seguir un indicador de la indicación relacionada con TGFβ. Por ejemplo, los métodos para medir el daño de las miofibras, la reparación de las miofibras, los niveles de inflamación en el músculo y/o los niveles de fibrosis en el músculo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0605] La presente descripción abarca el reconocimiento de que agentes capaces de modular el paso de activación de TGFβ de una manera isoforma específica puede proporcionar perfiles de seguridad mejorada cuando se usan como un medicamento. En consecuencia, la invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se define en las reivindicaciones que se unen e inhiben específicamente la activación de TGFβ1, pero no TGFβ2 o TGFβ3, lo que confiere inhibición específica de la señalización de TGFβ1 in vivo mientras se minimizan los efectos secundarios no deseados que afectan la señalización de TGFβ2 y/o TGFβ3.

[0606] En algunas formas de realización, los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento, no son tóxicos cuando se administran a un sujeto. En algunas formas de realización, los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento, exhiben una toxicidad reducida cuando se administran a un sujeto en comparación con un anticuerpo que se une específicamente a TGFβ1 y TGFβ2. En algunas formas de realización, los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, exhiben toxicidad reducida cuando se administra a un sujeto en comparación con un anticuerpo que se une específicamente a TGFβ1 y TGFβ3. En algunas formas de realización, los anticuerpos o partes de unión de antígeno de los mismos, como se ha descrito en este documento, exhiben una toxicidad reducida cuando se administra a un sujeto en comparación con un anticuerpo que se une específicamente a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3.

[0607] En general, para la administración de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, una dosis candidata inicial puede ser de aproximadamente 1-20 mg/kg por administración, por ejemplo, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc. Por ejemplo, los pacientes pueden recibir una inyección de aproximadamente 1-10 mg/kg cada 1 semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas, o cada 4 semanas, etc, en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad (p. ej., cáncer) en donde la cantidad se tolera bien (dentro de las toxicidades o eventos adversos aceptables).

[0608] Para los fines de la presente descripción, una dosis típica (por administración, tal como una inyección y la infusión) puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a 30 mg/kg, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes para aliviar una indicación relacionada con TGFβ, o un síntoma de la misma. Por ejemplo, la dosis eficaz adecuada para Ab6 puede estar entre 1 mg/kg y 30 mg/kg (p. ej., 1-10 mg/kg, 1-15 mg/kg, 3-20 mg/kg, 5-30 mg/kg, etc.) dos veces por semana, una vez a la semana, cada dos semanas, cada 4 semanas o una vez al mes. La dosis eficaz adecuada para Ab6 incluye, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, dosificación semanalmente.

[0609] Un ejemplo de régimen de dosificación comprende la administración de una dosis inicial, seguido de una o más de las dosis de mantenimiento. Por ejemplo, una dosis inicial puede estar entre aproximadamente 1 y 30 mg/kg, por ejemplo, una vez a la semana o dos veces a la semana. A partir de entonces, la dosis de mantenimiento puede seguir, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg, por ejemplo, una vez a la semana, cada dos semanas, una vez al mes, etc. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de deterioro farmacocinético que el médico desea lograr. Los experimentos de farmacocinética han demostrado que la concentración sérica de un anticuerpo descrito en este documento (p. ej., Ab3) permanece estable durante al menos 7 días después de la administración a un modelo animal preclínico (p. ej., un modelo de ratón). Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, esta estabilidad posterior a la administración puede ser ventajosa ya que el anticuerpo puede administrarse con menos frecuencia mientras se mantiene una concentración sérica clínicamente efectiva en el sujeto al que se administra el anticuerpo (p. ej., un sujeto humano). En algunas formas de realización, la frecuencia de dosificación es una vez a la semana, cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas o cada 10 semanas; o una vez al mes, cada 2 meses o cada 3 meses o más. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluido el anticuerpo utilizado) puede variar con el tiempo.

[0610] En algunas formas de realización, para un paciente adulto de peso normal, se pueden administrar dosis que varían de aproximadamente 0,3 a 5,00 mg/kg. El régimen de dosificación particular, por ejemplo, dosis, tiempo y repetición, dependerá del individuo en particular y del historial médico de ese individuo, así como de las propiedades de los agentes individuales (como la vida media del agente y otras consideraciones relevantes).

[0611] Las concentraciones en suero del anticuerpo selectivo de isoformas de alta afinidad que son terapéuticamente eficaces para tratar una indicación relacionada con TGFβ1 de acuerdo con la presente descripción pueden ser al menos aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 10 µg/mL y 1,0 mg/mL. En algunas formas de realización, las cantidades efectivas del anticuerpo medidas por concentraciones séricas son aproximadamente 20-400

µg/ml. En algunas formas de realización, las cantidades efectivas del anticuerpo medidas por concentraciones séricas son aproximadamente 100-800 µg/.

[0612] Para los fines de la presente descripción, la dosificación apropiada de un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1, y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 dependerá del anticuerpo específico (o composiciones de los mismos) empleado, el tipo y gravedad de la indicación, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al antagonista, y la discreción del médico tratante. En algunas formas de realización, un médico administrará un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1, hasta que se alcanza la dosis que logra el resultado deseado. Administración de un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 puede ser continuo o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1 y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 puede ser esencialmente continuo durante un período preseleccionado de tiempo o puede estar en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después de desarrollar una indicación relacionada con TGFβ.

[0613] Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto, que tiene una indicación relacionada con TGFβ, un síntoma de la indicación, o una predisposición hacia la indicación, con el propósito de curar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar la indicación, el síntoma de la indicación o la predisposición hacia la indicación.

[0614] Aliviar una indicación relacionada con TGFβ con un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGFβ1, un complejo de LTBP1-TGFβ1, un complejo de LTBP3-TGFβ1, y/o un complejo de LRRC33-TGFβ1 incluye retrasar el desarrollo o progresión de la indicación, o reducir la gravedad de la indicación. Aliviar la indicación no requiere necesariamente resultados curativos. Tal como se utiliza allí, "retrasar" el desarrollo de una indicación asociada con una indicación relacionada con TGFβ significa aplazar, obstaculizar, ralentizar, retrasar, estabilizar y/o posponer la progresión de la indicación. Este retraso puede ser de diferente duración, dependiendo del historial de la indicación y/o de las personas a las que se esté tratando. Un método que "retrasa" o alivia el desarrollo de una indicación, o retrasa el inicio de la indicación, es un método que reduce la probabilidad de desarrollar uno o más síntomas de la indicación en un período de tiempo determinado y/o reduce la extensión de los síntomas en un período de tiempo determinado, en comparación con no utilizar el método. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, utilizando un número suficiente de sujetos para dar un resultado estadísticamente significativo.

[0615] Los ratones DBA2/J tienen una delección de 40 pb en el alelo LTBP4. La desregulación de la ECM a la que está asociado el TGFβ1 latente puede exponer el epítipo al que se une Ab1. Puede haber enfermedades en las que el epítipo al que se une Ab1 quede expuesto, y esas enfermedades pueden ser oportunidades terapéuticas para Ab1 si está indicada la inhibición de TGFβ1.

Terapia de combinación

[0616] La divulgación abarca además composiciones farmacéuticas y métodos relacionados usados como terapias de combinación para tratar sujetos que pueden beneficiarse de la inhibición de TGFβ in vivo. En cualquiera de estas formas de realización, dichos sujetos pueden recibir terapias de combinación que incluyen una primera composición que comprende al menos un inhibidor de TGFβ, por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento, junto con una segunda composición que comprende al menos un fármaco terapéutico adicional, destinado a tratar la misma enfermedad o afección clínica o la superposición. La primera y la segunda composiciones pueden actuar ambas sobre el mismo objetivo celular o sobre objetivos celulares discretos. En algunas formas de realización, las composiciones primera y segunda pueden tratar o aliviar el mismo conjunto de síntomas o aspectos de una enfermedad o afección clínica o que se solapan. En algunas formas de realización, las composiciones primera y segunda pueden tratar o aliviar un conjunto separado de síntomas o aspectos de una enfermedad o afección clínica. Para dar solo un ejemplo, la primera composición puede tratar una enfermedad o afección asociada con la señalización de TGFβ, mientras que la segunda composición puede tratar la inflamación o fibrosis asociada con la misma enfermedad, etc. Tales terapias de combinación pueden administrarse junto con otras. La frase "junto con", en el contexto de las terapias de combinación, significa que los efectos terapéuticos de una primera terapia se superponen temporal y/o espacialmente con los efectos terapéuticos de una segunda terapia en el sujeto que recibe la terapia de combinación. Por tanto, las terapias de combinación se pueden formular como una única formulación para la administración concurrente, o como formulaciones separadas, para la administración secuencial de las terapias.

[0617] En formas de realización preferidas, las terapias de combinación producen efectos sinérgicos en el tratamiento de una enfermedad. El término "sinérgico" se refiere a efectos que son mayores que los efectos aditivos (p. ej., mayor eficacia) de cada monoterapia en conjunto.

[0618] En algunas formas de realización, las terapias de combinación que comprenden una composición farmacéutica

descrita en este documento producen una eficacia que es en general equivalente a la producida por otra terapia (como la monoterapia de un segundo agente) pero están asociadas con menos efectos adversos no deseados o una toxicidad menos grave asociada con el segundo agente, en comparación con la monoterapia del segundo agente. En algunas formas de realización, tales terapias de combinación permiten una dosis más baja del segundo agente pero mantienen la eficacia global. Dichas terapias de combinación pueden ser particularmente adecuadas para poblaciones de pacientes en las que se justifica un tratamiento a largo plazo y/o que involucren a pacientes pediátricos.

[0619] Por consiguiente, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y dichas composiciones para su uso en métodos en terapias de combinación para la reducción de la activación de la proteína TGFβ1 y para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones asociadas con la señalización de TGFβ1, como se describe en el presente documento. Por consiguiente, los métodos o las composiciones farmacéuticas comprenden además una segunda terapia. En algunas formas de realización, la segunda terapia puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades o afecciones asociadas con la señalización de TGFβ1. La segunda terapia puede disminuir o tratar al menos un(os) síntoma(s) asociado(s) con la enfermedad específica. Las terapias primera y segunda pueden ejercer sus efectos biológicos mediante mecanismos de acción similares o no relacionados; o una o ambas de las terapias primera y segunda pueden ejercer sus efectos biológicos mediante una multiplicidad de mecanismos de acción.

[0620] Debe entenderse que las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden tener las terapias primera y segunda en el portador mismo farmacéuticamente aceptable o en un vehículo farmacéuticamente aceptable diferente para cada modo de realización descrito. Además, debe entenderse que las terapias primera y segunda pueden administrarse simultánea o secuencialmente dentro de las formas de realización descritas.

[0621] El uno o más anticuerpos de anti-TGFβ o partes de unión de antígenos de los mismos, de la invención puede ser utilizado en combinación con uno o más de los agentes terapéuticos adicionales. Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar con un anticuerpo anti-TGFβ de la invención incluyen, pero no se limitan a: vacunas contra el cáncer, terapias con células inmunitarias diseñadas, quimioterapias, radioterapias, un modulador de un miembro de la superfamilia de TGFβ, como un inhibidor de miostatina y un inhibidor de GDF11; un agonista de VEGF; un agonista de IGF1; un agonista de FXR; un inhibidor de CCR2; un inhibidor de CCR5; un inhibidor dual CCR2/CCR5; Inhibidor de CCR4, un inhibidor de lisil oxidasa similar a 2; un inhibidor de ASK1; un inhibidor de acetil-CoA carboxilasa (ACC); un inhibidor de la quinasa p38; Pirfenidona; Nintedanib; un inhibidor de M-CSF (p. ej., antagonista del receptor de M-CSF y agentes neutralizantes de M-CSF); un inhibidor de MAPK (p. ej., un inhibidor de Erk), un agonista o antagonista del punto de control inmunológico; un antagonista de IL-11; y antagonista de IL-6 y similares. Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar con los inhibidores de TGFβ incluyen, pero no se limitan a un inhibidor de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), un inhibidor de la arginasa, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de la quinasa Ser/Thr, un inhibidor de quinasa de doble especificidad. En algunas formas de realización, dicho agente puede ser un inhibidor de PI3K, un inhibidor de PKC o un inhibidor de JAK.

[0622] En algunas formas de realización, el agente adicional es un inhibidor de punto de control. En algunas formas de realización, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de PD-1, un antagonista de PDL1, una proteína de fusión de PD-L1 o PDL2, un antagonista de CTLA4, un agonista de GITR, un anticuerpo anti-ICOS, un anticuerpo anti-ICOSL, un anticuerpo anti-B7H3, un anticuerpo anti-B7H4, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-OX40 (agonista de OX40), un anticuerpo anti-CD27, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-41 BB, un anticuerpo anti-PD-1, un virus oncolítico y un inhibidor de PARP. En algunas formas de realización, el inhibidor independiente del contexto de alta afinidad de la activación de TGFβ1 descrito en el presente documento se usa en el tratamiento del cáncer en un sujeto que responde mal o no responde a una terapia de inhibición de puntos de control, como los enumerados en el presente documento.

[0623] En algunas formas de realización, el agente adicional se une a una molécula de coestimulación de células T, tales como moléculas de coestimulación inhibitorias y moléculas de coestimulación activadoras. En algunas formas de realización, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD40, un anticuerpo anti-CD38, un anticuerpo anti-KIR, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD137 y un anticuerpo anti-CD74.

[0624] En algunas formas de realización, la terapia adicional es radiación. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente quimioterapéutico. En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es Taxol. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente antiinflamatorio. En algunas formas de realización, el agente adicional inhibe el proceso de reclutamiento de monocitos/macrófagos y/o infiltración de tejidos. En algunas formas de realización, el agente adicional es un inhibidor de la activación de las células estrelladas hepáticas. En algunas formas de realización, el agente adicional es un antagonista del receptor de quimiocinas, por ejemplo, antagonistas de CCR2 y antagonistas de CCR5. En algunas formas de realización, tal antagonista del receptor de quimiocinas es un antagonista específico dual, tal como un antagonista CCR2/CCR5. En algunas formas de realización, el agente adicional a administrar como terapia de combinación es o comprende un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento TGFβ o reguladores de los mismos. En algunas formas de realización, dicho agente se selecciona de moduladores (p. ej., inhibidores y activadores) de GDF8/miostatina y GDF11. En algunas formas de realización, tal agente es un inhibidor de la señalización de GDF8/miostatina. En algunas formas de realización, dicho agente es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un complejo de miostatina pro/latente y bloquea la activación de la miostatina. En algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un complejo de miostatina pro/latente y bloquea

la activación de la miostatina no se une a la miostatina madura libre.

[0625] En algunas formas de realización, una terapia adicional comprende la terapia celular, tal como terapia CAR-T.

[0626] En algunas formas de realización, una terapia adicional es una vacuna contra el cáncer. Numerosos ensayos clínicos que probaron vacunas contra el cáncer basadas en péptidos se han dirigido a neoplasias malignas hematológicas (cánceres de la sangre), melanoma (cáncer de piel), cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastroesofágico, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer colorrectal. Los antígenos incluían péptidos de HER2, telomerasa (TERT), survivina (BIRC5) y tumor de Wilms 1 (WT1). Varios ensayos también utilizaron mezclas "personalizadas" de 12-15 péptidos distintos. Es decir, contienen una mezcla de péptidos del tumor del paciente contra los que el paciente presenta una respuesta inmunitaria. Algunos ensayos están dirigidos a tumores sólidos, glioma, glioblastoma, melanoma y cánceres de mama, cuello uterino, ovario, colorrectal y de células no pequeñas de pulmón e incluyen antígenos de MUC1, IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenasa), CTAG1B y dos receptores de VEGF, FLT1 y KDR. En particular, la vacuna IDO1 se prueba en pacientes con melanoma en combinación con el inhibidor del punto de control inmunológico ipilimumab y el inhibidor de BRAF (gen) vemurafenib.

[0627] Los ejemplos no limitantes de tumor antígenos útiles como vacunas contra el cáncer incluyen: NY-ESO-1, HER2, HPV16 E7 (Papillomaviridae N° E7), CEA (antígeno carcinoembrionario), WT1, MART-1, gp100, tirosinasa, URLC10, VEGFR1, VEGFR2, supervivientes, MUC1 y MUC2.

[0628] Las células inmunitarias activadas cebadas por tal vacuna contra el cáncer pueden, sin embargo, excluirse de la TME en parte a través de mecanismos dependientes de TGFβ1. Para superar la inmunosupresión, se puede considerar el uso de inhibidores de TGFβ1 independientes del contexto de alta afinidad de la presente divulgación para liberar el potencial de la vacuna.

[0629] Las terapias de combinación contempladas en este documento pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. En algunas formas de realización, el uso de un inhibidor específico de isoforma de TGFβ1 descrito en el presente documento puede hacer que aquellos que responden mal o no responden a una terapia (p. ej., tratamiento estándar) más receptivos. En algunas formas de realización, el uso de un inhibidor específico de isoforma de TGFβ1 descrito en este documento puede permitir una dosificación reducida de la terapia (p. ej., estándar de atención) que todavía produce una eficacia clínica equivalente en pacientes pero grados menores o menores de toxicidades relacionadas con el fármaco o eventos adversos.

[0630] En algunas formas de realización, los inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1 contemplados en el presente documento pueden usarse en conjunción con (p. ej., terapia de combinación, tratamiento adicional, etc.) un inhibidor selectivo de isoformas de TGFβ3. Tal uso puede comprender además terapia adicional, tal como terapia contra el cáncer, por ejemplo, inhibidor del punto de control inmunológico, vacuna contra el cáncer, radioterapia y/o quimioterapia.

[0631] En algunas formas de realización, los inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1 contemplados en el presente documento pueden usarse en conjunción con (p. ej., terapia de combinación, tratamiento adicional, etc.) un inhibidor selectivo de la miostatina (GDF8).

Diagnóstico, selección de pacientes, monitorización

[0632] Los métodos terapéuticos que incluyen la terapia de inhibición de TGFβ1 pueden comprender el diagnóstico de una indicación de TGFβ1 y/o la selección de pacientes que probablemente respondan a dicha terapia. Además, los pacientes que reciben el inhibidor de TGFβ1 pueden ser monitoreados por los efectos terapéuticos del tratamiento, que típicamente implica medir uno o más parámetros adecuados que son indicativos de la condición y que pueden medirse (p. ej., ensayarse) antes y después del tratamiento y evaluar los cambios en los parámetros relacionados con el tratamiento. Por ejemplo, tales parámetros pueden incluir niveles de biomarcadores presentes en muestras biológicas recolectadas de los pacientes. Los biomarcadores pueden estar basados en ARN, en proteínas, en células y/o en tejidos. Por ejemplo, los genes que se sobreexpresan en determinadas enfermedades pueden servir como biomarcadores para diagnosticar y/o controlar la enfermedad o la respuesta a la terapia. Las proteínas de la superficie celular de las poblaciones de células asociadas a enfermedades pueden servir como biomarcadores. Dichos métodos pueden incluir las mediciones directas de los parámetros de la enfermedad indicativos de la extensión de la enfermedad en particular, como el tamaño/volumen del tumor. Puede emplearse cualquier método de muestreo adecuado, como muestras de suero/sangre, biopsias y formación de imágenes. La biopsia puede incluir biopsias de tejido (como un tumor) y biopsias líquidas.

[0633] Aunque las biopsias han sido tradicionalmente el estándar para diagnosticar y controlar diversas enfermedades, tales como fibrosis (p. ej., fibrosis de órganos) y trastornos proliferativos (p. ej., cáncer), pueden preferirse alternativas menos invasivas. Por ejemplo, se pueden usar muchas técnicas de formación de imágenes in vivo no invasivas para diagnosticar, controlar y seleccionar pacientes para el tratamiento. Por tanto, pueden usarse técnicas de formación de imágenes in vivo para diagnosticar y/o monitorizar una enfermedad en un paciente o sujeto. En otros casos, se puede usar una técnica de formación de imágenes in vivo para detectar pacientes con una indicación de TGFβ1, como cáncer y

fibrosis. En otros casos, puede usarse una técnica de formación de imágenes in vivo para seleccionar pacientes para el tratamiento con un inhibidor de TGFβ1 específico de isoforma. En algunos casos, tales técnicas pueden usarse para determinar si los pacientes responden a una terapia o cómo responden a ella, por ejemplo, terapia de inhibición de TGFβ1.

[0634] Técnicas de formación de imágenes in vivo de ejemplo utilizadas para los métodos incluyen, pero no se limitan a la radiografía de rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), ecografía médica o de ultrasonido, endoscopia, la elastografía, formación de imágenes táctil, termografía, la fotografía médica. Otras técnicas de imagen incluyen imágenes funcionales de medicina nuclear, por ejemplo, tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Los métodos para realizar estas técnicas y analizar los resultados son conocidos en la técnica.

[0635] Las técnicas de imágenes no invasivas comúnmente utilizadas para diagnosticar y monitorear el cáncer incluyen, pero no se limitan a: imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada (CT), ultrasonido, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), imágenes de reflectancia de fluorescencia (FRI) y tomografía mediada por fluorescencia (FMT). Las plataformas de imágenes híbridas también se pueden usar para diagnosticar y monitorear el cáncer. Por ejemplo, las técnicas híbridas incluyen, pero no se limitan a: PET-CT, FMT-CT, FMT-MRI y PET-MRI. La resonancia magnética con contraste dinámico (DCE-MRI) es otra técnica de imagen que se usa comúnmente para detectar cánceres de mama. Los métodos para realizar estas técnicas y analizar los resultados son conocidos en la técnica.

[0636] Las técnicas de imágenes no invasivas comúnmente utilizadas para diagnosticar y monitorear la fibrosis incluyen, pero no se limitan a: ultrasonido (p. ej., ultrasonido convencional o con contraste mejorado), elastografía de ultrasonido (p. ej., elastografía transitoria, elastografía de onda de corte puntual y elastografía de ondas de corte 2D), tomografía computarizada (p. ej., tomografía computarizada convencional o imágenes de perfusión por tomografía computarizada), imágenes por resonancia magnética (IRM) (p. ej., resonancia magnética convencional, elastografía por resonancia magnética, resonancia magnética ponderada por difusión, ácido gadodámico disódico e imágenes de perfusión por resonancia magnética).

[0637] Las técnicas de imagen no invasivas se pueden utilizar para evaluar los niveles de la fibrosis hepática o la esteatosis hepática. Por ejemplo, las técnicas de diagnóstico por imágenes particularmente útiles para evaluar la fibrosis hepática pueden incluir, entre otras: FibroScan (elastografía transitoria; TE), elastografía de ondas de corte puntual (pSWE; también conocido como impulso de fuerza de radiación acústica (ARFI), SWE 2D-3D, elastografía por resonancia magnética (MRE) y MRI multiparamétrica. Las técnicas de imagen particularmente útiles para evaluar la esteatosis hepática pueden incluir, entre otras: ecografía, elastografía de parámetros de atenuación controlada (CAP), fracción de grasa de densidad de protones estimada por resonancia magnética (MRI-PDFF) y espectroscopia de resonancia magnética (MRS). La técnica de formación de imágenes in vivo se puede utilizar para evaluar la rigidez del hígado. La técnica de formación de imágenes in vivo se puede utilizar para detectar y evaluar los niveles de triglicéridos intrahepáticos. La técnica de imágenes in vivo se puede utilizar para evaluar la nodularidad de la superficie del hígado (LSN; también conocido como "puntuación del hígado"), la rigidez del hígado y/o la relación de volumen segmentario del hígado (LSVR), que son todas beneficiosas en la estadificación de la fibrosis hepática y la cirrosis de subestadificación. Los métodos para realizar estas técnicas y analizar los resultados son conocidos en la técnica.

[0638] Más recientemente, se están desarrollando métodos de imagen no invasivos que permitirán la detección de células de interés (p. ej., células T citotóxicas, macrófagos, MDSCs y las células cancerosas) in vivo. Consulte, por ejemplo, www.imaginab.com/technology/; Tavare et al. (2014) PNAS, 111 (3): 1108-1113; Tavare et al. (2015) J Nucl Med 56 (8): 1258-1264; Rashidian et al. (2017) J Exp Med 214 (8): 2243-2255; Beckford Vera et al. (2018) PLoS ONE 13 (3): e0193832; y Tavare et al. (2015) Cancer Res 76 (1): 73-82. El llamado "rastreo de células T" tiene como objetivo detectar y localizar células T efectoras antitumorales in vivo. Esto puede proporcionar información útil para comprender el fenotipo inmunosupresor de los tumores sólidos. Es probable que los tumores que están bien infiltrados con células T citotóxicas (tumores "inflamados" o "calientes") respondan a las terapias contra el cáncer, como la terapia de bloqueo de puntos de control (TCC). Por otro lado, los tumores con fenotipos inmunosupresores tienden a tener una escasa infiltración de células T incluso cuando existe una respuesta inmunitaria antitumoral. Es probable que estos tumores denominados "inmuno-excluidos" no respondan a las terapias contra el cáncer como la TCC. Las técnicas de rastreo de células T pueden revelar estos diferentes fenotipos y proporcionar información para guiar el enfoque terapéutico que probablemente beneficiaría a los pacientes. Por ejemplo, los pacientes con un tumor "inmuno-excluido" probablemente se beneficien de una terapia con un inhibidor de TGFβ1 para ayudar a revertir el fenotipo inmunosupresor. Se contempla que se puedan usar técnicas similares para diagnosticar y controlar otras enfermedades, por ejemplo, fibrosis. Normalmente, los anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos diseñadas con un resto de detección (p. ej., radiomarcaje, fluorescencia, etc.) se pueden infundir en un paciente, que luego se distribuirá y localizará en los sitios del marcador particular (p. ej., macrófagos M2).

[0639] Técnicas de formación de imágenes no invasivas in vivo se pueden aplicar en una variedad de métodos adecuados para los propósitos de diagnóstico de los pacientes; seleccionar o identificar pacientes que probablemente se beneficien de la terapia con inhibidores de TGFβ1; y/o monitorizar a los pacientes para determinar la respuesta terapéutica tras el tratamiento. Cualquier célula con un marcador de superficie celular conocido puede detectarse/localizarse mediante el empleo de un anticuerpo o moléculas similares que se unen específicamente al marcador celular. Normalmente, las células que se van a detectar mediante el uso de tales técnicas son células inmunitarias, como linfocitos T citotóxicos,

células T reguladoras, MDSC, macrófagos asociados a enfermedades (macrófagos M2 como TAM y FAM), células NK, células dendríticas y neutrófilos.

[0640] Los ejemplos no limitantes de marcadores de células inmunitarias adecuados incluyen marcadores de monocitos, marcadores de macrófagos (p. ej., marcadores de macrófagos M1 y/o M2), marcadores de CTL, marcadores de células inmunitarias supresoras, marcadores MDSC (p. ej., marcadores para G y/o M-MDSC), que incluyen, entre otros: CD8, CD3, CD4, CD11b, CD163, CD206, CD68, CD14, CD15, CD66, CD34, CD25 y CD47.

[0641] En las técnicas de imagen in vivo descritas anteriormente se pueden emplear para detectar, localizar y/o realizar un seguimiento de ciertos MDSCs en un paciente diagnosticado con una enfermedad asociada a TGFβ1, tales como el cáncer y fibrosis. Los individuos sanos tienen una frecuencia baja o nula de MDSC en circulación. Con el inicio o la progresión de dicha enfermedad, pueden detectarse niveles elevados de MDSC circulantes y/o asociadas a la enfermedad. Por ejemplo, se ha informado que las M-MDSC positivas para CCR2 se acumulan en los tejidos con inflamación y pueden causar la progresión de la fibrosis en el tejido (como la fibrosis pulmonar), y se ha demostrado que esto se correlaciona con la expresión de TGFβ1. De manera similar, las MDSC están enriquecidas en varios tumores sólidos (incluido el cáncer de mama triple negativo) y contribuyen en parte al fenotipo inmunosupresor de la TME. Por lo tanto, la respuesta del tratamiento a la terapia de inhibición de TGFβ1 de acuerdo con la presente divulgación se puede controlar localizando o rastreando las MDSC. La reducción o la baja frecuencia de las MDSC detectables suelen indicar beneficios terapéuticos o un mejor pronóstico.

[0642] Se sabe que muchos cánceres humanos causan niveles elevados de MDSC en los pacientes, en comparación con el control sano (revisado, por ejemplo, en Elliott et al. (2017) "Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity" *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, Artículo 86). Estos cánceres humanos incluyen, entre otros: cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, NSCL, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y carcinoma de células renales. Pueden detectarse niveles elevados de MDSC en muestras biológicas tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y muestras de tejido (p. ej., biopsia de tumor). Por ejemplo, la frecuencia o los cambios en el número de MDSC se pueden medir como: porcentaje (%) de PBMC totales, porcentaje (%) de células CD14+, porcentaje (%) de células CD45+; porcentaje (%) de células mononucleares, porcentaje (%) de células totales, porcentaje (%) de células CD11b+, porcentaje (%) de monocitos, porcentaje (%) de MNC no linfocíticas, porcentaje (%) de células KLA-DR, utilizando marcadores de superficie celular adecuados (fenotipo).

[0643] Además, mediante el uso de marcadores de células inmunitarias, en el caso del cáncer, es posible determinar si el tumor tiene un fenotipo inmune-excluidos. Si se determina que el tumor tiene un fenotipo inmuno-excluido, la terapia del cáncer (como CBT) sola puede no ser eficaz porque el tumor carece de suficientes células citotóxicas en el entorno del tumor. Por tanto, una terapia complementaria con un inhibidor de TGFβ1 como los descritos en el presente documento puede reducir la inmunosupresión haciendo que el tumor resistente a la terapia del cáncer sea más sensible a una terapia del cáncer. Se contempla que los marcadores inmunes también podrían usarse para rastrear células inmunitarias en el contexto fibrótico y/o determinar la composición de células inmunitarias del tejido fibrótico (p. ej., para rastrear la presencia de macrófagos y/o miofibroblastos).

[0644] En consecuencia, la invención también incluye un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección relacionada con TGFβ1 que puede comprender las siguientes etapas: i) seleccionar un paciente diagnosticado con una enfermedad o afección relacionada con TGFβ1; y ii) administrar al paciente el anticuerpo o el fragmento en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende la detección de marcadores de enfermedad (p. ej., marcadores de fibrosis o cáncer como se describe en el presente documento), donde opcionalmente la detección comprende un análisis de biopsia, análisis de marcadores de suero y/o formación de imágenes in vivo. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende una técnica de formación de imágenes in vivo como se describe en el presente documento.

[0645] En algunas formas de realización, la enfermedad o afección relacionada con TGFβ1 es una afección fibrótica. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende la detección de células de miofibroblastos, o uno o más marcadores de las mismas. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende la detección de esteatosis hepática, triglicéridos hepáticos, células inmunitarias y/o miofibroblastos. En algunas formas de realización, la detección comprende un análisis de biopsia, análisis de marcadores séricos y/o formación de imágenes in vivo. En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende ultrasonido, elastografía por ultrasonido, tomografía computarizada, resonancia magnética, PET-SPECT, fluorescencia óptica/bioluminiscencia FibroScan (TE), pSWE, 2D-3D SWE, MRE, ecografía, CAP, MRI-PDFF y/o SRA. En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende el marcaje directo o indirecto de células inmunitarias o anticuerpo que se une a un marcador de superficie celular de células inmunitarias. En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo comprende el uso de un trazador.

[0646] En algunas formas de realización, la técnica de formación de imágenes in vivo mide la esteatosis hepática, los triglicéridos hepáticos, las células inmunitarias (p. ej., como se describe más adelante), y/o miofibroblastos. En algunas formas de realización, el tratamiento reduce los triglicéridos, la esteatosis, los nódulos en la superficie del hígado, la inflamación y/o los macrófagos en el tejido enfermo. En algunas formas de realización, el tratamiento reduce el contenido

de triglicéridos intrahepáticos a $\leq 5,5\%$. En algunas formas de realización, el tratamiento reduce las MDSC en el tejido enfermo. En algunas formas de realización, el tratamiento reduce los macrófagos en el tejido enfermo. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz es de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg, opcionalmente de 3 mg/kg a 30 mg/kg. En algunas formas de realización, el método comprende además monitorizar al sujeto en busca de una respuesta terapéutica como se ha descrito en este documento (p. ej., triglicéridos reducidos, esteatosis reducida, nódulos de superficie hepática reducidos, inflamación reducida, macrófagos reducidos y/o puntuación hepática reducida).

[0647] En algunas formas de realización, la formación de imágenes in vivo se lleva a cabo para el control de una respuesta terapéutica a la terapia de inhibición de TGF β 1 en el sujeto. La formación de imágenes in vivo puede comprender cualquiera de las técnicas de formación de imágenes descritas en este documento y medir cualquiera de los marcadores y/o parámetros descritos en este documento. Por ejemplo, en el caso de fibrosis hepática, la respuesta terapéutica puede comprender reducción de la esteatosis hepática, reducción del contenido de triglicéridos, reducción de la deposición/fibrosis de ECM, reducción de la cirrosis y/o reducción de la progresión de la enfermedad. En algunas formas de realización, el tratamiento con un inhibidor de TGF β 1 específico de isoforma como se describe en el presente documento reduce el contenido de triglicéridos intrahepáticos a niveles de $\leq 5,5\%$ medido por resonancia magnética. En el caso del cáncer, la respuesta terapéutica puede comprender la conversión de un tumor inmuno-excluido en un tumor inflamado (que se correlaciona con un aumento de la infiltración de células inmunitarias en un tumor), una reducción del tamaño del tumor y/o una reducción de la progresión de la enfermedad. El aumento de la infiltración de células inmunitarias puede visualizarse mediante un aumento de la frecuencia de las células inmunitarias intratumorales o el grado de señales de detección, como el radiomarcaje y la fluorescencia.

[0648] En algunas formas de realización, la formación de imágenes el vivo comprende el seguimiento o localización de las células de LRRC33-positivos. Las células de LRRC33 positivos incluyen, por ejemplo, MDSC y macrófagos de tipo M2 activados (p. ej., TAM y macrófagos activados asociados con tejidos fibróticos). Por ejemplo, las células de LRRC33 positivos pueden enriquecerse en un sitio de la enfermedad (como tejidos fibróticos y tumores sólidos) en la línea de base. Tras la terapia (p. ej., terapia con inhibidor de TGF β 1), se pueden observar menos células que expresan LRRC33 de la superficie celular, según se mide por la intensidad reducida del marcador (tal como radioisótopo y fluorescencia), indicativo de efectos terapéuticos.

[0649] En algunas formas de realización, las técnicas de formación de imágenes in vivo descritas en el presente documento pueden comprender el uso de PET-SPECT, MRI y/o fluorescencia óptica/bioluminiscencia con el fin de detectar células de interés.

[0650] En algunas formas de realización, el etiquetado de anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos con un resto de detección pueden comprender el marcado directo o marcado indirecto.

[0651] En algunas formas de realización, el resto de detección puede ser un trazador. En algunas formas de realización, el trazador puede ser un radioisótopo, en donde opcionalmente el radioisótopo puede ser un isótopo emisor de positrones. En algunas formas de realización, el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en: ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{18}F y ^{89}Zr .

[0652] Por tanto, tales métodos pueden emplearse para realizar imágenes in vivo con el uso de anticuerpos marcados en inmuno-PET.

[0653] En consecuencia, la invención también incluye un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, para su uso en un método para tratar una indicación de TGF β 1 en un sujeto, que incorpora un paso de diagnóstico, selección del paciente y/o seguimiento de los efectos terapéuticos, que emplea una técnica de imagen. El tratamiento comprende la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo o el fragmento para tratar la indicación, y puede comprender además un paso de monitorización de los efectos terapéuticos en el sujeto mediante formación de imágenes in vivo. Opcionalmente, el sujeto puede seleccionarse como candidato para recibir la terapia inhibidora de TGF β 1, usando un paso de diagnóstico o selección que comprende la obtención de imágenes in vivo. La indicación de TGF β 1 puede ser un trastorno proliferativo (como cáncer con un tumor sólido y mielofibrosis) o un trastorno fibrótico (como fibrosis de órganos).

[0654] En algunas formas de realización, el sujeto tiene cáncer, en donde el método comprende las siguientes etapas: i) la selección de un paciente diagnosticado con cáncer que comprende un tumor sólido, en donde el tumor sólido es o se sospecha que es un tumor inmuno-excluido; y ii) administrar al paciente un anticuerpo o el fragmento incluido en el presente documento en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. Preferiblemente, el paciente ha recibido o es un candidato para recibir una terapia contra el cáncer, como terapias de inhibición de puntos de control inmunológico (p. ej., anticuerpos PD-(L)1), quimioterapias, terapias de radiación, terapias con células inmunitarias diseñadas y terapias con vacunas contra el cáncer. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende la detección de células inmunitarias o uno o más marcadores de las mismas, en donde opcionalmente la detección comprende un análisis de biopsia tumoral, análisis de marcadores de suero y/o formación de imágenes in vivo. En algunas formas de realización, el paso de selección (i) comprende una técnica de formación de imágenes in vivo como se describe aquí. En algunas formas de realización, el método comprende además monitorizar una respuesta terapéutica como se describe en el presente documento.

Ensayos para detectar grandes complejos latentes (LLC)

5 **[0655]** Los métodos y composiciones proporcionadas en este documento pueden relacionarse con un método para detectar un complejo de GARP-TGF β 1, un complejo de LTBP1-TGF β 1, un complejo de LTBP3-TGF β 1 y/o un complejo de LRRC33-TGF β 1 en una muestra obtenida de un sujeto. Como se usa en este documento, un "sujeto" se refiere a un organismo individual, por ejemplo, un mamífero individual. En algunos casos, el sujeto es un ser humano. En algunos casos, el sujeto es un mamífero no humano. En algunos casos, el sujeto es un primate no humano. En algunos casos, el sujeto es un roedor. En algunos casos, el sujeto es una oveja, una cabra, un ganado, aves de corral, un gato o un perro. En algunos casos, el sujeto es un vertebrado, un anfibio, un reptil, un pez, un insecto, una mosca o un nematodo. En algunos casos, el sujeto es un animal de investigación. En algunos casos, el sujeto es un sujeto no humano modificado genéticamente. El sujeto puede ser de cualquier sexo y en cualquier paso de desarrollo. En algunos casos, el sujeto es un paciente o un voluntario sano.

15 **[0656]** Un método para detectar un complejo de GARP-TGF β 1, un complejo de LTBP1-TGF β 1, un complejo de LTBP3-TGF β 1, y/o un complejo de LRRC33-TGF β 1 en una muestra obtenida de un sujeto puede implicar (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de GARP-TGF β 1, un complejo de LTBP1-TGF β 1, un complejo de LTBP3-TGF β 1 y/o un complejo de LRRC33-TGF β 1 en condiciones adecuadas para unión del anticuerpo al antígeno, si el antígeno está presente en la muestra, formando así complejos de unión; y (b) determinar el nivel del anticuerpo unido al antígeno (p. ej., determinar el nivel de los complejos de unión).

25 **[0657]** La divulgación también proporciona un ensayo de cribado que utiliza complejos TGF β 1 biotinilados latentes inmovilizados sobre una superficie, que permite la activación de TGF β latente por integrinas proporcionando sujeción. En ese sistema también podrían probarse otros activadores que no sean de integrina. La lectura puede realizarse a través de células reporteras u otras respuestas celulares dependientes de TGF β .

Ensayos basados en células para medir la activación de TGF β

30 **[0658]** La activación de TGF β (y la inhibición del mismo por un inhibidor de prueba de TGF β , tal como un anticuerpo) puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la activación de TGF β mediada por integrina se puede utilizar en un ensayo de potencia basado en células, tal como el ensayo del indicador "CAGA12" (p. ej., luciferasa), descrito con más detalle en el presente documento. Como se muestra, tal sistema de ensayo puede comprender los siguientes componentes: i) una fuente de TGF β (recombinante, endógeno o transfectado); ii) una fuente de activador como la integrina (recombinante, endógena o transfectada); y iii) un sistema indicador que responde a la activación de TGF β , como células que expresan receptores de TGF β capaces de responder a TGF β y traducir la señal en una salida legible (p. ej., actividad luciferasa en células CAGA12 u otras líneas celulares indicadoras). En algunas formas de realización, la línea celular indicadora comprende un gen informador (p. ej., un gen de luciferasa) bajo el control de un promotor que responde a TGF β (p. ej., un promotor PAI-1). En algunas formas de realización, ciertos elementos promotores que confieren sensibilidad pueden incorporarse en el sistema indicador. En algunas formas de realización, tal elemento promotor es el elemento CAGA12. Se han descrito líneas de células indicadoras que pueden usarse en el ensayo, por ejemplo, en Abe et al. (1994) Anal Biochem. 216 (2): 276-84. En algunas formas de realización, cada uno de los componentes de ensayo mencionados anteriormente se proporciona de la misma fuente (p. ej., la misma célula). En algunas formas de realización, dos de los componentes de ensayo mencionados anteriormente se proporcionan de la misma fuente y un tercer componente de ensayo se proporciona de una fuente diferente. En algunas formas de realización, los tres componentes del ensayo se proporcionan a partir de diferentes fuentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la integrina y el complejo de TGF β latente (proTGF β y una molécula presentadora) se proporcionan para el ensayo de la misma fuente (p. ej., la misma línea celular transfectada). En algunas formas de realización, la integrina y el TGF se proporcionan para el ensayo a partir de fuentes separadas (p. ej., dos líneas celulares diferentes, una combinación de integrina purificada y una célula transfectada). Cuando se usan células como fuente de uno o más de los componentes del ensayo, dichos componentes del ensayo pueden ser endógenos a la célula, expresarse de manera estable en la célula, transfectarse transitoriamente o cualquier combinación de los mismos.

55 **[0659]** Un experto en la materia podría adaptar fácilmente tales ensayos a diversas configuraciones adecuadas. Por ejemplo, se puede considerar una variedad de fuentes de TGF β . En algunas formas de realización, la fuente de TGF β es una célula que expresa y deposita TGF β (p. ej., una célula primaria, una célula propagada, una célula o línea celular inmortalizada, etc.). En algunas formas de realización, la fuente de TGF β se purifica y/o el TGF β recombinante se inmoviliza en el sistema de ensayo usando medios adecuados. En algunas formas de realización, el TGF β inmovilizado en el sistema de ensayo se presenta dentro de una composición de matriz extracelular (ECM) (p. ej., sustratos o armazones) en la placa de ensayo, con o sin descelulización, que imita al TGF β originado por fibroblastos. En formas de realización preferidas, el sustrato usado en un ensayo de potencia basado en células para medir la activación de TGF β a partir de complejos LTBP1/3-proTGF β 1 comprende fibronectina y/o fibrilina. En algunas formas de realización, el TGF β se presenta en la superficie celular de una célula usada en el ensayo. Además, puede incluirse una molécula presentadora de elección en el sistema de ensayo para proporcionar un complejo de TGF β latente adecuado. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué molécula o moléculas presentadoras pueden estar presentes o expresadas en determinadas células o tipos de células. Usando tales sistemas de ensayo, los cambios relativos en la activación de TGF β en presencia o ausencia de un agente de prueba (tal como un anticuerpo) pueden medirse fácilmente para evaluar los

efectos del agente de prueba sobre la activación de TGF β in vitro. Los datos de ensayos basados en células ejemplares se proporcionan en la sección de Ejemplos a continuación.

- 5 **[0660]** Dichos ensayos basados en células se pueden modificar o adaptar de varias formas dependiendo de la isoforma de TGF β que se esté estudiando, el tipo de complejo latente (p. ej., molécula presentadora) y similares. En algunas formas de realización, una célula conocida por expresar integrina capaz de activar TGF β puede usarse como fuente de integrina en el ensayo. Tales células incluyen células SW480/ β 6 (p. ej., clon 1E7). En algunas formas de realización, las células que expresan integrinas pueden cotransfectarse con un plásmido que codifica una molécula presentadora de interés (como GARP, LRRC33, LTBP (p. ej., LTBP1 o LTBP3), etc.) y un plásmido que codifica una forma proforma de la isoforma de TGF β de interés (tal como proTGF β 1). Después de la transfección, las células se incuban durante un tiempo suficiente para permitir la expresión de los genes transfectados (p. ej., aproximadamente 24 horas), las células se lavan y se incuban con diluciones en serie de un agente de prueba (p. ej., un anticuerpo). A continuación, se agrega una línea celular indicadora (p. ej., células CAGA12) al sistema de ensayo, seguido de un tiempo de incubación apropiado para permitir la señalización de TGF β . Después de un período de incubación (p. ej., aproximadamente 18-20 horas) después de la adición del agente de prueba, se detecta la señal/lectura (p. ej., actividad de luciferasa) utilizando medios adecuados (p. ej., para líneas de células indicadoras que expresan luciferasa, puede utilizarse el reactivo Bright-Glo (Promega)). En algunas formas de realización, la fluorescencia de luciferasa puede detectarse usando un lector de placas BioTek (Synergy H1), con ajustes de ganancia automática.
- 10
- 15
- 20 **[0661]** Los datos demuestran que los anticuerpos ejemplares de la invención son capaces de inhibir selectivamente la activación de TGF β 1 en múltiples contextos.

Ácidos nucleicos

- 25 **[0662]** Los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos y/o las composiciones de la presente divulgación pueden estar codificados por moléculas de ácido nucleico. Dichas moléculas de ácido nucleico incluyen, sin limitación, moléculas de ADN, moléculas de ARN, polinucleótidos, oligonucleótidos, moléculas de ARNm, vectores, plásmidos y similares. La presente divulgación puede comprender células programadas o generadas para expresar moléculas de ácido nucleico que codifican compuestos y/o composiciones de la presente divulgación. En algunos casos, los ácidos nucleicos de la divulgación incluyen ácidos nucleicos con codones optimizados. Los métodos para generar ácidos nucleicos con codones optimizados se conocen en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a los descritos en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.786.464 y 6.114.148.
- 30
- 35 **[0663]** Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Perfiles de unión in vitro

1) Ensayo basado en BLI:

- 40 **[0664]** La afinidad de los anticuerpos anti-TGF β 1 se midió mediante el ensayo Octet® en células proTGF β 1 humanas, mientras que la actividad se midió mediante células reporteras CAGA12 probando la inhibición de proTGF β 1 humano. El protocolo utilizado para medir la afinidad de los anticuerpos a los complejos proporcionados en este documento se resume en la **Tabla 19** a continuación, y en la **Tabla 8** se proporciona una lista resumida de los perfiles de afinidad de los anticuerpos ejemplares de la presente divulgación.
- 45

Tabla 19. Protocolo ejemplar para realizar el ensayo de unión a Octet®

Materiales:	
- Placas negras de polipropileno de 96 pocillos	
- Puntas recubiertas de estreptavidina para Octet®	
- Tampón de cinética de 10X (diluido 1:10 en PBS)	
1. Remoje la cantidad requerida de puntas de estreptavidina en tampón cinético 1X; colocar en la máquina para equilibrar	
2. Cargue la placa de muestra:	
- 200 μ l de tampón o dilución de anticuerpo en cada pocillo	
	a) Columna 1 - línea base (tampón)
	b) Columna 2 - proteína biotinilada (p. ej., sGARP-proTGF β 1 o LTBP1-proTGF β 1); diluido a 5 μ g/mL
	c) Columna 3 - línea base 2 (tampón)
	d) Columna 4 - asociación de anticuerpos para Ab
	e) Columna 5 - asociación de anticuerpos para Ab
	f) Columna 6 - disociación Ab (tampón)
	g) Columna 7 - disociación Ab (tampón)

3. Haga diluciones en la placa de 96 pocillos:
a) Diluya ambos anticuerpos a 50 µg/ml en 300 µl de tampón 1x en la fila A.
b) Añada 200 µl de tampón al resto de cada columna
c) Transfiera 100 µl abajo de la columna para hacer diluciones triples
4. Coloque la placa de muestra en la máquina junto a la placa de puntas.
5. Configure el software
a) Indique tampón, carga, muestra (un ensayo por anticuerpo probado)
b) Indique los pasos del protocolo (línea de base, carga, asociación, disociación) durante períodos de tiempo establecidos:
Línea de base: 60 segundos
Carga: 300 segundos
Línea de base 2: 60 segundos
Asociación: 300 segundos
Disociación: 600 segundos
6. Analice los datos
a) Reste la línea base de la cavidad ciega de referencia
b) Establezca la normalización para que dure cinco segundos de la línea base
c) Alinee a la disociación
d) Analice la asociación y disociación (modelo de unión 1:1, ajuste de curvas)
e) Determine los mejores valores R^2 ; incluir concentraciones con los mejores valores R^2
f) Seleccionar ajuste global
g) Establecer colores de muestras por el tipo de sensor
h) Analizar
Guardar tablar y exportar

5 [0665] Como ejemplo, la unión de Ab6 a los antígenos de TGFβ se midió mediante interferometría de biocapa en un FortéBio Octet Red384 usando placas de poliestireno de 96 pocillos de media área negra (Greiner Bio-One). La unión de Ab6 a factores de crecimiento de TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos maduros, así como a TGFβ1 latente humano, se realizó después de acoplar los antígenos a biosensores de segunda generación (AR2G) reactivos con amina (FortéBio) utilizando el kit de reactivos de segunda generación (AR2G) reactivos con amina (FortéBio) según especificaciones del fabricante. Primero se permitió que los biosensores AR2G se hidrataran en agua fuera de línea durante al menos 10 minutos antes del inicio del experimento. Tras el inicio del experimento, las puntas AR2G se equilibraron en agua durante 1 minuto. A continuación, las puntas se movieron a una solución de activación recién preparada (18 partes de agua, 1 parte de EDC 400 mM (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) y 1 parte de sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida 200 mM)) durante 5 minutos. Se acopló la proteína TGFβ recombinante (10 µg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM pH 5) a las puntas activadas durante 3 minutos antes de inactivar con etanolamina pH 8,5 durante 15 minutos. La línea de base se determinó con una incubación de 20 minutos de las puntas acopladas en tampón EKB (tampón Kinetics (FortéBio) suplementado con BSA al 2% (Sigma), NaCl 0,5 M y Tween-20 al 0,09% (Sigma). Se permitió que las puntas se asociaran en una solución de 15 µg/mL de Ab6 en EKB durante 10 minutos antes de 10 minutos de disociación en EKB. La unión de Ab6 a grandes complejos latentes humanos se midió después de inmovilizar Ab6 a la superficie de biosensores de captura de anti-Fc humano (FortéBio) (1 µg/ml en EKB) durante 5 minutos. A continuación, se realizó una línea de base adicional de 1 minuto antes de la asociación de LTBP1-proTGFβ1, LTBP1-proTGFβ2 o LTBP1-proTGFβ3 (100 nM en EKB) durante diez minutos. Finalmente, se realizó una disociación de diez minutos.

2) Ensayo basado en la titulación de equilibrio de solución:

25 [0666] MSD-SET es una técnica bien caracterizada que puede ser utilizada para la determinación del equilibrio de fase de solución K_D . Los ensayos de equilibrio basados en soluciones, como MSD-SET se basan en el principio de exclusión cinética, en donde se mide la unión del ligando libre en equilibrio en lugar de las tasas de asociación y disociación en tiempo real para determinar la afinidad.

30 [0667] Se llevaron a cabo ensayos de MSD-SET para medir afinidades de los anticuerpos en el equilibrio. Brevemente, cada anticuerpo de prueba se diluyó 3-5 veces y las muestras se mezclaron con antígeno biotinilado en una placa de 48 pocillos. Las muestras de SET se equilibraron durante 20-24 horas a temperatura ambiente. Mientras tanto, se revistió una placa de captura con IgG (20 nM) y se incubó durante la noche a 4°C o 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de un paso de bloqueo con BSA al 5%. Después de lavar la placa de captura tres veces, se agregaron muestras de SET y se incubaron durante 150 segundos. La placa se lavó una vez para eliminar los complejos no unidos. Se añadió 250 ng/ml de SA-Sulfotag y luego se lavó 3 veces. Se añadió tampón de lectura 2X y se leyeron las señales de los complejos enlazados etiquetados con el uso del instrumento QuickPlex™ SQ 120.

40 [0668] Listas resumen de perfiles de afinidad de anticuerpos ejemplares de la presente divulgación como medidos por MSD-SET se proporcionan en las **Tablas 9 y 10** de este documento.

[0669] Como un ejemplo, placas estándar de MSD (MSD) se recubrieron con una solución 20 nM de anticuerpo monoclonal en PBS durante 30 min a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. A continuación, se mezclaron concentraciones crecientes del mismo anticuerpo monoclonal utilizado para el revestimiento con antígeno biotinilado (entre 50 y 400 pM para la unión a Ab6; entre 0,8 y 1,6 nM para la unión a Ab4) durante la noche a temperatura ambiente sin agitar. Después de 20-24 horas de equilibrio, la placa recubierta de anticuerpo se bloqueó con tampón de bloqueo A (MSD) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó con tampón de lavado (PBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween-20) antes de agregar complejos de anticuerpo-antígeno equilibrado en la placa durante exactamente 2,5 minutos. La placa se lavó de nuevo con tampón de lavado antes de añadir 250 ng/ml de reactivo secundario de estreptavidina marcado con SULFO-TAG (MSD) en PBS con BSA al 0,1%. Después de lavar con tampón de lavado, las placas se leyeron en tampón de lectura MSD (MSD) usando el MESO QuickPlex SQ 120 (MSD). Los datos de unión se procesaron mediante ajuste de curva no lineal en el software Prism 7 (Graphpad) para calcular los valores de KD de unión en equilibrio.

Ejemplo 2: Ensayos funcionales para medir la inhibición de activación de TGFβ1 latente

[0670] El desarrollo de nuevos ensayos de potencia basados en células dependientes del contexto de TGFβ1 de activación se describe en el documento WO 2019/023661. Los formatos de ensayo anteriores no pudieron diferenciar entre la activación de proTGFβ1 presentada por moléculas presentadoras endógenas y la activación de proTGFβ1 presentada por LTBP exógenas. Mediante la transfección directa de células que expresan integrinas, los nuevos ensayos descritos en el documento WO 2019/023661, y usados en este documento, establecen una ventana entre la actividad de endógeno-proTGFβ1 presentador y la actividad exógena de LTBP-proTGFβ1. Como los complejos de LTBP-proTGFβ1 están incrustados en la matriz extracelular, el revestimiento de la placa de ensayo también es un componente importante del ensayo. El uso de placas de alta unión, recubiertas con la proteína ECM Fibronectina, hizo que los ensayos de LTBP fueran más robustos.

[0671] Para determinar si los anticuerpos Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5 y Ab6 eran funcionales (p. ej., con potencia inhibidora), se desarrollaron ensayos basados en células, en los que se midió la liberación dependiente de integrina αVβ del factor de crecimiento de TGFβ1 de grandes complejos latentes (LLC). Cada ensayo es específico para cada una de las LLC que comprenden LTBP1, LTBP3, GARP o LRRC33. A través del proceso de desarrollo y optimización del ensayo, se determinó que la fibronectina es una proteína ECM crítica para la activación *in vitro* dependiente de integrina del proTGFβ1 presentado por LTBP.

Ensayo 1. Activación del TGFβ1 latente depositado en el ECM

[0672] Para los ensayos representados en las **FIG. 1A-1B** y **FIG. 2A-2B**, se desarrolló el siguiente protocolo. Este ensayo es óptimo para medir la liberación de TGFβ1 dependiente de integrina a partir de complejos proTGFβ1 latentes asociados a ECM (LTBP1-proTGFβ1 o LTBP3-proTGFβ1).

Materiales:

[0673]

- Células MvLu1-CAGA12 (Clon 4A4)
- Células SW480/β6 (Clon 1E7) (la subunidad αV se expresa endógenamente en niveles altos; la subunidad β6 se sobreexpresa de manera estable)
- Línea celular LN229 (niveles altos de integrina αVβ8 endógena)
- Placa de ensayo de 96 pocillos tratada con TC de pared blanca Costar N° 3903
- Placa de ensayo de 96 pocillos transparente blanco Greiner Bio-One High Binding N° 655094
- Fibronectina humana (Corning N° 354008)
- Pipeta multicanal P200
- P20, Pipetas P200 y P1000 con puntas de filtro estériles para cada una
- Tubos de microcentrifuga estériles y estante
- Depósitos de reactivos estériles
- Azul tripán al 0,4%
- Pipetas estériles de 2 ml, 5 ml, 10 ml y 25 ml
- Placas de 100 mm o 150 mm tratadas con cultivo de tejidos
- Etanol al 70%
- Medio de suero reducido Opti-MEM (Life Tech # 31985-070)
- Lipofectamine 3000 (Life Tech # L3000015)
- Reactivo de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega # E2620)
- Trypsin al 0,25% + EDTA 0,53 mM
- Plásmido de expresión de proTGFβ1, humano
- Plásmido de expresión de LTBP1S, humano
- Plásmido de expresión de LTBP3, humano
- Plásmido de expresión de LRRC32 (GARP), humano
- Plásmido de expresión LRRC33, humano:

Equipo

[0674]

- 5 • Lector de placas BioTek Synergy H1
- Campana TC
- Centrífugadora de mesa
- 10 • Incubadora de CO₂ 37C CO₂ al 5%
- agua 37C/cuentas de baño
- 15 • Agitador de plataforma
- Microscopio
- Hemocitómetro/contador

Definiciones:

[0675]

- 25 • Células CAGA12 4A4: Derivado de células MvLu1 (células epiteliales de pulmón de visón), transfectadas de forma estable con el promotor sintético CAGA12, que impulsa la expresión del gen de luciferasa.
- DMEM-BSA al 0,1%: Medio de ensayo; el medio base es DMEM (Gibco Cat # 11995-065), el medio también contiene BSA diluido al 0,1% p/v, penicilina/estreptomicina y glutamina 4 mM
- D10: DMEM 10% FBS, P/S, glutamina 4 mM, 1% NEAA, 1X GlutaMAX (Gibco Cat # 35050061)
- 30 • SW480/β6 Medio: D10 + 1000ug/mL G-418
- Medio CAGA12 (4A4): D10 + 0,75ug/mL puromicina

Método:

- 35 **[0676]** El día 0, las células se sembraron para transfección. Se separaron células SW480\beta 6 (clon 1E7) con tripsina y sedimento (centrifugado 5 min a 200 x g). El sedimento celular se resuspendió en medio D10 y se contaron las células viables por ml. Las células se sembraron a $5,0 \times 10^6$ células/12 ml/100 mm de placa de cultivo de tejidos. Para las células CAGA12, las células se pasaron a una densidad de 1,0 millón por matraz T75, para usarlas en el ensayo el Día 3. Los cultivos se incubaron a 37°C y CO₂ al 5%.

- 40 **[0677]** En el Día 1, se transfectaron células que expresan integrina. Se siguió el protocolo del fabricante para la transfección con el reactivo Lipofectamine® 3000. Brevemente, los siguientes se diluyeron en OptiMEM™ I, para 125 µl por pocillo: 7,5 µg de ADN (molécula presentadora) + 7,5 µg de ADN (proTGFβ1), 30 µl de P3000 y hasta 125 µl con OptiMEM I. El pocillo fue mezclado pipeteando DNA juntos, después se añadió OptiMEM. Se añadió P3000 y todo se
- 45 mezcló bien pipeteando. Se preparó una mezcla maestra de Lipofectamine3000, para agregarla a las mezclas de ADN: para el ensayo LTBP1: 15 µl de Lipofectamine3000, hasta 125 µl en OptiMEM I, por pocillo; para el ensayo LTBP3: 45 µl de Lipofectamine3000, hasta 125 µl en OptiMEM I, por pocillo. Se añadió Lipofectamine3000 diluido al ADN, se mezcló bien pipeteando y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después de la incubación, la solución se mezcló varias veces pipeteando, y luego se añadieron gota a gota 250 µl de ADN: Lipofectamine3000 (2 X 125 µl) por placa.
- 50 Cada plato se agitó suavemente para mezclar y el plato se devolvió a la incubadora de cultivo de tejidos durante ~24 horas.

- [0678]** En los días 1-2, las placas de ensayo se recubrieron con fibronectina humana. Específicamente, se diluyó fibronectina liofilizada a 1 mg/ml en agua destilada ultrapura (estéril). La solución madre de 1 mg/ml se diluyó hasta 19,2 µg/ml en PBS (estéril). Se agregaron 50 µl/pocillo a la placa de ensayo (alta unión) y se incubaron durante la noche en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C y 5% de CO₂). La concentración final fue de 3,0 µg/cm².

- [0679]** En el Día 2, se sembraron las células transfectadas para el ensayo y la adición de inhibidor. En primer lugar, se lavó el revestimiento de fibronectina añadiendo 200 µl/pocillo de PBS a la solución de fibronectina que ya estaba en la placa de ensayo. Se retira el lavado manualmente con pipeta multicanal. El lavado se repitió durante dos lavados en total. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente con la tapa abierta antes de la adición de las células. A continuación, las células se sembraron separándolas con tripsina y sedimento (centrifugado 5 min a 200 x g). El sedimento se resuspendió en medio de ensayo y las células viables se contaron por ml. Para el ensayo de LTBP1, las células se diluyeron a $0,10 \times 10^6$ células/ml y se siembran 50 µl por pocillo (5.000 células por pocillo). Para el ensayo de LTBP3, las células se diluyeron a $0,05 \times 10^6$ células/ml y semillas de 50 µl por pocillo (2.500 células por pocillo). Para preparar diluciones de anticuerpos funcionales, los anticuerpos se prediluyeron hasta una concentración de trabajo constante en el vehículo. Los anticuerpos

madre se diluyeron en serie en vehículo (PBS es óptimo, evite el tampón de citrato de sodio). Cada punto de dilución en serie se diluyó en medio de ensayo para obtener una concentración final de anticuerpo 4X. Se agregaron 25 µl por pocillo de anticuerpo 4X y se incubaron los cultivos a 37°C y CO₂ al 5% durante ~24 horas.

5 **[0680]** En el Día 3, se añadieron las células reporteras TGFβ. Las células CAGA12 (clon 4A4) para el ensayo se separaron con tripsina y sedimento (centrifugado 5 min a 200 x g). El sedimento se resuspendió en medio de ensayo y se contaron las células viables por ml. Las células se diluyeron a 0,4 x 10⁶ células/ml y se sembraron 50 µl por pocillo (20.000 células por pocillo). Las células se devolvieron a la incubadora.

10 **[0681]** En el Día 4, se leyó el ensayo (16-20 horas después de anticuerpo y/o adición de células reporteras). Se dejó que el reactivo Bright-Glo™ y la placa de prueba alcanzaran la temperatura ambiente antes de la lectura. La configuración de lectura en BioTek® Synergy™ H1 se estableció mediante el protocolo TMLC_std; este método tiene una configuración de ganancia automática. Pozos de control positivo seleccionados para autoescala (alta). Se añadieron 100 µl de reactivo Bright-Glo por pocillo. Se incubó durante 2 minutos con agitación, a temperatura ambiente, placa protegida de la luz. La
15 placa se leyó en BioTek Synergy H1.

[0682] Se midió la inhibición de la activación de LTBP1-proTGBβ1 por Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 o IgG de control en un ensayo indicador LN229 (**FIGS. 1A y 1B**).

20 **[0683]** La inhibición de la activación LTBP3-proTGBβ1 por Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, o control IgG se midió en un ensayo reportero LN229 (**FIGS. 2A y 2B**).

Ensayo II. Activación de TGFβ1 latente presentado en la superficie celular

25 **[0684]** Para los ensayos representados en las **FIGS. 3A-3B** y las **FIGS. 4A-4B**, se desarrolló el siguiente protocolo. Este ensayo, o protocolo de "transfección directa", es óptimo para medir la liberación (activación) dependiente de la integrina de TGFβ1 a partir de complejos proTGBβ1 latentes asociados a células (GARP-proTGBβ1 o LRRC33-proTGBβ1).

Materiales:

30 **[0685]**

- Células MvLu1-CAGA12 (Clon 4A4)
- Células SW480/β6 (Clon 1E7) (la subunidad αV se expresa endógenamente en niveles altos; la subunidad β6 se
35 sobreexpresa de manera estable)
- Línea celular LN229 (niveles altos de integrina αVβ8 endógena)
- Placa de ensayo de 96 pocillos tratada con TC de pared blanca Costar # 3903
- Placa de ensayo blanco µtransparente Greiner Bio-One High Binding de 96 pocillos # 655094
- Fibronectina humana (Corning # 354008)
- 40 • Pipeta multicanal P200
- Pipetas P20, P200 y P1000 con puntas con filtro estéril para cada
- Tubos de microcentrifuga estériles y estante
- Reservas de reactivos estériles
- 0,4% de azul tripan
- 45 • 2 ml, 5 ml, 10 ml, y 25 ml de pipetas estériles
- Placas de tejido tratado de cultivo de 100 mm o 150 mm
- Etanol al 70%
- Medio de suero reducido Opti-MEM (Life Tech # 31985-070)
- Lipofectamine 3000 (Life Tech # L3000015)
- 50 • Reactivo de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega # E2620)
- Tripsina al 0,25% + EDTA 0,53 mM
- Plásmido de expresión proTGFβ1, humano
- Plásmido de expresión de LTBP1S, humano
- Plásmido de expresión de LTBP3, humano
- 55 • Plásmido de expresión de LRRC32 (GARP), humano
- Plásmido de expresión de LRRC33, humano

Equipo:

60 **[0686]**

- Lector de placas BioTek Synergy H1
- Campana de cultivo de tejidos
- Centrifugadora de mesa
- 65 • Incubadora de CO₂, 37°C, 5% de CO₂
- Baño de agua/cuentas a 37°C

- Agitador de plataforma
- Microscopio
- Hemocitómetro/contador

5 Definiciones:

[0687]

- 10
- Células CAGA12 4A4: derivado de células MvLu1 (células epiteliales de pulmón de visón), transfectadas de manera estable con el promotor sintético CAGA12, que impulsa la expresión del gen de luciferasa
 - DMEM-0,1% BSA: medio de ensayo; el medio base es DMEM (Gibco Cat # 11995-065), el medio también contiene BSA diluido al 0,1% p/v, penicilina/estreptomicina y glutamina 4 mM
 - D10: DMEM 10% FBS, P/S, glutamina 4 mM, 1% NEAA, 1X GlutaMAX (Gibco Cat # 35050061)
 - SW480/β6 Medio: D10 + 1.000 ug/mL G-418
- 15
- Medio CAGA12 (4A4): D10 + 0,75 ug/mL puomicina

Métodos:

20 **[0688]** El día 0, células que expresan integrina fueron sembrados para transfección. Las células se separaron con tripsina y se sedimentaron (centrifugado 5 min a 200 x g). Se resuspendió el sedimento celular en medio D10 y se contaron las células viables por ml. Las células se diluyeron a 0,10⁶ células/ml y se sembraron 100 ul por pocillo (10.000 células por pocillo) en una placa de ensayo. Para células CAGA12, pasadas a una densidad de 1,5 millones por matraz de T75, para ser utilizadas para el ensayo en el Día 2. Se incubaron cultivos a 37°C y 5% de CO₂.

25 **[0689]** En el Día 1, se transfectaron células. Se siguió el protocolo del fabricante para la transfección con el reactivo Lipofectamine 3000. Brevemente, se diluyó lo siguiente en OptiMEM I, por 5 ul por pocillo: 0,1 ug de ADN (molécula presentadora) + 0,1 g de ADN (proTGFβ1), 0,4 ul de P3000 y hasta 5 ul con OptiMEM I. El pocillo se mezcló pipeteando ADN juntos, luego agregue OptiMEM. Agregue P3000 y mezcle todo bien pipeteando. Se preparó una mezcla maestra con Lipofectamine3000, para añadirla a las mezclas de ADN: 0,2 ul de Lipofectamine3000, hasta 5 ul en OptiMEM I, por pocillo. Se añadió Lipofectamine3000 diluido al ADN, se mezcló bien pipeteando y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después de la incubación, la solución se mezcló varias veces pipeteando y luego se añadieron 10 ul por pocillo de ADN: Lipofectamine3000 (2 X 5 ul). La placa de células se devolvió a la incubadora de cultivo de tejidos durante aproximadamente 24 horas.

35 **[0690]** En el Día 2, el anticuerpo y TGFβ se añadieron células indicadoras. Para preparar diluciones de anticuerpos funcionales, se diluyó en serie el anticuerpo de reserva en el vehículo (PBS es óptimo). A continuación, cada punto se diluyó en medio de ensayo para una concentración final de anticuerpo 2X. Después de preparar los anticuerpos, la placa de células se lavó dos veces con medio de ensayo, aspirando (aspirador de vacío) seguido de la adición de 100 ul por pocillo de medio de ensayo. Después del segundo lavado, el medio de ensayo se reemplazó con 50 ul por pocillo de anticuerpo 2X. La placa de células se devolvió a la incubadora durante ~15-20 min.

40 **[0691]** Con el fin de preparar las células de CAGA12 (clon 4A4) para el ensayo, las células se separaron con tripsina y se sedimentaron (centrifugado 5 min a 200 x g). El sedimento se resuspendió en medio de ensayo y se contaron las células viables por ml. Las células se diluyeron a 0,3e⁶ células/ml y se sembraron 50 ul por pocillo (15.000 células por pocillo). Las células se devolvieron a la incubadora.

50 **[0692]** El día 3, se leyó el ensayo aproximadamente 16-20 horas después de la adición del anticuerpo y/o la célula informadora. Se dejó que el reactivo Bright-Glo™ y la placa de prueba alcanzaran la temperatura ambiente antes de la lectura. La configuración de lectura en BioTek® Synergy™ H1 se estableció para usar el protocolo TMLC_std; este método tiene una configuración de ganancia automática. Los pocillos de control positivo se establecieron para autoescala (alta). Se añadieron 100 ul de reactivo Bright-Glo por pocillo. Se incubó durante 2min con agitación, a temperatura ambiente, placa protegida de la luz. La placa se leyó en BioTek Synergy H1.

55 **[0693]** La inhibición de la activación de GARP-proTGFβ1 por Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, o control IgG se midió en el ensayo de SW480β6 (**FIG. 3A-3B**). La inhibición de la activación de LRRC33-proTGFβ1 por Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 o control de IgG se midió en el ensayo SW480β6 (**FIG. 4A-4B**).

60 **[0694]** Los ensayos indicadores basados en células utilizados para obtener los datos de la potencia in vitro dentro de la **FIG. 39B** son los siguientes: dos días antes del ensayo, se sembraron 12.500 células LN229 por pocillo en placas de ensayo tratadas con cultivo de tejido de 96 pocillos de paredes blancas. Las células LN229 se transfectaron al día siguiente con plásmidos que codifican proTGFβ1 (ensayo LTBP), proTGFβ1 más GARP (ensayo GARP) o proTGFβ1 más LRRC33 (una construcción quimérica del ectodominio LRRC33 fusionado con dominios citoplasmáticos y transmembrana GARP usando Lipofectamine 3000. Como control para la especificidad de la isoforma de TGFβ1, se transfectaron células LN229 con proTGFβ3, que también es activado por integrinas αV debido a la presencia de una secuencia RGD en su prodominio.

65 Aproximadamente 24 h después, Ab6 se diluyó en serie y se añadió a los transfectantes junto con células reporteras CAGA12 suspendidas en DMEM + BSA al 0,1% (15.000 células por pocillo). Aproximadamente 16-20 horas después de

configurar el cocultivo, el ensayo se desarrolló durante 2 minutos utilizando reactivo BrightGlo y lectura de luminiscencia en un lector de placa. La actividad de luciferasa en presencia de vehículo de anticuerpo determinó una actividad del 100%, y la señal en presencia de 167 nM (25 µg/ml) del anticuerpo 12,7 de panTGFβ de alta afinidad se estableció como una actividad del 0%.

[0695] Las actividades de dosis-respuesta se ajustaron de forma no lineal a un modelo logarítmico de inhibidor frente a respuesta de tres parámetros utilizando Prism 7 y se calcularon los valores de CI50 de mejor ajuste.

[0696] Para probar la inhibición de la activación de TGFβ1 proteolítica, las células reporteras CAGA12 se sembraron en blanco con placas de ensayo bien de luminiscencia de 96 pocillos de paredes blancas (12.500 células por pocillo). Veinticuatro horas más tarde, las células se lavaron con medio de ensayo (DMEM + BSA al 0,1%) y se añadieron Ab6 (2,5 µg/ml) y un pequeño complejo latente proTGFβ1 C4S (1,5 ng/ml) en el medio de ensayo al Células CAGA. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 4 h para permitir la unión del anticuerpo. Después de esta incubación, se añadió calicreína proteasa plasmática humana recombinante (EMD Millipore) a una concentración final de 500 ng/ml. La mezcla de ensayo se incubó con células CAGA durante aproximadamente 18 horas, después de lo cual se leyó la activación de TGFβ1 por bioluminiscencia como se describió anteriormente.

Ejemplo 3: Efectos de anticuerpos independientes del contexto específicos a TGFβ1 sobre la activación inducida por proteasa de TGFβ1 in vitro

[0697] Anteriormente, el solicitante demostró que el Ab3 (un inhibidor de TGFβ1 sesgado por contexto selectivo por isoformas) fue capaz de inhibir tanto la activación dependiente de integrina como independiente de calicreína de TGFβ1 in vitro y en ensayos basados en células/CAGA.

[0698] Para probar la capacidad de Ab6 (un inhibidor de TGFβ1 independiente del contexto, de alta afinidad y selectivo de isoformas) para inhibir la activación dependiente de proteasa de TGFβ1, y para comparar más los efectos de Ab3 y Ab6, se establecieron dos ensayos basados en células/CAGA: i) activación de TGFβ1 dependiente de calicreína y efectos de Ab3 y Ab6; y ii) activación de TGFβ1 dependiente de plasmina y efectos de Ab3 y Ab6.

[0699] Brevemente, las células reporteras CAGA se sembraron 24 horas antes del inicio del ensayo. Se tituló ProTGFβ1-C4S en células CAGA. Se añadió proteasa (Plasma-KLK o Plasmina) a una concentración fija como se indica. La mezcla de ensayo se incubó durante aproximadamente 18 horas. La activación de TGFβ se midió mediante el ensayo de luciferasa.

[0700] En el primer estudio, en presencia de KLK, proTGFβ1 fue activado (control positivo). Esta activación de TGFβ se inhibió eficazmente mediante la adición de Ab3, lo que confirma los resultados anteriores. De manera similar, Ab6 también inhibió la activación de TGFβ1 inducida por calicreína. Estos resultados indican que, además de la activación de TGFβ1 dependiente de integrina, el anticuerpo inhibidor independiente del contexto específico de isoforma (tanto sesgado como insesgado) puede bloquear la activación dependiente de KLK de TGFβ1 in vitro (**FIG. 5A**).

[0701] En el segundo estudio, en presencia de plasmina humana recombinante, proTGFβ1 fue activado (control positivo). Sorprendentemente, esta activación de TGFβ fue inhibida eficazmente sólo por AB6, pero no por Ab3. Estos resultados revelan diferencias funcionales inesperadas entre el inhibidor de contexto sesgado (Ab3) y el inhibidor de contexto sesgado (Ab6) (**FIG. 5B**).

Ejemplo 4: Internalización inducida por anticuerpos de LRRC33-proTGFβ1

[0702] Se observó que entre los tipos celulares que expresan LRRC33 ARN, sólo un subconjunto parece expresar la proteína LRRC33 en la superficie celular. Presumimos que LRRC33 puede estar regulado por el tráfico de proteínas en la membrana plasmática. Para evaluar esta posibilidad, diseñamos ensayos de internalización.

[0703] Una línea celular Expi293 fue generada, la cual expresa LRRC33-proTGFβ1 de superficie celular. Usando el sistema Incucyte, la internalización de LRRC33 sobre la unión Ab6 a la superficie celular LRRC33-proTGFβ1 se midió. Brevemente, el sistema Incucyte emplea un marcador de detección sensible al pH que puede detectarse cuando la diana se internaliza en el compartimento intracelular con un pH ácido (p. ej., lisosoma). Se observó una rápida internalización de LRRC33-proTGFβ1 tras la unión de Ab6 en células que expresan LRRC33 y proTGFβ1 (**FIG. 6**) pero no la línea parental Expi293 (datos no mostrados). La internalización observada aquí fue similar a la internalización en macrófagos humanos primarios.

[0704] La internalización de LRRC33-proTGFβ1 no está mediada por FcR porque las células Expi293 no tienen receptores de Fc (datos no mostrados). Estos resultados indican que la participación de Ab6 puede facilitar la regulación negativa del objetivo. Esto puede proporcionar un mecanismo adicional o alternativo de inhibición de TGFβ1 in vivo, al reducir los niveles de proTGFβ1 disponibles en el sitio de la enfermedad, como TME y FME.

Ejemplo 5: Inhibición de la fibrosis aguda por anticuerpos anti-TGFβ1 Ab3, Ab2, y Ab6 en el modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU) de la fibrosis renal aguda

[0705] La inhibición de la fibrosis aguda por anticuerpos de anti-TGFβ1 se ensayó en el modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO) de fibrosis renal aguda. En este modelo, la fibrosis se induce en ratones machos mediante ligadura quirúrgica permanente del uréter izquierdo el día 0 del estudio. Los ratones tratados de forma simulada, que se sometieron a cirugía pero no tenían los uréteres obstruidos, se incluyeron como control sano en estos experimentos.

[0706] Los anticuerpos de control (IgG) o prueba (Ab3, Ab2, Ab6) se administraron a los ratones mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en los días de estudio 1 y 4. Los riñones fueron recogidos al final del estudio, en el día 5 después de la cirugía, y se extrajo ARN de estos tejidos. El grado de inducción de fibrosis se evaluó posteriormente mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para un panel de genes asociados a la fibrosis, incluidos el colágeno I (*Col1a1*), el colágeno III (*Col3a1*), la fibronectina 1 (*Fn1*), la lisil oxidasa (*Lox*), similar a lisil oxidasa 2 (*Lox12*), actina del músculo liso (*Acta2*), metaloproteasa de matriz (*Mmp-2*), y la integrina alfa 11 (*Itga11*) (Rolfe, Irvine, Grobbelaar, y Linge, 2007) (Tamaki et al., 1994) (Bansal et al., 2017) (Leaf y Duffield, 2016).

Efecto del tratamiento Ab3, Ab2, o Ab6 sobre la expresión génica de colágeno

[0707] *Col1a1* y *Col3a1* son factores clave de fibrosis. *Col1a1* se induce de 10 a 40 veces en los riñones obstruidos y *Col3a1* se regula por incremento de 5 a 25 veces ($P < 0,005$, comparar los ratones tratados con IgG simulada + con el grupo UUO + IgG). Como se muestra en la **FIG. 7A**, los ratones UUO tratados con 3, 10 o 30 mg/kg/sem de Ab3 muestran una expresión reducida de ambos genes de colágeno en comparación con UUO + IgG ($P < 0,05$). El tratamiento con 3 o 10 mg/kg/sem de Ab6 también suprimió la inducción del gen fibrótico por UUO ($P < 0,05$ en comparación con UUO + IgG). Como se muestra en la **FIG. 8A**, el tratamiento con 10 mg/kg/sem de Ab2 suprimió la inducción del gen fibrótico por UUO ($P < 0,005$ en comparación con UUO + IgG). Las muestras del grupo de Ab2 de 3 mg/kg/sem también muestran una tendencia hacia la expresión reducida de *Col3a1*, aunque este efecto no alcanza significación estadística. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la inhibición de TGFβ1 con Ab3, Ab2 o Ab6 mejora de forma potente la inducción de colágeno asociada con UUO.

Efecto del tratamiento con Ab3, Ab2 o Ab6 sobre la expresión génica de fibronectina y lisil oxidasa tipo 2

[0708] *Fn1* y *Lox12* codifican proteínas que desempeñan funciones en la deposición y rigidez de la matriz extracelular en la fibrosis. Como se muestra en las **FIGS. 7B y 8B**, ambos genes están regulados positivamente en muestras del grupo UUO + IgG ($P < 0,005$ frente a simulación + IgG), aunque el aumento de la expresión génica para ambos genes, pero particularmente para *Lox12*, es más pequeño que para los genes del colágeno. En muestras tratadas con 3, 10 o 30 mg/kg/sem de Ab3, observamos una tendencia hacia la reducción de *Fn1* y *Lox12* (frente a UUO + IgG), pero este efecto del tratamiento solo es estadísticamente significativo para la expresión de *Lox12*, y solo en la dosis de 3 mg/kg/sem (*Fn1* a la dosis de 10 mg/kg/sem se acerca a la significación estadística, con $P = 0,07$). Como se muestra en la **FIG. 7B**, el tratamiento con 3 o 10 mg/kg/sem de Ab6, conduce a la inhibición de *Fn1* y *Lox12* ($P < 0,05$ frente a UUO + IgG). Como se muestra en la **FIG. 8B**, una dosis de Ab2 de 3 mg/kg/sem conduce a una reducción tanto de *Fn1* como, en particular, de *Lox12* ($P = 0,06$), aunque la supresión de ninguno de los genes es estadísticamente significativa.

[0709] La **FIG. 9** resume la importancia estadística de los cambios en la expresión génica (frente a UUO + IgG) después del tratamiento en el modelo UUO. Ab3 mostró una reducción en *Col1a1* y *Col3a1* en todas las dosis probadas. También se observaron cambios estadísticamente significativos en *Itga11* y *Lox12* (ambos niveles se redujeron en relación con UUO + IgG), pero solo en la dosis de 3 mg/kg/semana. Por el contrario, todos los genes examinados excepto *Acta2* mostraron un cambio estadísticamente significativo en la expresión (todos los niveles reducidos en relación con UUO + IgG) después del tratamiento con 10 mg/kg/sem de Ab6. Además, todos los genes examinados excepto *Acta2* y *Lox* también mostraron una reducción estadísticamente significativa en ratones tratados con 3 mg/kg/sem de Ab6. Además, todos los genes examinados excepto *Mmp2* mostraron un cambio estadísticamente significativo en la expresión (todos los niveles se redujeron en relación con UUO + IgG) después del tratamiento con 10 mg/kg/sem de Ab2. La expresión de *Col1a1* y *Lox* también se redujo a la dosis de 3 mg/kg/semana.

Ejemplo 9: Efectos de anticuerpos específicos de TGFβ1 en combinación con anticuerpo anti-PD-1 sobre la progresión tumoral en el modelo de melanoma Cloudman S91

[0710] Basado en el reconocimiento de que muchos tumores humanos se caracterizan por el fenotipo: i) un subconjunto responde al bloqueo del eje PD-(L)1; ii) evidencia de exclusión inmunitaria; y, iii) evidencia de expresión de TGFβ1 y señalización de TGFβ, y basándose además en la observación de que los modelos de ratón de inmuno-oncología singénica comúnmente usados no recapitulan el sesgo de TGFβ1 o la resistencia anti-PD-(L)1, los inventores buscaron seleccionar específicamente modelos preclínicos in vivo que presenten perfiles similares a los de los tumores humanos para mejorar la traducibilidad (véase el Ejemplo 17). Teniendo en cuenta estos factores, se seleccionaron modelos in vivo adecuados para realizar estudios de eficacia, incluido el modelo de melanoma **Cloudman S91** descrito en estos estudios.

[0711] Para evaluar los efectos de Ab3 y Ab6 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 para disminuir la progresión del tumor melanoma, se utilizó el modelo de melanoma de ratón **Cloudman S91**.

Cultivo de células tumorales

[0712] Se obtuvieron células de Clon M3 [melanoma de Cloudman S91] (ATCC® CCL-53,1™) de la American Type Culture Collection (ATCC), y se mantuvieron a CR Discovery Services como cultivos en suspensión en crecimiento exponencial en medio F12 de Ham modificado de Kaighn suplementado con suero bovino fetal al 2,5%, suero de caballo al 15%, glutamina 2 mM, 100 unidades/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de gentamicina. Las células tumorales se cultivaron en matraces de cultivo de tejido en un incubador humidificado a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

Implantación y crecimiento tumoral in vivo

[0713] En el día del implante del tumor, cada ratón de prueba de hembra DBA/2 se inyectó por vía subcutánea en el flanco con 5 X 10⁶ células Cloudman S91 en 50% de Matrigel y se controló el crecimiento tumoral. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 125-175 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos de 12 con volúmenes tumorales medios idénticos y se inició la dosificación. Los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibres y el volumen se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = w^2 \times l / 2$$

donde w = ancho y l = longitud, en mm, del tumor. El peso del tumor puede estimarse asumiendo que 1 mg equivale a 1 mm³ de volumen tumoral.

Tratamiento

[0714] Brevemente, los ratones (n=12) portadores de tumores C91 subcutáneos (125-175 mm³) en el Día 1 se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana durante 60 días Ab3 a 10 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg; Ab3 a 30 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg; Ab6 a 3 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg; o Ab6 a 10 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg. El anticuerpo de rata anti-PD-1 de ratón (RMP1-14-rlgG2a, BioXCel) se administró i.p. dos veces por semana a 10 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg durante 60 días.

[0715] El grupo 1 recibió solo anticuerpo anti-PD-1. El grupo 2 recibió Ab3 (10 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. El grupo 3 recibió Ab3 (30 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. El grupo 4 recibió Ab6 (10 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. El grupo 5 recibió Ab6 (30 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. Se utilizó un control sin tratar, no se muestran los datos.

Análisis de punto de llegada y retraso del crecimiento tumoral (TGD)

[0716] Los tumores se midieron usando calibres dos veces por semana, y cada animal fue sometido a eutanasia cuando su tumor alcanzó el volumen de punto final de 2.000 mm³ o al final del estudio (día 60), el que haya sucedido antes. Los ratones que salieron del estudio para el criterio de valoración del volumen tumoral se documentaron como sacrificados por progresión del tumor (TP), con la fecha de la eutanasia. El tiempo hasta el punto final (TTE) para el análisis se calculó para cada ratón de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 2018/129329.

[0717] El porcentaje de retraso en el crecimiento del tumor (% TGD) se define como el aumento de la mediana del tiempo hasta el punto final en un grupo de tratamiento en comparación con el control no tratado, expresado como un porcentaje de la mediana del tiempo hasta el punto final (TTE) del control:

$$T = \text{TTE mediano para el tratamiento}$$

$$C = \text{TTE mediano para el control}$$

$$\%TGD = ((T-C)/C)*100$$

[0718] El tratamiento anti-PD1 dio como resultado un 25% de TGD en comparación con el tratamiento de control de isotipo. Anti-PD1/Ab3 a 10 mg/kg tenía 14% de TGD mientras que Anti-PD1/Ab3 a 30 mg/kg tenía 92% de TGD. La mediana del tiempo hasta el punto final para Anti-PD1/Ab3 a 30 mg/kg fue de 45,8 días en comparación con 29,8 días en el tratamiento con Anti-PD1 solo.

[0719] En un segundo estudio Cloudman S91, el tratamiento de anti-PD-1 resultó en 48% de TGD en comparación con el tratamiento de control de isotipo. Anti-PD-1/Ab3 a 10 mg/kg tenía 122% de TGD mientras que Anti-PD-1/Ab3 a 30 mg/kg tenía 217% de TGD. Anti-PD-1/Ab6 tanto a 10 mg/kg como a 30 mg/kg tenía 217% de TGD. La mediana del tiempo hasta el punto final para Anti-PD-1 fue de 34,6 días, Anti-PD-1/Ab3 a 10 mg/kg fue de 51,7 días y 30 mg/kg hasta el final del estudio a los 74 días. Los anti-PD-1/Ab6 a 10 mg/kg y 30 mg/kg no alcanzaron la mediana de supervivencia al final del estudio a los 74 días.

[0720] Los resultados del estudio muestran que la administración de Ab3 a 30 mg/kg, en combinación con anti-PD-1,

prolongó la supervivencia en los ratones tratados. Como se muestra en la **FIG. 13**, para alcanzar el 50% de supervivencia, los ratones tratados con anti-PD-1/Ab3 a 30 mg/kg tardaron aproximadamente 45 días, mientras que los ratones tratados con Ab3 a 10 mg/kg y PD-1 solo alcanzaron el 50% de supervivencia en menos de aproximadamente 30 días, lo que indica que la inhibición simultánea de PD-1 y TGFβ1 resultó en un beneficio de supervivencia.

[0721] Como se muestra en la **FIG. 14A**, la administración de Ab3 o Ab6 a 10 mg/kg y 30 mg/kg, en combinación con anti-PD1, retrasó el crecimiento tumoral. 8 ratones tratados con PD-1 solo alcanzaron un volumen tumoral de 2000 mm³ (como lo indica la línea de puntos), mientras que solo 6 ratones tratados con anti-PD-1 y Ab3 a 10 mg/kg y 4 ratones tratados con anti-PD-1 y Ab3 a 30 mg/kg alcanzaron un volumen tumoral de 2000 mm³. Solo 3 ratones tratados con anti-PD-1 y Ab6 a 10 mg/kg y 5 ratones tratados con anti-PD-1 y Ab6 a 30 mg/kg alcanzaron un volumen tumoral de 2000 mm³. **FIG. 14B** muestra la mediana de la progresión del tumor después del tratamiento con Ab3 o Ab6 en combinación con el anticuerpo anti-PD-1.

[0722] Un estudio separado S91 se realizó para evaluar el control del tumor eficaz logrado mediante una combinación de anticuerpo anti-PD-1 y Ab6 (a los 3, 10 y 30 mg/kg). Para cuantificar la respuesta antitumoral, el "control efectivo del tumor" en respuesta al tratamiento se definió como el porcentaje de animales dentro de cada grupo de prueba que alcanzaron un volumen tumoral al final del estudio de menos del 25% del umbral de supervivencia de 2000 mm³ (p. ej., volumen del tumor de punto final). Los resultados se resumen a continuación (véanse las **FIGS. 14C, 14E y 14F**).

Tabla 20. Resumen de eficacia Cloudman S91

Grupo de tratamiento	Modelo tumoral Cloudman S91 (control tumoral efectivo: %, N)
Control	0% (0/11)
Monoterapia de anti-PD1	17% (2/12)
Monoterapia con Ab6	0% (0/12)
Anti-PD1/ Ab6, 3 mg/kg	83% (10/12)
Anti-PD1/ Ab6, 10 mg/kg	78% (7/9)
Anti-PD1/ Ab6, 30 mg/kg	73% (8/11)

[0723] Como se muestra en la **FIG. 14C**, la mayoría de los animales que recibieron el tratamiento de combinación en las tres dosis (83%, 78% y 73%, respectivamente) lograron un control tumoral eficaz (p. ej., el volumen del tumor se reduce a 500 mm³ o menos), aunque se reconoce que el modelo Cloudman S91 responde poco al bloqueo de PD-1 como monoterapia, lo que demuestra fuertes efectos sinérgicos de Ab6. Por lo tanto, en el modelo de tumor singénico de ratón que refleja la resistencia primaria humana a la terapia de bloqueo de puntos de control (como anti-PD-(L)1), el tratamiento con Ab6 hizo que los tumores Cloudman S91 (melanoma) fueran vulnerables a la terapia anti-PD1. El tratamiento combinado con Ab6 (tan bajo como 3 mg/kg por semana) y un anticuerpo anti-PD1 dio como resultado una regresión tumoral significativa o un control tumoral eficaz. El retraso sinérgico del crecimiento tumoral logrado aquí indica que los inhibidores de TGFβ1 selectivos de isoformas pueden usarse junto con la terapia de bloqueo del punto de control para el tratamiento de sujetos con un tumor TGFβ1 positivo que es resistencia a la inhibición del punto de control. En los grupos de tratamiento combinado, todas las dosis de Ab6 probadas (3 mg/kg en azul claro; 10 mg/kg en azul oscuro y 30 mg/kg en violeta), junto con anti-PD-1, lograron un control tumoral significativo. (9 de 12, 4 de 9 y 8 de 11, respectivamente). En conjunto, más del 65% de estos animales lograron una reducción del volumen del tumor que es menos del 25% del volumen del tumor del punto final. Los resultados también se mostraron como volumen tumoral medio (**FIG. 14E**). Todos los grupos de tratamiento de combinación (Ab6 a 3, 10 o 30 mg/kg) mostraron efectos antitumorales similares a las dosis probadas, lo que sugiere que en este modelo Ab6 es eficaz a tan solo 3 mg/kg. Esto también se refleja en el beneficio de supervivencia (ver **FIG. 14F**).

[0724] Efectos anti-tumorales duraderos de la inhibición combinada de TGFβ1 y PD-1 fueron examinados por cesar el tratamiento al final del estudio de eficacia descrito anteriormente y extendiéndose para monitorear los cambios en el volumen del tumor en aquellos animales que lograron un control significativo del tumor. Se hizo un seguimiento de los respondedores experimentados con tumores CloudmanS91 de la **FIG. 14C** durante seis semanas sin dosificación (tabla gris). Como se muestra en la **FIG. 14D**, se logró un control prolongado del tumor con la combinación Ab6/anti-PD-1. El número informado es el número de animales con tumores controlados al final del estudio.

[0725] Además, en otro estudio de modelo de tumor S91 en donde Ab6 (al 3 mgk, 10 mgk o 30 mgk por dosis) se evaluó en los animales que fueron tratados con anti-PD1, cables de tratamiento de combinación para beneficio significativo de supervivencia, como se muestra en la **FIG. 14F**. El día 38, todos los animales que recibieron la combinación anti-PD1/Ab6 (30 mgk) sobrevivieron (p. ej., 100% de supervivencia el día 38 en el grupo de dosis de 30 mgk) y ninguno de los animales en los grupos de combinación (3, 10 y 30 mgk) alcanzaron la mediana de supervivencia. Al final del estudio, sobrevivió el 90% de los animales del grupo de tratamiento combinado. Estos datos indican que los inhibidores selectivos de isoformas TGFβ1 como Ab6 pueden usarse para tratar tumores resistentes a la inhibición de puntos de control en sujetos que reciben una terapia de bloqueo de puntos de control para lograr beneficios de supervivencia. Para las **FIGS. 14C-14F**: verde = control de IgG (30 mg/kg semanalmente); naranja = Ab6 (30 mg/kg semanalmente); rojo = anti-PD1 (5 mg/kg dos veces por semana); azul claro = anti-PD1 + Ab6 (3mg/kg); azul oscuro = anti-PD1 + Ab6 (10 mg/kg); violeta = anti-PD1 + Ab6 (30 mg/kg).

[0726] Además, un estudio para evaluar los efectos de Ab2 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 para disminuir la progresión del tumor melanoma se realizó usando el modelo de melanoma de ratón CloudmanS91 (esencialmente como se describe anteriormente). **FIG. 28** muestra la mediana de la progresión del tumor después del tratamiento con Ab3 o Ab2 en combinación con el anticuerpo anti-PD-1. Como se muestra en la **FIG. 28**, la administración de Ab3 o Ab2 a 10 mg/kg y 30 mg/kg, en combinación con anti-PD1, retrasó el crecimiento tumoral.

Ejemplo 11: Efectos de anticuerpos específicos de TGFβ1 en combinación con anticuerpo anti-PD-1 sobre la progresión tumoral en el modelo de ratón de cáncer de vejiga singénico MBT2

[0727] Evaluar la capacidad de Ab3 y Ab6 en combinación con un anti-PD-1 para disminuir la progresión del tumor de carcinoma de vejiga, se utilizó el modelo de ratón de cáncer de vejiga singénico MBT2. Este es un modelo de tumor muy agresivo y de rápido crecimiento, y es muy difícil superar la progresión del tumor con tratamiento farmacológico.

Cultivo de células tumorales

[0728] MBT2 es una línea celular de cáncer de vejiga murino poco diferenciada derivada de un cáncer de vejiga inducido por N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil] formamida trasplantable en una mujer ratón de C3H/He. Las células se cultivaron en Roswell Park Memorial Institute medio (RPMI)-1600 con suero bovino fetal al 10% y 100 µg/ml de estreptomycin en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. El medio de cultivo se reemplazó en días alternos y el subcultivo se realizó cuando la confluencia celular alcanzó el 90%. Las células se recogieron de cultivos subconfluentes mediante tripsinización y se lavaron en medio sin suero. Las suspensiones de células individuales con >90% de viabilidad celular se determinaron mediante exclusión con azul tripán. Las células se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la inyección.

La implantación y el crecimiento tumoral in vivo

[0729] Las células MBT2 usadas para el implante fueron cosechadas durante el crecimiento en fase logarítmica y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El día del implante del tumor, a cada ratón de prueba se le inyectó por vía subcutánea en el flanco 5 X 10⁵ células (0,1 mL de suspensión celular) y se controló el crecimiento del tumor. Cuando los tumores alcanzaron un promedio entre 40-80 mm, 3 ratones fueron aleatorizados en grupos de 15.

[0730] Los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibradores, y el volumen se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

donde w = ancho y l = largo, en mm, del tumor. El peso del tumor puede estimarse asumiendo que 1 mg equivale a 1 mm³ de volumen tumoral.

Tratamiento

[0731] Brevemente, los ratones (n=15) que llevan tumores subcutáneos MBT2 (de 40 a 80 mm³) en el Día 1 se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana durante 29 días Ab3 a 10 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg, Ab3 a 30 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg, Ab6 a 3 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg o Ab6 a 10 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg. El anticuerpo de rata anti-PD-1 de ratón (RMP1-14-rlgG2a, BioXCel) se administró i.p. dos veces por semana a 10 mg/kg en un volumen de dosificación de 10 mL/kg durante 29 días.

[0732] El grupo 1 recibió solo anticuerpo anti-PD-1. El grupo 2 recibió Ab3 (10 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. El grupo 3 recibió Ab3 (30 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. El grupo 4 recibió Ab6 (3mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. El grupo 5 recibió Ab6 (10 mg/kg) en combinación con anticuerpo anti-PD-1. Se utilizó un control no tratado, no mostrado.

Análisis de punto final y retraso del crecimiento tumoral (TGD)

[0733] Se midieron los tumores usando calibradores dos veces por semana, y cada animal se sacrificó cuando su tumor alcanzó el volumen final de 1200 mm³ o al final del estudio. Los ratones que salieron del estudio para el criterio de valoración del volumen tumoral se documentaron como sacrificados por progresión del tumor (TP), con la fecha de la eutanasia. El tiempo hasta el punto final (TTE) para el análisis se calculó para cada ratón de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 2018/129329.

[0734] El anti-PD1/Ab3 a 10 mg/kg tenía 191% de TGD y a 30 mg/kg era 196% de TGD. Anti-PD1/Ab6 a 3 mg/kg fue 68% TGD y a 10 mg/mk fue 196% TGD. La respuesta parcial (RP) debida al tratamiento se define como el volumen del tumor fue del 50% o menos de su volumen del día 1 para tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio e igual o superior a 13,5 mm³ para una o más de estas tres mediciones. En una respuesta completa (CR), el volumen del tumor fue inferior a 13,5 mm³ para tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio. Anti-PD-1/Ab3 a 10 mg/kg tenía 0

PR y 4 CR al final del estudio. Anti-PD-1/Ab3 a 30 mg/kg tenía 1 PR y 1 CR al final del estudio. Anti-PD-1/Ab6 a 3 mg/kg tuvo 0 PR y 3 CR. Anti-PD-1/Ab6 a 10 mg/kg tuvo 0 PR y 5 CR.

[0735] Como se muestra en las **FIGS. 16A y 16B**, la administración de Ab3, tanto en dosis de 10 mg/kg como de 30 mg/kg, en combinación con anti-PD-1, retrasó el crecimiento tumoral. Algunos animales mostraron una regresión completa del tumor. Además, la administración de Ab6, tanto en dosis de 3 mg/kg como de 10 mg/kg, en combinación con anti-PD-1, retrasó el crecimiento tumoral. Algunos animales mostraron una regresión completa del tumor. La mayoría de los ratones tratados con PD-1 solo alcanzaron un volumen tumoral de 1024 mm³ (como lo indica la línea de puntos) entre aproximadamente el día 8 y el día 14, mientras que los ratones tratados con Ab3 a 10 mg/kg, Ab3 a 30 mg/kg, Ab6 a 3 mg/kg, o Ab6 a 10 mg/kg tardaron hasta 28 días en alcanzar un volumen tumoral de 1024 mm³. La **FIG. 16C** muestra la mediana de la progresión del tumor después del tratamiento con Ab3 (arriba a la izquierda) o Ab6 (arriba a la derecha) en combinación con el anticuerpo anti-PD-1. El gráfico inferior resume la mediana del volumen tumoral (mm³) el día 15 en ratones a los que se les administró Ab3 o Ab6, en combinación con anti-PD-1. La mediana del volumen tumoral el día 15 en ratones tratados con Ab3 (10 mg/kg), Ab3 (30 mg/kg) o Ab6 (10 mg/kg), en combinación con anti-PD-1, fue de aproximadamente 500 mm³ o menos, mientras que la mediana del volumen tumoral en el día 15 en ratones tratados con anti-PD-1 solo fue de 1.000 mm³ o más (*gráfico inferior*).

[0736] La **FIG. 16D** destaca la eficacia de Ab6 en MBT2. Se muestra la progresión del tumor en ratones de cinco grupos de tratamiento. Ninguno de los animales que recibieron IgG de control, Ab6 solo o anti-PD-1 solo logró un control tumoral eficaz, definido como el volumen del tumor reducido al 25% o menos del volumen del punto final (mostrado con líneas punteadas inferior y superior, respectivamente). Por el contrario, 12 de 28 animales combinados (~ 43%) que recibieron el tratamiento combinado de Ab6/anti-PD-1 lograron un control eficaz de la turbulencia, lo que indica que la inhibición simultánea de las vías de PD-1 y TGFβ1 puede reducir significativamente (p. ej., retrasar o retroceder) el crecimiento del tumor.

[0737] Por otra parte, el tratamiento de combinación fue efectivo para prolongar la supervivencia en los tres grupos tratados, en comparación con anti-PD-1 solo. Como se muestra en la **FIG. 17**, para alcanzar el 50% de supervivencia, los ratones tratados con Ab3 a 10 mg/kg o Ab6 a 10 mg/kg tardaron más de 28 días, mientras que los ratones tratados con PD-1 solo alcanzaron el 50% de supervivencia en aproximadamente 16 días. En conjunto, estos resultados demuestran el beneficio de supervivencia de la terapia de combinación.

[0738] Además, un estudio de modelo de tumor MBT2 se realizó para evaluar los efectos de Ab3 y Ab2 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 (esencialmente como se describe anteriormente), como se muestra en la **FIG. 19A**, administración de Ab3, tanto en dosis de 10 mg/kg como de 30 mg/kg, en combinación con anti-PD-1 y Ab2 en las dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg, en combinación con anti-PD-1. PD-1, retraso en el crecimiento del tumor en comparación con PD-1 solo. Además, la mayoría de los ratones tratados con PD-1 solo alcanzaron un volumen tumoral de 1024 mm³ (como lo indica la línea de puntos) entre aproximadamente el día 8 y el día 20, mientras que los ratones tratados con Ab3 a 10 mg/kg, Ab3 a 30 mg/kg, Ab2 a 3 mg/kg, o Ab2 a 10 mg/kg llevaron hasta alrededor de 28 días para alcanzar un volumen de tumor de 1024 mm³.

[0739] La **FIG. 19B** es un gráfico que muestra el volumen tumoral medio (mm³) el día 15 en ratones a los que se les administró Ab3 a 30 mg/kg o 10 mg/kg o Ab2 a 3 mg/kg o 10 mg/kg, en combinación con anti-PD1. La mediana del volumen tumoral al día 15 en ratones tratados con Ab3 a 10 mg/kg, Ab3 a 30 mg/kg o Ab2 a 10 mg/kg fue de aproximadamente 700 mm³ o menos, mientras que la mediana del volumen tumoral al día 15 en ratones tratados con Ab2 a 3 mg/kg o PD-1 solo fue de 1.000 mm³ o más.

Resumen de resultados y discusión

[0740] *Efectos sinérgicos de Ab6-anti-PD-1 sobre el crecimiento tumoral:* El descubrimiento de Ab2 y Ab6 permite la evaluación directa de la hipótesis de que la inhibición selectiva de la activación de TGFβ1 será suficiente para superar la resistencia primaria del tumor a CBT. Para las pruebas preclínicas, buscamos identificar modelos de tumores singénicos murinos que recapitulan algunas de las características clave de los tumores humanos que exhiben resistencia primaria a la TCC. Los criterios para la selección del modelo incluyeron 1) poca o ninguna respuesta al tratamiento con un solo agente anti-PD-(L)1 en dosis que han demostrado ser eficaces en otros modelos de tumores singénicos, 2) evidencia de exclusión inmunitaria con escasez de células T CD3+ infiltrantes, 3) evidencia de señalización activa de TGFβ, y 4) evidencia de expresión de isoforma de TGFβ1.

[0741] La exploración de la respuesta tumoral y los datos de perfiles tumorales, incluidos los conjuntos de datos RNAseq disponibles públicamente de ARN derivado del tumor completo, dio como resultado la selección de 3 modelos tumorales que cumplían estos criterios: el modelo de cáncer de vejiga MBT-2 (MBT-2), el modelo de melanoma CloudmanS91 (S91) y el modelo de cáncer de mama EMT-6 (EMT-6). El análisis de los datos de la ARNseq del tumor completo demostró una regulación positiva de los genes de respuesta de TGFβ indicativos de la activación de la vía de TGFβ y una baja expresión de genes de células T efectoras, de acuerdo con un fenotipo inmuno-excluido (**FIG. 25F**). El análisis de los lisados tumorales completos mediante ELISA para sondear la expresión de la proteína de la isoforma de TGFβ total encontró que el factor de crecimiento de TGFβ1 prevalecía en los tres modelos.

- [0742]** Con el fin de evaluar Ab6 en modelos singénicos de ratón, expresamos Ab6 como un anticuerpo quimérico con los dominios V humanos de Ab6 fusionados con dominios constantes de IgG1/kappa de ratón para minimizar la inmunogenicidad. Ab6-mIgG1 tiene una actividad inhibidora similar a la del Ab6 completamente humano. Confirmamos que los animales portadores de tumores MBT-2 son resistentes a anti-PD-1 (RMP1-14) cuando se administran a niveles terapéuticos, así como a Ab6-mIgG1 solo. Sin embargo, en combinación, anti-PD-1 y Ab6-mIgG1 dosificados a 3 mg/kg por semana o 10 mg/kg por semana dieron como resultado reducciones significativas en la carga tumoral, incluidos 21% y 36% de supervivientes sin tumor, respectivamente. así como un beneficio de supervivencia significativo durante la duración de cada estudio (**FIGS. 16D y 17**). En total, 4/14 animales respondieron a anti-PD-1/Ab6-mIgG1 (3mg/kg por semana) y 8/14 respondieron a anti-PD-1/Ab6-mIgG (10 mg/kg por semana) en comparación a 0/13 en anti-PD-1 solo. Observamos respuestas similares en el modelo de melanoma CloudmanS91 que responde levemente a anti-PD-1. De nuevo, el tratamiento de combinación anti-PD-1/Ab6-mIgG1 dio como resultado una profunda supresión del tumor con una tasa de respuesta de hasta el 75% y una ventaja de supervivencia significativa en todos los niveles de dosis (véase el *Ejemplo 9*). También se observaron respuestas similares con el tratamiento con Ab2 (véase la **FIG. 19A**).
- [0743]** A continuación, evaluamos la durabilidad de la respuesta antitumoral en supervivientes libres de tumor MBT-2. Se interrumpió el tratamiento y se siguió a los animales durante 7 semanas. No observamos recidiva tumoral detectable en ningún animal (véase el *Ejemplo 12*).
- [0744]** La hipótesis derivada clínicamente de que la señalización del TGFβ impulsa la exclusión inmune en detrimento de la eficacia de la TCC, así como la demostración preclínica informada anteriormente de que la inhibición del pan-TGFβ puede permitir que el sistema inmunológico supere este mecanismo de resistencia y promueva la eficacia de la TCC, en parte nos impulsó a examinar si las respuestas tumorales significativas y el beneficio de supervivencia observados con los anticuerpos de la invención podrían corresponder a cambios relevantes en la textura inmune del tumor.
- [0745]** Para estudiar los efectos inmunitarios del tratamiento anti-PD-1 o AB6-mIgG1 como agentes únicos o en combinación, se recolectaron tumores MBT-2 de ratones 10 días después del inicio del tratamiento y luego se sometieron a análisis inmunohistoquímicos y de flujo de citometría de marcadores selectos de células inmunitarias. Si bien el análisis de citometría de flujo reveló que el porcentaje general del compartimento inmunitario CD45+ no cambió con el tratamiento, la combinación de anti-PD-1 y Ab6-mIgG1 provocó un aumento de diez veces en la representación de células T CD8+ dentro de este compartimento, en relación con el tratamiento con anticuerpos de control de isotipos (promedio del 34% frente al 3,5%, respectivamente) (**FIG. 33B**). Es de destacar que el tratamiento de agente único con anti-PD-1 parece producir aumentos modestos en la representación de células CD8+, pero los aumentos observados no alcanzaron significación en este estudio. Además, el análisis de ARN derivado de estos tumores mostró aumentos en los marcadores de activación de células T citotóxicas que son consistentes con el aumento en el número de células CD8+ e indicativos de la función efectora activa de estas células (**FIG. 38D**). Es notable que también se observó un aumento significativo en la representación de células Treg CD4+ FoxP3+ con el tratamiento de combinación. No está clara la relevancia de este aumento en las células Treg dados los efectos antitumorales significativos observados con el tratamiento combinado. Sin embargo, la proporción de Treg:CD8 no se alteró en respuesta al tratamiento de combinación. Curiosamente, el tratamiento de combinación anti-PD-1/Ab6-mIgG1 también indujo una reducción significativa en la representación general de células CD11b+ dentro de los tumores MBT-2. Esto parece deberse a la reducción selectiva en las subpoblaciones CD11b+ CD206+ y CD11b+Gr1+, que corresponden a macrófagos inmunosupresores similares a M2 y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), respectivamente. En conjunto, la representación de estas dos poblaciones de células se reduce de un promedio del 47% de la población de células CD45+ al 14% después del tratamiento de combinación (**FIG. 34B**). La subpoblación de macrófagos similares a M1 (CD11b+ CD206-) no pareció cambiar con el tratamiento, lo que indica que el bloqueo de PD-1/TGFβ1 tiene un impacto selectivo pero amplio en el medio inmunosupresor dentro de los tumores, afectando beneficiosamente a los compartimentos linfóide y mieloide.
- [0746]** El mecanismo específico por el cual la inhibición combinada de PD-1 y TGFβ1 resulta en la entrada de células T CD8+ significativa y/o expansión en el microambiente tumoral no está claro. Como tal, llevamos a cabo un análisis histológico más detallado con el fin de obtener conocimientos adicionales sobre la relación entre la actividad de la vía del TGFβ y la exclusión inmunitaria. Primero, confirmamos mediante análisis inmunohistoquímico un aumento significativo en la tinción de CD8+ en todos los tumores MBT-2 del grupo de control, de acuerdo con los datos de citometría de flujo (**FIG. 36A-36D**). A continuación, se realizó un análisis inmunohistoquímico de fosfo-Smad3 (pSmad3), un factor de transcripción que media la activación de genes de respuesta de TGFβ, en un intento de determinar qué células en el microambiente tumoral pueden estar respondiendo a TGFβ1 activado.
- [0747]** Sorprendentemente, en tumores de ratones tratados con anti-PD-1 y de control, la tinción con pSmad3 parece estar confinada en gran medida a los núcleos del endotelio vascular del tumor, y esta señal disminuyó mucho con el tratamiento con Ab6-mIgG (**FIG. 36F**).
- [0748]** Para explorar más a fondo la relevancia de la señalización de TGFβ perivascular, se tiñeron conjuntamente células T CD8+ y endotelio vascular CD31+. Las células T CD8+ parecen estar enriquecidas en áreas adyacentes a los vasos sanguíneos del tumor CD31+ (**FIGS. 36F 135 y 36G**). Esta observación plantea la posibilidad de que la vasculatura del tumor pueda servir como ruta de entrada de las células T. Mientras que otros han informado que la señalización de TGFβ se asocia con la presencia de estroma peritumoral rico en fibroblastos que forma una barrera para la entrada de células T en el tumor, nuestras observaciones preliminares sugieren que una barrera vascular adicional dependiente de TGFβ1

también puede desempeñar un papel destacado en la prevención de la entrada de células T CD8+ en el tumor.

Ejemplo 12: Desarrollo de una respuesta de memoria inmunitaria adaptativa antitumoral duradera en respondedores completos anti-PD1/Ab3 y anti-PD1/Ab6 en tumores MBT-2, Cloudman S91 y EMT-6

1. Memoria antitumoral en el tumor MBT-2

[0749] Para determinar si se generó una respuesta inmunitaria adaptativa potente y duradera en respondedores completos que habían eliminado previamente los tumores MBT2, se llevó a cabo un experimento de reexposición tumoral.

Métodos

[0750] Los ratones hembra C3H/HeN de 8-12 semanas de edad se implantaron subcutáneamente en el flanco con 5×10^5 células tumorales MBT2. Los animales se asignaron al azar a los grupos de tratamiento cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 40-80 mm³ para comenzar el tratamiento. El volumen tumoral medio inicial fue igual en todos los grupos. Se dosificó anti-PD1 (RMP1-14) dos veces por semana, i.p. a 10 mg/kg; se dosificó Ab3 una vez a la semana a 10 mg/kg o 30 mg/kg y Ab6 se dosificó 3 mg/kg o 10 mg/kg durante 5 semanas. Después de 5 semanas, los animales en todos los anti-PD1/Ab3 y anti-PD1/Ab6 con volúmenes tumorales menores de 13,5 mm³ durante al menos 3 mediciones consecutivas se consideraron "respondedores completos (CR)". Las mediciones se tomaron dos veces por semana. No hubo respuesta tan completa en ratones que recibieron anti-PD1 solo. Para el experimento de nueva exposición, los animales que respondieron completamente no tenían tumores medibles (p. ej., 0 mm³). Se realizó un seguimiento a estos respondedores completos (p. ej., "descansaron") durante 7 semanas sin dosificación (período de "lavado") para permitir el lavado de los compuestos dosificados previamente. Al final de las 7 semanas, se inyectaron 5×10^5 células tumorales MBT2 por vía subcutánea en el flanco contralateral a los animales de respuesta completa y controles sin tratamiento de la misma edad. Se siguió a los animales durante 25 días o hasta que el volumen del tumor excedió los 1200 mm³, lo que ocurriera primero. El punto final se definió como un volumen tumoral de 1200 mm³. Al alcanzar el punto final, se sacrificaron los animales.

Resultados

[0751] Cuando los respondedores completos desde el estudio de eficacia fueron reimplantados subcutáneamente con células MBT-2 en el flanco contralateral a la implantación original, sin más tratamiento, no hubo crecimiento del tumor detectable observado en ninguno de los ratones de respuesta completa, mientras todos los ratones de un grupo de ratones sin tumor, de control, de la misma edad, desarrollaron tumores mensurables dentro de las tres semanas posteriores a la implantación (**FIG. 18**).

[0752] Más específicamente, los modelos de tumor re-expuestos son un medio para demostrar la memoria inmunológica y la vigilancia contra metástasis o recurrencia del tumor. En estos casos, los respondedores completos (animales que lograron una regresión tumoral completa en respuesta al tratamiento) se volvieron a implantar con células tumorales y se comparó el crecimiento con ratones sin experiencia de la misma edad. La aparición del tumor en animales sin tratamiento previo fue del 100% (12/12) el día 25 (**FIG. 18**) y varios animales alcanzaron los criterios de punto final. Los respondedores completos del estudio en las **FIGS. 16A y 16B**, que fueron reexpuestos con células MBT2 como se describió anteriormente, no tenían tumores detectables al final del estudio (0/9 respondedores completos combinados), lo que demuestra que el 100% de los respondedores completos retienen una memoria robusta del sistema inmunológico a la reexposición al tumor MBT2. Estos resultados indican que se generó una respuesta de memoria potente y duradera a los antígenos tumorales en animales con tumores y sugiere que la eliminación del tumor en la exposición inicial estaba relacionada con una respuesta inmunitaria adaptativa. Esta respuesta inmunitaria adaptativa es suficiente para destruir las células tumorales, prevenir el establecimiento del tumor y sugeriría la supresión continua de las metástasis o la recurrencia del tumor en estos animales. Además, demuestra que la inhibición de TGFβ1 durante la respuesta inmunitaria primaria no interfiere con el desarrollo de poblaciones de linfocitos de memoria.

[0753] Estos resultados re-expuestos de modelo de tumor de MBT-2 indican que la inhibición combinada de TGFβ1 y PD-1 es suficiente para establecer la memoria inmunológica anti-tumor duradera y potente en estos animales.

2. Efectos antitumorales duraderos en CloudmanS91

[0754] En particular, mientras que varios ratones portadores de tumores CloudmanS91 en los grupos de combinación anti-PD-1/Ab6 experimentaron respuestas completas, algunos animales mantuvieron una masa tumoral residual pequeña pero estable sobre el restante período de tratamiento. Intentamos recapitular los datos de reexposición tumoral en este modelo como lo hicimos en MBT-2. Sin embargo, la tasa de toma de tumores es variable en este modelo, lo que hace que este análisis sea más desafiante. En cambio, decidimos suspender el tratamiento y seguir a los animales durante varias semanas.

[0755] Seis semanas después de la interrupción del tratamiento, los ratones sin tumor medible a la interrupción del tratamiento se mantuvieron libres de tumores. Los tumores medibles al interrumpir la dosificación tuvieron respuestas mixtas en las que muchos desaparecieron pero pocos permanecieron estables o crecieron (**FIG. 14D**). Estos datos

subrayan la importancia de mantener el tratamiento hasta que se logre la eliminación total del tumor (ver también el *Ejemplo 9*).

3. Efectos anti-tumorales duraderos en EMT-6

[0756] Sorprendentemente, se observaron respuestas similares a la combinación de anti-PD-1/Ab6-mIgG1 en el modelo de carcinoma de mama EMT-6, con un 50% de tasa de respuesta completa después del tratamiento de combinación y una ventaja de supervivencia significativa sobre anti-PD-1 (**FIGS. 40A y 40C**). En contraste con MBT-2 y CloudmanS91, en los que TGFβ1 es la isoforma predominantemente expresada, EMT6 expresa niveles similares de TGFβ1 y TGFβ3 tanto a nivel de ARN como de proteína. Esta combinación de tratamiento fue más eficaz que la inhibición de anti-PD-1/pan-TGFβ, lo que sugiere que incluso en la presencia de múltiples isoformas TGFβ, TGFβ1 es el principal impulsor de la exclusión inmunitaria y la resistencia de este modo primario. En este modelo, detuvimos el tratamiento y de nuevo vimos que seis semanas después del cese de la dosificación, los respondedores completos permanecían libres de tumores, demostrando nuevamente la durabilidad de la respuesta (**FIG. 40C, derecha**).

Ejemplo 13: Cribado de anticuerpos, metodología de selección y caracterización

[0757] Dada la secuencia alta y la similitud estructural entre el factor de crecimiento de TGFβ1 maduro y sus miembros de la familia estrechamente relacionados, TGFβ2 y TGFβ3, razonamos que la generación de inhibidores basados en anticuerpos de afinidad suficientemente alta selectivos que se dirijan a esta forma activa del factor de crecimiento TGFβ1 resultarían un desafío. Los conocimientos recientemente publicados sobre la estructura latente del TGFβ1 y los aspectos mecánicos de su activación a través de la interacción con ciertas integrinas han apuntado a la posibilidad de apuntar al prodominio en los complejos latentes del TGFβ1 destinado a prevenir la activación del complejo latente como mecanismo de acción.

[0758] El logro de la selectividad de isoformas tanto en la inhibición de la unión como de la activación se beneficiaría de la menor similitud de secuencia entre los prodominios de miembros de la familia que confinan y hacen inactivos los respectivos homodímeros del factor de crecimiento. Una consideración clave adicional para la identificación de un inhibidor selectivo de la activación de TGFβ1 es el hecho de que el TGFβ1 latente se ensambla en complejos latentes grandes (LLC) unidos por disulfuro que permiten la deposición de los complejos de factores de crecimiento inactivos en la matriz extracelular o su elaboración en la superficie celular. Dada la plausibilidad de que se puedan expresar múltiples LLC de TGFβ1 en el microambiente del tumor, se analizaron los datos de RNAseq de TCGA. Esencialmente, todos los tipos de tumores muestran evidencia de expresión de las cuatro moléculas LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33 que presentan proTGFβ1 (**FIG. 25E**). Por lo tanto, buscamos identificar anticuerpos específicos que se unieran e inhibieran la activación latente de TGFβ1 en todos estos contextos locales.

[0759] Se diseñaron, expresaron, purificaron, caracterizaron y utilizaron formas solubles murinas y humanas de cada TGFβ1 LLC para las etapas de selección positiva en una pantalla cuidadosamente diseñada de una biblioteca de presentación de anticuerpos humanos sin tratamiento previo basada en levadura. Para asegurar la identificación de aglutinantes de TGFβ1 latentes selectivos, también se usaron moléculas presentadoras de LLC no complejadas en etapas de selección negativa.

[0760] Un anticuerpo parental se identificó mediante la selección de una biblioteca de anticuerpos IgG a base de levadura, naive, completamente humanos, usando formas humanas y murinas de TGFβ1 LLC (LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1 y GARP-proTGFβ1) como antígenos de selección positiva y contraselección de las moléculas presentadoras de LLC humanas y murinas (LTBP1, LTBP3 y GARP). La selección fue un proceso de múltiples rondas que incluyó dos rondas de clasificación de células asistida por cuentas magnéticas (MACS) y varias rondas posteriores de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las rondas MACS incluyeron un aclaramiento previo (para eliminar ligantes no específicos), incubación con antígeno biotinilado, lavado, elución y amplificación de levadura. Las rondas de selección FACS incluyeron incubación con el antígeno biotinilado, lavado y selección de población de unión (para selección positiva) o no vinculante (para selección negativa o desección) por citometría de flujo seguida de amplificación de la levadura seleccionada mediante crecimiento en medios de crecimiento de levadura apropiados. Todas las selecciones se realizaron en fase de solución.

[0761] Varios cientos de anticuerpos únicos se expresaron como anticuerpos monoclonales humanos de longitud completa de IgG1agli (Fc aglicosilado). A continuación, estos anticuerpos se caracterizaron mediante interferometría de biocapa para determinar su capacidad para unirse a LTBP1-proTGFβ1 humano y murino, LTBP3-proTGFβ1 y GARP-proTGFβ1. Se analizaron y ordenaron los anticuerpos que se unieron a estas LLC de TGFβ1 en ensayos de detección de potencia basados en células (ensayos de LTBP-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1). Los anticuerpos inhibidores se expresaron de forma recombinante con un IgG4sdk Fc humano (bisagra estabilizada por la mutación S228P; Angal, 1993) y su actividad inhibidora se evaluó en ensayos de activación de TGFβ1 mediada por integrina (ensayos LTBP-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1; ver *Ejemplo 2*). Varios anticuerpos pudieron inhibir significativamente el proTGFβ1 en el ensayo de células reporteras. El anticuerpo Ab4 se eligió como anticuerpo principal para la maduración por afinidad basándose en su capacidad para unirse a complejos de proTGFβ1 humano y de ratón e inhibir la activación mediada por integrina de todas las LLC de proTGFβ1 humano y de ratón.

[0762] La maduración por afinidad de Ab4 se realizó en dos etapas usando dos estrategias modificadas de anticuerpos diferentes. En la primera fase, se generó una biblioteca de moléculas de anticuerpos en donde la CDRH3 parental se combinó con una biblioteca de anticuerpos prefabricada con variantes de CDRH1 y CDRH2 (reproducción aleatoria de H1/H2). Esta biblioteca se seleccionó para unirse a los complejos proTGFβ1 humano y de ratón. Los aglutinantes más fuertes de esta fase de la campaña de maduración de la afinidad se trasladaron a la segunda fase de maduración de la afinidad en donde la CDR3 de cadena pesada de la molécula original se sometió a mutagénesis utilizando un enfoque de caminata de dímero de cebadores (mutación oligo H3), y la biblioteca de las variantes generadas se seleccionó para unirse a los complejos de proTGFβ1 humano y de ratón.

[0763] Se ensayaron de nuevo un total de 14 anticuerpos que representan progenies optimizadas por afinidad del anticuerpo principal Ab4 de ambas etapas de maduración por afinidad para la unión al antígeno y la inhibición de las LLC de TGFβ1 latentes. Se seleccionó Ab6 debido a su alta afinidad por los cuatro TGFβ1 LLC latentes, reactividad cruzada con proteínas de ratón, rata y mono cynomolgus, y mayor potencia en ensayos basados en células.

[0764] Para caracterizar más propiedades de unión de Ab6, in vitro se midieron las actividades de unión en un ensayo MSD-SET. Se confirmó que Ab6 era selectivo para los complejos latentes de TGFβ1 (véase la **FIG. 39A**); no se detectó unión significativa a complejos de TGFβ2 latente o TGFβ3 latente. De manera similar, no se detectó unión al factor de crecimiento TGFβ1 activo (maduro) en sí mismo que no está asociado con un prodominio. Como se muestra a continuación, Ab6 se une con alta afinidad a todos los grandes complejos latentes de TGFβ1 (es decir, molécula presentadora + proTGFβ1). Además, se demostró que Ab6 tiene una reactividad cruzada de especies deseable; reconoce y se une con alta afinidad a sus homólogos de rata y cynomolgus.

Tabla 21. Especificidad de especies cruzadas de Ab6

Complejo latente grande	K _D humano (pM)	K _D de ratón (pM)	K _D de rata (pM)	K _D cino (pM)
LTBP1-proTGFβ1	18 ± 0	24 ± 0	35 ± 2	39 ± 2
LTBP3-proTGFβ1	29 ± 3	22 ± 0	n.d.	n.d.
GARP-proTGFβ1	27 ± 2	21 ± 3	n.d.	n.d.
LRRC33-proTGFβ1	63 ± 0	48 ± 0	86 ± 8	93 ± 10

[0765] Para probar la capacidad de Ab6 para inhibir activación de TGFβ1 latente por las integrinas, se desarrolló una serie de ensayos de activación basados en células, que corresponde a cada uno de los contextos LLC que permiten la presentación y activación de TGFβ1. Las células de glioblastoma humano LN229 expresan integrinas αVβ8, que pueden activar complejos de TGFβ1 latentes. Estas células también expresan endógenamente LTBP1 y LTBP3 (medidos por qPCR) que, cuando se transfectan con un plásmido que codifica TGFβ1, permiten la producción y deposición de estas LLC de TGFβ1 (LTBP1-proTGFβ1 y LTBP3-proTGFβ1) en matriz extracelular. Para producir LLC de TGFβ1 que contienen GARP o LRRC33 asociadas a células (GARP-proTGFβ1 y LRRC33-proTGFβ1), se cotransfectaron células LN229 (que no expresan estos genes, mediante qPCR) con constructos de expresión que codifican una de estas moléculas de presentación junto con un constructo de expresión de TGFβ1. Una vez depositadas en la matriz extracelular o elaboradas en la superficie celular de las células LN229, las LLC de TGFβ1 pueden activarse por la integrina αVβ8 expresada por las mismas células. El factor de crecimiento de TGFβ1 maduro (activo) que se libera del complejo latente mediante la activación de la integrina queda libre para acoplar su receptor afín en células cocultivadas diseñadas con un informador del promotor de luciferasa CAGA12 que permite la medición de la actividad del factor de crecimiento.

[0766] Todos los TGFβ1 LLCs se activaron fácilmente bajo las condiciones de ensayo anteriormente mencionados. La cotransfección de GARP o LRRC33 en células LN229 que expresan TGFβ1 latente dio como resultado una señal de TGFβ significativamente más alta, consistente con la formación y activación de LLC de TGFβ1 en la superficie celular y superando a las LTBP endógenas. Ab6 inhibió la activación de todos los complejos de una manera dependiente de la concentración con valores de CI50 entre 1,15 y 1,42 nM. La potencia inhibidora para los complejos de TGFβ1 de ratón fue similar, en línea con la reactividad cruzada de especies de Ab6. De acuerdo con la falta de unión significativa de Ab6 al complejo de LTBP1-TGFβ3, se observó poca o ninguna inhibición del complejo de activación de LTBP-TGFβ3 LLC mediado por integrinas en un ensayo diseñado de manera idéntica, lo que demuestra selectividad para la inhibición de la activación de TGFβ1 (**FIG. 39B**).

[0767] Notablemente, Ab6 también inhibió la activación de TGFβ1 latente por calicreína plasmática humana y plasmina (véanse las **FIGS. 5A y 5B**), lo que indica que este anticuerpo puede inhibir múltiples mecanismos putativos de activación.

[0768] Para evaluar adicionalmente la capacidad de Ab6 para inhibir una consecuencia biológicamente relevante de la activación de TGFβ1, evaluamos la capacidad de este anticuerpo para inhibir una actividad supresora clave de las células Treg humanas primarias. Las células Treg clasificadas CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{lo} regulan positivamente la expresión superficial de TGFβ1-GARP LLC tras la estimulación del receptor de células T (**FIG. 32A**). Estas células Treg activadas suprimieron la proliferación de células T CD4 efectoras autólogas y Ab6 bloqueó esta actividad Treg supresora a concentraciones tan bajas como 1 µg/ml (**FIG. 32B**). Estos resultados son consistentes con observaciones previas de que las células Treg aprovechan la señalización del TGFβ para suprimir las células T.

Ejemplo 15. Mapeo de epítomos para determinar dónde son vinculantes en el complejo proTGFβ Ab5, Ab6, Ab2 y Ab3

[0769] Para obtener una visión inicial en el mecanismo de inhibición de acción para los inhibidores selectivos de isoformas de activación de TGFβ1, se realizó un análisis de espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (H/DX-MS) para identificar posibles sitios de interacción de TGFβ1 latente con el anticuerpo. La espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) es una técnica ampliamente utilizada para explorar la conformación de proteínas en solución. La metodología HDX-MS se describe en Wei et al., Drug Discov Today. 2014 enero; 19 (1): 95-102. En resumen, HDX-MS se basa en el intercambio de los hidrógenos de amida de la cadena principal de la proteína con deuterio en solución. Los hidrógenos amídicos de la cadena principal involucrados en enlaces de hidrógeno débiles o ubicados en la superficie de la proteína pueden intercambiarse rápidamente, mientras que los enterrados en el interior o los involucrados en la estabilización de enlaces de hidrógeno se intercambian más lentamente. Al medir las tasas de HDX de los hidrógenos de amida de la cadena principal, se puede obtener información sobre la dinámica y la conformación de las proteínas.

[0770] TGFβ1 latente (15 μm) y proTGFβ1/Ab Fab (1:3 relación molar) se prepararon en tampón de muestra (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). En los experimentos no deuterados, cada muestra se mezcló con tampón de muestra (1:15, v/v) a temperatura ambiente, luego se mezcló con tampón de extinción 1:1 (v/v) (fosfato de sodio 100 mM, guanidina HCl 4 M, TCEP 0,5 M) a 0°C. Las muestras templadas se inyectaron inmediatamente en un sistema nanoACQUITY UPLC™ con tecnología HDX (Waters Corp, Milford, MA, EE. UU.) para la digestión con pepsina en columna. El eluyente se dirigió a un espectrómetro de masas SYNAPT® G2 HDMS (Waters Corp, Milford, MA, EE. UU.) para su análisis en modo MSE. Para los experimentos de intercambio H/D, cada muestra se mezcló con tampón de marcado (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM en óxido de deuterio, pD 7,5) (1:15, v/v) para iniciar las reacciones de marcado a 25°C. Se marcaron cinco alícuotas de cada muestra en varios intervalos de tiempo: 10 s, 1 min, 10 min, 1 h y 2 h. Al final de cada punto de tiempo de marcado, la reacción se inactivó añadiendo tampón de inactivación 1:1 (v/v) y las muestras inactivas se inyectaron en el sistema Waters H/DX-MS para su análisis. Entre cada corrida de muestra, se corrió un blanco limpio inyectando tampón de lavado de pepsina (guanidina HCl 1,5 M, acetonitrilo al 4%, ácido fórmico al 0,8%) en el sistema H/DXMS.

[0771] Se utilizaron disociación inducida por colisión y masa precisa en el modo de adquisición independiente de datos (MSE) y el software ProteinLynx Global Server (PLGS) 3,0 (Waters Corp, Milford, MA) para determinar los péptidos pépticos en las muestras de proteínas no degradadas analizadas en el mismo sistema UPLC-ESI-QToF utilizado para experimentos H/DX-MS. Los péptidos pépticos generados a partir de PLGS se importaron a DynamX 3,0 (Waters Corp, Milford, MA) con umbrales de calidad de péptidos de intensidad de señal MS1 ≥ 1.000 y error de masa máximo de 1 ppm. Los resultados automatizados se inspeccionaron manualmente para garantizar que las distribuciones isotópicas y m/z correspondientes en varios estados de carga se asignaran correctamente al péptido péptico apropiado. Se usó DynamX 3,0 para generar la gráfica de incorporación relativa de deuterio y el mapa de calor H/DX para cada péptido péptico. La incorporación relativa de deuterio de cada péptido se determinó restando la masa del centroide promediada en peso de la distribución isotópica de la muestra de control no luterada de la masa del centroide promediada en peso de la distribución isotópica de las muestras marcadas con deuterio en cada momento de marcado. Todas las comparaciones se realizaron en condiciones experimentales idénticas, anulando así la necesidad de corrección por intercambio inverso en la determinación de la incorporación de deuterio. Por tanto, los niveles de intercambio H/D se informan como relativos. La captación relativa fraccionada de deuterio se calculó dividiendo la captación relativa de deuterio de cada péptido péptico por su captación máxima teórica. Todos los experimentos de H/DX-MS se realizaron por duplicado y se calculó como se describe un límite de confianza del 98% para la incertidumbre de la absorción relativa media de deuterio. Las diferencias en la captación de deuterio entre el TGFβ1 latente no unido y unido a Fab que superan los 0,5 Da se consideraron significativas.

[0772] HDX-MS se llevó a cabo para determinar dónde se unió los complejos proTGFβ Ab5 y Ab6. En HDX-MS, las regiones de un antígeno que están estrechamente unidas por un anticuerpo están protegidas del intercambio de protones, debido a la interacción proteína-proteína, mientras que las regiones que están expuestas al disolvente pueden experimentar fácilmente el intercambio de protones. En base a esto, se identificaron las regiones de unión del antígeno.

[0773] El mapa de calor muestra que la unión de Ab5 Fab resulta en la protección HDX en regiones (Región 1 y Región 2) de ProTGFβ1 (**FIG. 20A**). **FIG. 20B** representa la estructura del complejo proTGFβ1, superpuesto con las regiones protegidas con HDX unidas por Ab5. Notablemente, HDX-MS mostró que AB5 potencialmente se une a un epítipo único en el LAP/Región de Factor de Crecimiento de ProTGFβ1.

[0774] Estudios HDX similares se llevaron a cabo para identificar las regiones de unión implicadas en la unión a Ab6 proTGFβ1. Se logró una excelente cobertura de péptidos de ~90%. El análisis reveló tres regiones en TGFβ1 latente que estaban protegidas del intercambio de deuterio por la unión de Ab6 Fab. El mapa de calor proporcionado en la **FIG. 21A** muestra ciertas regiones de ProTGFβ1 afectadas por la interacción de Ab6 con el antígeno. Estas áreas del antígeno se indicaron mediante recuadros rojos mostrados en la **FIG. 21B** muestra la estructura del complejo proTGFβ1 y las regiones identificadas en la **FIG. 21A** se marcaron en consecuencia para mostrar la relación espacial de estas áreas dentro del complejo proTGFβ1.

[0775] Como se muestra en la **FIG. 21A**, se encontró que la región protegida marcada con un asterisco (*) era la misma

que la Región 1 identificada para Ab5. Se encontró que la región protegida marcada con un asterisco doble (**) era un subconjunto de la Región 2 identificada para Ab5. Estos datos sugieren que los anticuerpos preferidos que muestran actividades inhibitorias ventajosas pueden unirse a un epítipo que incluye una porción de Lazo de Latencia (Bucle de Latencia) del complejo latente. Los datos también sugieren que dicho epítipo puede ser un epítipo combinatorio que está formado por una porción de Lazo de Latencia y una porción del dominio del factor de crecimiento, que puede "sujetar" eficazmente el factor de crecimiento en el estado bloqueado, evitando así su liberación.

[0776] Los análisis estadísticos revelaron tres regiones de unión en proTGFβ1 que estaban fuertemente protegidos de intercambio de deuterio por Ab6 de unión Fab (**FIG. 22A**). La región 1 está dentro del prodominio latente de TGFβ1, mientras que las regiones 2 y 3 se asignan al factor de crecimiento TGFβ1. Curiosamente, la región 1 abarca en gran medida el lazo de latencia y contiene los sitios de escisión proteolítica para las proteasas de plasmina y calicreína; La protección de esta región es consistente con nuestra observación de que Ab6 inhibe la activación mediada por calicreína y plasmina del TGFβ1 latente (**FIGS. 5A y 5B**). También es importante reiterar que Ab6 no se une a ninguno de los tres dímeros del factor de crecimiento del TGFβ en forma libre (p. ej., no en asociación con el prodominio), lo que implica que cualquier interacción potencial con sitios en el dominio del factor de crecimiento es dependiente sobre interacciones de prodominio. Además, Ab6 y la integrina αVβ6 pueden unirse simultáneamente al TGFβ1 latente. Esta observación sugiere un mecanismo de inhibición alostérico de la activación del TGFβ1 dependiente de la integrina, ya que las regiones de unión del anticuerpo están distales al bucle desencadenante en el prodominio del TGFβ1 que porta el sitio de reconocimiento de la integrina (RGD; **FIG. 22B**). Además, la alineación de secuencias de las supuestas regiones de epítipo 1-3 (particularmente las Regiones 1 y 2) reveló una divergencia de secuencia significativa a través de las tres isoformas de TGFβ, lo que probablemente explica la selectividad observada de Ab6 para proTGFβ1 frente a complejos proTGFβ2 y proTGFβ3 (**FIG. 22B**).

[0777] También se llevó a cabo HDX-MS en proTGFβ1 C4S con Ab2 Fab usando una relación molar 1:3 de proTGFβ1 a Ab2 Fab (véase la **FIG. 23A**). Como se muestra en la **FIG. 23A**, hay al menos tres regiones en proTGFβ1 que mostraron una protección de intercambio H/D significativa, lo que sugiere que estas regiones o porciones de las mismas pueden representar la región o regiones de unión de Ab2 en proTGFβ1. Región 1 (SPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNST; SEQ ID NO: 263) mostró el mayor intercambio H/D entre todos los péptidos pépticos resueltos en proTGFβ1 y se mapea en el lazo de latencia dentro del prodominio de proTGFβ1. Regiones 2 (LREAVPE; SEQ ID NO: 264) y 3 (WKWIHEPKGYHANFCLG; SEQ ID NO: 265) se mapean en la hélice α3 dentro del prodominio y parte del factor de crecimiento de proTGFβ1, respectivamente. Alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones 1 y 2 comparando todas las isoformas de proTGFβ 1, 2 y 3 mostraron diversidad de secuencia en estas regiones (véase la **FIG. 23B**) y pueden proporcionar el argumento estructural para la especificidad de Ab2 para proTGFβ1 sobre las otras isoformas.

Ejemplo 17: Análisis bioinformático de expresiones relativas de TGFB1, TGFB2 y TGFB3

[0778] Los análisis previos de muestras de tumores humanos implicaron a la señalización de TGFβ como un contribuyente importante a la resistencia primaria a CBT (Hugo et al. 2016). Uno de estos estudios reveló que la expresión del gen TGFB1 en los cánceres uroteliales fue uno de los genes de la vía del TGFβ de mayor puntuación asociados con los no respondedores al tratamiento anti-PD-L1, lo que sugiere que la actividad de esta isoforma puede estar impulsando la señalización del TGFβ.

[0779] Para evaluar la expresión de isoformas de TGFβ en tumores cancerosos, se examinaron los datos de expresión génica (RNAseq) de conjuntos de datos disponibles públicamente. Utilizando una herramienta de interfaz en línea disponible públicamente (Firebrowse) para examinar la expresión de las isoformas de TGFβ (TGFB1, TGFB2 y TGFB3) en The Cancer Genome Atlas (TCGA), la expresión diferencial del ARN que codifica las isoformas de TGFβ tanto en tejido normal como canceroso fue primero examinado. Se evaluó la expresión de ARNm de TGFB1, TGFB2 y TGFB3 en poblaciones de tipos de cáncer humanos, así como en tumores individuales. Se seleccionaron todos los conjuntos de datos de RNAseq tumoral en la base de datos TCGA para los que había comparadores de tejido normal, y se examinó la expresión de los genes TGFB1, TGFB2 y TGFB3 (**FIG. 25A**). Los datos de la interfaz de Firebrowse se representan como log2 de lecturas por millón de kilobase (RPKM).

[0780] Estos datos sugieren que en la mayoría de tipos de tumores (gris), TGFB1 es la transcripción más abundantemente expresada de las isoformas de TGFβ, con valores log2 (RPKM) generalmente en el intervalo de 4-6, vs. 0-2 para TGFB2 y 2-4 para TGFB3. También observamos que en varios tipos de tumores, el nivel medio de expresión de TGFB1 y TGFB3 está elevado en relación con las muestras de comparación normales (negro), lo que sugiere que el aumento de la expresión de estas isoformas de TGFβ puede estar asociado con células cancerosas. Debido al papel potencial de la señalización de TGFβ en la supresión del sistema inmunológico del huésped en el microambiente del cáncer, nos interesó observar que las transcripciones de TGFB1 estaban elevadas en los tipos de cáncer para los que se aprobaron terapias anti-PD-1 o anti-PDL1; estas indicaciones están etiquetadas en gris en la **FIG. 25A**.

[0781] Tenga en cuenta que, si bien RPKM > 1 generalmente se considera el valor mínimo asociado con la expresión génica biológicamente relevante (Hebenstreit et al., 2011; Wagner et al., 2013), sin embargo, para análisis posteriores, límites más estrictos de RPKM (o de la medida relacionada FPKM (ver Conesa et al., 2016)) > 10 o > 30 para evitar falsos positivos. A modo de comparación, los tres de esos umbrales se indican en la **FIG. 25A**.

[0782] Los grandes rangos intercuartílicos de la **FIG. 25A** indican una variabilidad significativa en la expresión de la isoforma de TGFβ entre pacientes individuales. Para identificar cánceres en los que al menos un subconjunto de la población de pacientes tiene tumores que expresan diferencialmente la isoforma TGFβ1, se analizaron los datos de RNAseq de muestras de tumores individuales en el conjunto de datos TCGA, calculando el número de fragmentos por kilobase millón (FPKM). RPKM y FPKM son aproximadamente equivalentes, aunque FPKM corrige las lecturas de recuento doble en los extremos opuestos de la misma transcripción (Conesa et al., 2016). Las muestras tumorales se calificaron como positivas para la expresión de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 si el valor de FPKM del transcrito era >30 y la fracción de pacientes (expresada como %) de cada tipo de cáncer que expresaba cada isoforma de TGFβ era calculada (**FIG. 25B**).

[0783] El análisis comparativo de los datos de RNAseq de The Cancer Genome Atlas (TCGA) reveló que, entre los tres miembros de la familia, la expresión de TGFB1 parecía ser la más prevalente en la mayoría de los tipos de tumores. Las excepciones notables son el cáncer de mama, el mesotelioma y el cáncer de próstata, donde la expresión de otros miembros de la familia, particularmente TGFB3, es al menos igualmente prevalente en comparación con TGFB1. Como se muestra en la **FIG. 25B**, la mayoría de los tipos de tumores muestran un porcentaje significativo de muestras individuales que son positivas para TGFβ1, con algunos tipos de cáncer, incluida la leucemia mieloide aguda, el linfoma difuso de células B grandes y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, que expresan TGFβ1 en más del 80% de todas las muestras de tumores. De acuerdo con los datos de la **FIG. 25A**, menos tipos de cáncer son positivos para TGFβ2 o TGFβ3, aunque varios cánceres muestran un porcentaje igual o mayor de muestras tumorales que son positivas para TGFβ3, incluidos el carcinoma invasivo de mama, el mesotelioma y el sarcoma. Estos datos sugieren que los tipos de cáncer pueden estratificarse para la expresión de la isoforma de TGFβ, y que tal estratificación puede ser útil para identificar pacientes que son candidatos para el tratamiento con inhibidores específicos de isoforma de TGFβ.

[0784] Para investigar más a fondo esta hipótesis, los datos de log2 (FPKM) RNAseq de un subconjunto de muestras de tumores individuales se analizaron y se representaron en un mapa de calor (**FIG. 25C**), estableciendo el umbral de color para reflejar FPKM >30 como un nivel de transcripción mínimo. que se puntuará como positivo para isoforma de TGFβ. La expresión de ARNm de TGFB1 en orden de rango en muestras de tumores individuales entre siete tipos de tumores aprobados por CBT confirmó una expresión más alta y más frecuente de ARNm de TGFB1 en comparación con TGFB2 y TGFB3, nuevamente con la notable excepción del carcinoma de mama. Estas y las observaciones publicadas anteriormente en el cáncer urotelial sugieren que la actividad de la vía del TGFβ probablemente esté impulsada por la activación del TGFβ1 en la mayoría de los tumores humanos.

[0785] Cada muestra se representa como una única fila en el mapa de calor, y las muestras se organizan por nivel de expresión de TGFβ1 (niveles de expresión más altos en la parte superior). De acuerdo con el análisis de la **FIG. 25B**, un número significativo de muestras en cada tipo de cáncer son positivas para la expresión de TGFB1. Sin embargo, esta representación también destaca el hecho de que muchos tumores expresan únicamente transcritos de TGFB1, particularmente en los tipos de cáncer de carcinoma de esófago, urotelial de vejiga, adenocarcinoma de pulmón y melanoma cutáneo. Curiosamente, tal sesgo de TGFB1 no es una característica de todos los cánceres, ya que las muestras de carcinoma invasivo de mama muestran un número mucho mayor de muestras positivas para TGFB3 que para TGFB1 positivas. No obstante, este análisis indica que la isoforma β1 es el predominante y, en la mayoría de los casos, el único miembro de la familia TGFβ presente en los tumores de un gran número de pacientes con cáncer. Tomados junto con los datos que sugieren que la señalización de TGFβ juega un papel significativo en la inmunosupresión en el microambiente del cáncer, estos hallazgos también apuntan a la utilidad de la inhibición específica de TGFβ1 en el tratamiento de estos tumores.

[0786] Para identificar modelos de ratón en donde para probar la eficacia de inhibición específica de TGFβ1 como un agente terapéutico del cáncer, se analizó la expresión de isoforma TGFβ en datos RNAseq de una variedad de líneas celulares utilizadas en modelos de tumor singeneicos de ratón. Para este análisis, se generaron dos representaciones de los datos. Primero, generamos un mapa de calor de los valores de log2 (FPKM) para tumores derivados de cada línea celular (**FIG. 25D**, izquierda). Debido a que este análisis se llevó a cabo para identificar modelos singénicos que recapitularían tumores humanos (predominantemente TGFB1), nos preocupamos principalmente por evitar falsos negativos, y establecimos nuestro umbral "positivo" en FPKM>1, muy por debajo del de las representaciones en las **FIGS. 25B y 25C**.

[0787] Como la representación de datos en la **FIG. 25D** (izquierda) deja en claro que varios tumores singénicos, incluidos MC-38, 4T-1 y EMT6, expresan comúnmente niveles significativos de TGFβ1 y TGFβ3. En contraste, los modelos A20 y EL4 expresan TGFβ1 casi exclusivamente, y los tumores S91 y P815 muestran un fuerte sesgo para la expresión de TGFB1.

[0788] Para evaluar más a fondo la expresión diferencial de TGFB1 frente a TGFB2 y/o TGFB3, se calculó el ΔTGFB1 mínimo, definido como el valor más pequeño de $\log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB1}}) - \log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB2}})$ o $\log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB1}}) - \log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB3}})$. El ΔTGFB1 mínimo para cada modelo se muestra como un mapa de calor en la **FIG. 25D** (derecha), y pone de relieve la conclusión a partir de la **FIG. 25D** (izquierda) que los tumores singénicos de las líneas celulares A20, EL4, S91 y/o P815 pueden representar modelos excelentes para probar la eficacia de inhibidores específicos de TGFβ1.

[0789] Para confirmar aún más la asociación de la expresión de TGFβ1 con la resistencia primaria a CBT sobre TGFβ2 o

TGFβ3, correlacionamos la expresión de isoformas con la Firma de Resistencia Innata anti-PD-1 ("IPRES") (Hugo et al., Cell, 2016 24 de marzo; 165 (1): 35-44). En resumen, IPRES es una colección de 26 firmas transcriptómicas, que en conjunto indican la resistencia tumoral a la terapia anti-PD-1. La firma IPRES indica la expresión positiva de genes implicados en la regulación de la transición mesenquimatos, la adhesión celular, la remodelación de la ECM, la angiogénesis y la cicatrización de heridas. En siete tipos de tumores aprobados por CBT, encontramos de forma más consistente una correlación positiva y significativa entre los niveles de ARNm de TGFβ1 y la puntuación de IPRES que la expresión de ARNm de las otras dos isoformas de TGFβ (**FIG. 43A**). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la inhibición selectiva de la actividad de TGFβ1 puede superar la resistencia primaria a CBT.

[0790] El análisis de variación del conjunto de genes (GSVA) de la firma transcripcional IPRES (resistencia innata a anti-PD-1) a través de los tipos de tumores definidos por TCGA con terapias aprobadas por CBT se correlaciona (coeficiente de Pearson) más fuerte y significativamente con la abundancia de ARN de TGFβ1, con corte de FPKM ≥ 30 para presencia de expresión. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la inhibición selectiva de la actividad de TGFβ1 puede superar la resistencia primaria a CBT.

[0791] Para evaluar aún más la correlación de la expresión de TGFβ1 con la resistencia a CBT, se comparó la abundancia de ARN de TGFβ1 con un análisis de variación del conjunto de genes (GSVA) de la firma transcripcional de la vía Plasari TGFβ (resistencia innata anti-PD-1) a través de tipos de tumores definidos por TCGA con terapias aprobadas por CBT. El conjunto de genes plasari se obtuvo del portal web mSigDB (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) y el cálculo de la puntuación del conjunto de genes se determinó utilizando el paquete GSVA en R (Hanzelmann et al., BMC Bioinformatics 201314: 7, 2013; y Liberzon et al., Bioinformatics. 15 de junio de 2011; 27 (12): 1739-1740). Como se muestra en la **FIG. 43B**, el GSVA se correlacionó (coeficiente de Pearson) de manera más fuerte y significativa con la abundancia de ARN de TGFβ1, con un punto de corte de FPKM ≥ 30 para la presencia de expresión.

[0792] Estos datos sugieren que la actividad de la vía de TGFβ probablemente está impulsada por activación de TGFβ1 en la mayoría de los tumores humanos.

[0793] Se utilizaron los siguientes recursos para el análisis de bioinformática descrito anteriormente: los datos de expresión de isoformas de TGF-beta TCGA fueron descargados de los recursos de conjuntos de datos del navegador UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/datapages/>). El límite de expresión para determinar la expresión alta se determinó examinando la distribución de los valores de FPKM de los datos de la isoforma de TGFβ. Se generaron mapas de calor y gráficos de dispersión utilizando GraphPad Prism. El conjunto de genes Plasari se obtuvo del portal web mSigDB (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) y el cálculo de la puntuación del conjunto de genes se determinó utilizando el paquete GSVA en R.

Ejemplo 18: Los inhibidores selectivos para TGFβ1 exhiben una toxicidad reducida en comparación con el inhibidor de quinasa ALK5 LY2109761 y un anticuerpo PBN-TOPβ en estudios de seguridad/toxicología

[0794] Para evaluar la toxicidad potencial in vivo de Ab3 y Ab6, en comparación con el inhibidor de la quinasa del receptor de molécula pequeña TGF-β tipo I (ALK5) LY2109761 y de un anticuerpo pan-TGFβ (hlgG4; neutralizante), se realizaron estudios de seguridad/toxicología en ratas. La rata fue seleccionada ya que la selección de la especie para este estudio de seguridad se basó en los informes anteriores de que las ratas son más sensibles a la inhibición de TGFβ en comparación con los ratones. También se han observado toxicidades similares en ratas en otras especies de mamíferos, como perros, primates no humanos y seres humanos.

[0795] Brevemente, a ratas hembras Fisher 344 (**FIGS. 26A y 26B**) o ratas Sprague Dawley (**FIG. 26C**) se les administró Ab3 a 3 mg/kg (1 grupo, N=5), a 30 mg/kg (1 grupo, N=5), o a 100 mg/kg (1 grupo, N=5); Ab6 a 10 mg/kg (1 grupo, N=5), a 30 mg/kg (1 grupo, N=5), o a 100 mg/kg (1 grupo, N=5); anticuerpo pan-TGFβ a 3 mg/kg (1 grupo, N=5), a 30 mg/kg (1 grupo, N=5), o a 100 mg/kg (1 grupo, N=5); LY2109761 a 200 mg/kg (1 grupo, N=5) o 300 mg/kg (1 grupo, N=5); o control de vehículo PBS (pH 7,4) (1 grupo, N=5).

[0796] Los animales que recibieron anticuerpo pan-TGFβ se dosificaron una vez por vía intravenosa (el día 1) a un volumen de 10 ml/kg y se sacrificaron el día 8 y se realizaron necropsias. A los animales que recibieron Ab3 o Ab6 se les administró una dosis intravenosa una vez a la semana durante 4 semanas (los días 1, 8, 15 y 22) a un volumen de 10 ml/kg. Los animales que recibieron LY2109761 se dosificaron mediante sonda oral una vez al día durante cinco o siete días. Los animales se sacrificaron el día 29 y se realizaron necropsias.

[0797] Se llevaron a cabo dos veces al día observaciones clínicas generales de los animales y observaciones del lado de la jaula después de la dosis para evaluar la toxicidad aguda. Otras observaciones realizadas incluyeron una evaluación del consumo de alimentos y la medición del peso corporal una vez a la semana. Estos también incluyeron evaluaciones de patología clínica (hematología, química sérica y coagulación) y patología anatómica (macroscópica y microscópica). Se recogió un conjunto completo de tejidos en la necropsia para su evaluación microscópica. Los tejidos se conservaron en formalina tamponada neutra al 10%, se recortaron, se procesaron de forma rutinaria y se incluyeron en parafina. Los bloques de parafina se microtomizaron y las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). En particular, el corazón se recortó mediante una bisección longitudinal a lo largo de un plano perpendicular al plano de la arteria pulmonar para exponer las válvulas auriculoventricular derecha, auriculoventricular izquierda y aórtica. Ambas mitades se enviaron

para su incrustación. Cada hemisección del corazón se incrustó en parafina con la superficie cortada hacia abajo. Los bloques se seccionaron para obtener al menos tres válvulas cardíacas. Las secciones de tejido fueron examinadas por microscopía óptica por un miembro certificado por la junta del Colegio Americano de Patólogos Veterinarios (ACVP).

[0798] Como se muestra en la Tabla 20 y la **FIG. 26**, los animales a los que se les administró ≥ 3 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β mostraron resultados en la válvula cardíaca (es decir, valvulopatía) similares a los descritos en los animales a los que se les administró LY2109761. Los animales a los que se les administró ≥ 30 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β mostraron resultados en el atrio similares a los animales a los que se les administró LY2109761. Los animales a los que se les administró 100 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β mostraron resultados de miocardio similares a los descritos en los animales a los que se les administró LY2109761, y los animales a los que se les administró 30 mg/kg de anticuerpo pan-TGF β tuvieron hemorragia en el miocardio. Un animal al que se le administraron 100 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β tuvo necrosis intramural moderada con hemorragia en una arteria coronaria, que se asoció con infiltrados de células inflamatorias mixtas perivasculares leves. Los resultados óseos en animales a los que se les administró el anticuerpo pan-TGF β y LY2109761 consistieron en un esternón macroscópico de forma anormal y un aumento microscópico de espesor de la zona hipertrófica en la placa terminal del esternón y la fisis del fémur y la tibia; estos resultados fueron de mayor incidencia y/o gravedad en animales a los que se les administró LY2109761 en comparación con el anticuerpo pan-TGF β .

Tabla 22. Resultados del corazón microscópicos en los animales que recibieron el anticuerpo Pan-TGF β

		Anticuerpo Pan-TGFβ				
		Nivel de dosis (mg/kg/día)	0	3	30	100
Corazón						
<u>Válvulas del corazón</u>						
	Valvulopatía					
		Mínimo	0	2	0	0
		Leve	0	2	4	5
		Moderado	0	0	1	0
<u>Atrio</u>						
	Infiltrado, célula mixta					
		Mínimo	0	0	1	2
		Leve	0	0	1	1
	Hiperplasia, endotelio					
		Mínimo	0	0	3	1
	Hemorragia					
		Mínimo	0	0	1	0
<u>Miocardio</u>						
	Degeneración/ necrosis					
		Leve	0	0	0	2
	Hemorragia					
		Mínimo	0	0	2	1
		Leve	0	0	1	1
	Infiltrado, célula mixta, base					
		Leve	0	0	0	1
<u>Arteria coronaria</u>						
	Necrosis con hemorragia					
		Moderado	0	0	0	1
	Infiltrado, célula mixta, perivascular					
		Leve	0	0	0	1

[0799] Como se muestra en la **FIG. 26A**, los animales a los que se les administró anticuerpo pan-TGF β exhibieron toxicidades similares a las descritas en animales a los que se les administró LY2109761 como se describe en PCT/US2018/012601. Específicamente, los animales a los que se les administró ≥ 3 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β mostraron resultados en la válvula cardíaca (p. ej., valvulopatía) similares a los descritos en los animales a los que se les administró LY2109761. Los animales a los que se les administró ≥ 30 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β mostraron resultados en el atrio similares a los descritos en los animales a los que se les administró LY2109761. Los animales a los que se les administró 100 mg/kg del anticuerpo pan-TGF β mostraron resultados de miocardio similares a los descritos en los animales a los que se les administró LY2109761, y los animales a los que se les administró 30 mg/kg de anticuerpo pan-TGF β tuvieron hemorragia en el miocardio. Un animal al que se le administraron 100 mg/kg

- del anticuerpo panTGFβ presentó necrosis intramural moderada con hemorragia en una arteria coronaria, que se asoció con infiltrados de células inflamatorias mixtas perivasculares leves. Los resultados óseos en animales a los que se les administró el anticuerpo pan-TGFβ y LY2109761 consistieron en un esternón macroscópico de forma anormal y un aumento microscópico de espesor de la zona hipertrófica en la placa terminal del esternón y la fisis del fémur y la tibia.
- 5 Los estudios posteriores con LY2109761 y pan-TGFβ como se muestra en las **FIGS. 26B y 26C** también demostraron toxicidades similares. Las valvulopatías cardíacas observadas en animales tratados con inhibidores-pan de TGFβ caracterizados por engrosamiento de la válvula cardíaca debido a hemorragia, hiperplasia endotelial, infiltrado de células inflamatorias mixtas y/o hiperplasia estromal son consistentes con resultados previamente informados.
- 10 **[0800]** Por el contrario, a diferencia del anticuerpo pan-TGFβ o los animales tratados con LY2109761, las ratas a las que se les administró inhibidores selectivos de TGFβ1, a saber, Ab3 o Ab6, el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) de ambos Ab6 y Ab3 en estos estudios fue la dosis semanal de 100 mg/kg, la dosis más alta probada. Como se muestra en la **FIG. 26B**, Solo se produjeron resultados leves o mínimos en las válvulas cardíacas en un pequeño número de
- 15 animales tratados con Ab3, y estos resultados se consideraron poco probables relacionados con el artículo de prueba debido a la baja incidencia (animal y número de válvulas cardíacas dentro de un animal), falta de una respuesta a la dosis o correlación a la misma y/o falta de resultados óseos concurrentes. Además, no se produjeron resultados en animales tratados con Ab6 (**FIG. 26C**).
- 20 **[0801]** El análisis de farmacocinética mostró que las concentraciones séricas de Ab6 alcanzaron 2.300 µg/ml en los animales que recibieron dosis de 100 mg/kg durante 4 semanas. Las concentraciones séricas medias de Ab6 al final del estudio (el día 29) alcanzaron 2,3 mg/ml para la dosis más alta evaluada de 100 mg/kg. Estos resultados sugieren que la inhibición selectiva de la activación de TGFβ1 parece evitar la toxicidad limitante de dosis clave a dosis muy superiores a las requeridas para el efecto terapéutico observado en múltiples modelos in vivo.
- 25 **[0802]** En resumen, los animales tratados con Ab3 o Ab6 en todas las dosis probadas (3mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg) durante un período de 4 semanas en ratas (una especie que se sabe que es sensible a la inhibición de TGFβ) no exhibieron efectos tóxicos sobre el fondo en ninguno de los siguientes parámetros: degeneración o necrosis del miocardio, hemorragia auricular, hemorragia miocárdica, hemorragia valvular, hiperplasia del endotelio valvular, hiperplasia del estroma valvular, infiltrados mixtos de células inflamatorias en válvulas del corazón, mineralización, necrosis con
- 30 hemorragia en arteria coronaria, necrosis con inflamación en la raíz aórtica, necrosis o infiltrado de células inflamatorias en cardiomiocitos y valvulopatía. Por lo tanto, el tratamiento con inhibidores específicos de isoformas de la activación de TGFβ1 resultó sorprendentemente en perfiles de seguridad significativamente mejorados, por ejemplo, mortalidad reducida, cardiotoxicidad reducida y resultados óseos reducidos en comparación con el tratamiento con inhibidor de pan-TGFβ (p. ej., el inhibidor de quinasa ALK5 LY2109761 o el anticuerpo pan-TGFβ).
- 35 **[0803]** El estudio de toxicología de GLP también se llevó a cabo en primates no humanos (monos cynomolgus) para evaluar perfiles de seguridad de la alta afinidad, inhibidor selectivo de TGFβ1, Ab6. El protocolo implicó una dosis repetida de 4 semanas a 30, 100 y 300 mg/kg por semana, seguida de una recuperación de 4 semanas.
- 40 **[0804]** El Ab6 se toleró bien a 30, 100 y 300 mg/kg/semana. No se observaron resultados adversos relacionados con Ab6 en las cohortes principal y de recuperación. No se observaron resultados relacionados con Ab6 en órganos diana que son sitios de toxicidades observadas con inhibidores de pan-TGFβ (p. ej., sin cardiotoxicidades, hiperplasia e inflamación, resultados dentales y gingivales).
- 45 **[0805]** Las concentraciones séricas de AB6 alcanzaron 15.600 µg/ml después de 5 dosis semanales de 300 mg/kg. Al final del tiempo de recuperación, los niveles de concentración sérica de Ab6 se mantuvieron altos en alrededor de ~2.000 - 3.000 µg/mL.
- 50 **[0806]** En base a estos datos, el NOAEL para Ab6 en monos cynomolgus es de 300 mg/kg/semana, que es la dosis más alta probada.
- [0807]** Un estudio similar de seguridad de toxicología de rata de 4 semanas de edad en ratas DS también se realizó para probar la seguridad de Ab2 en comparación con un inhibidor de ALK5, un anticuerpo pan-TGFβ, y Ab3 (ver las **FIGS. 26D y 26E**). Como se muestra en la **FIG. 26E**, los animales tratados con Ab3 o Ab2 en todas las dosis probadas (10 mg/kg,
- 55 30 mg/kg o 100 mg/kg) durante un período de 4 *semanas* no presentaron efectos tóxicos sobre el fondo en ninguno de los siguientes parámetros: degeneración del miocardio o necrosis, hemorragia auricular, hemorragia miocárdica, hemorragia valvular, hiperplasia del endotelio valvular, hiperplasia del estroma valvular, infiltrados mixtos de células inflamatorias en las válvulas cardíacas, mineralización, necrosis con hemorragia en la arteria coronaria, necrosis con inflamación en la raíz aórtica, necrosis o infiltrado de células inflamatorias en el cardiomiocito y valvulopatía. El NOAEL para Ab2 (en ratas DS) fue una dosis semanal de 100 mg/kg, la dosis más alta probada. Por tanto, el tratamiento con inhibidores específicos de isoformas de la activación de TGFβ1 resultó sorprendentemente en perfiles de seguridad significativamente mejorados, por ejemplo, mortalidad reducida, cardiotoxicidad reducida y resultados óseos reducidos en comparación con la inhibición de pan-TGFβ.
- 60

Ejemplo 20. Efecto de inhibidores TOP β 1 sobre las células citotóxicas en tumores de MBT2

[0808] Exocitosis granual es un mecanismo por el cual las células T citotóxicas se acoplan y matan células tumorales residentes. Tras la activación, los granulados se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido, incluidas las citotoxinas, como la perforina y la granzima B, lo que da como resultado la eliminación de las células tumorales. Además, el antígeno CD8 (CD8a) es una glicoproteína de la superficie celular que se encuentra en la mayoría de las células T citotóxicas y que actúa como correceptor con el receptor de las células T. Por consiguiente, se midieron los niveles de CD8a, Perforina y Granzima B en tumores tratados con Ab3 o Ab6, cada uno en combinación con anti-PD-1, para evaluar la actividad de las células T efectoras.

Métodos

[0809] Ratones hembra C3H/HeN de 8-12 semanas de edad se implantaron con 5×10^5 MBT2 células tumorales en el flanco. Los animales fueron asignados al azar a grupos de dosificación con un tamaño medio de tumor de 40-80 mm³ antes del tratamiento de iniciación. Se dosificó anti-PD1 (RMP1-14) dos veces por semana a 10 mg/kg. Se dosificó Ab3 una vez a la semana a 30 mg/kg. Después de 8 días de dosificación, 8 horas después de la dosis final (tres dosis totales de anti-PD1, dos dosis totales de Ab3) se sacrificaron los animales y se extirparon los tumores. Para Ab6, la contextura inmune fue analizada el día 10 o el día 13 después del tratamiento. Se dosificó anti-PD-1 a 10 mkg dos veces por semana. Se dosificó Ab6 semanalmente a 10 mkg. Los tumores se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, se pulverizaron en bolsas Covaris usando un impactador cryoPREP y se extrajo el ARN usando Trizol/Cloroformo. Se generó ADNC usando Taqman Fast Advanced Master Mix y se cargó cADN en una tarjeta Taqman Array personalizada con cebadores y sondas dirigidas contra genes de interés. La qPCR se ejecutó en un termociclador Vii7. La expresión de los genes CTL se normalizó a HPRT por cada muestra y el cambio de veces se expresó en anti-PD1/Ab3 o anti-PD1/Ab6 frente a anti-PD1 solo.

Resultados

[0810] La combinación de anti-PD1/Ab3 indujo una potente regulación positiva de los genes CTL asociados con la respuesta antitumoral sobre anti-PD1 solo dentro del tumor (véase la **FIG. 31**). En el modelo de tumor MBT2, el anti-PD1 solo proporcionó muy poca supresión del crecimiento tumoral y de la inmunidad antitumoral. Por tanto, estos resultados indican que la adición de anticuerpos anti-TGF β permite la activación e infiltración completa de las células T CD8 efectoras.

Ejemplo 21: Efecto de Ab3 y Ab6 sobre la actividad de Treg in vitroMétodos

[0811] PBMC humanas fueron aisladas de plasma coagulado donante sano con Ficoll. Se seleccionaron las células CD4 a través de la selección magnética y luego CD25⁺CD127^{lo} Tregs fueron ordenados Clon BC96 (ThermoFisher) se utilizó para CD25^{hi} y clon HIL 7RM21 (BD Bioscience) se utilizó para CD127^{lo}, usando un Biorad S3E. Las Treg clasificadas se estimularon 1 semana con anti-CD3 unido a placa (clon OKT3, Biolegend) y anti-CD28 soluble (clon 28,2, Biolegend) en medio TexMacs (Miltenyi). En algunos estudios, se añadió adicionalmente IL2 para regular al alza la expresión de GARP y pro-TGF β . Las Treg se cultivaron conjuntamente 1:1 con células T CD4 autólogas teñidas con Cell Trace Violet (Invitrogen) y se estimularon de nuevo con anti-CD3/anti-CD28 durante cinco días. Después de 5 días, se midió la división celular mediante citometría de flujo (citómetro de flujo Attune, ThermoFisher Scientific), con la dilución del tinte Cell Trace Violet y se analizó con FlowJo (BD Bioscience).

Resultados

[0812] Durante 5 días en cultivo, el 80% de las células T efectoras CD4 (Teffs) se habían dividido. La adición de Tregs 1:1 suprimió la división de Teff hasta casi el 15% y la adición adicional de Ab3 a 10 μ g/ml suprimió completamente la inhibición de la división de efector T mediada por Treg (véanse las **FIGS. 32A y 32B**). 1 μ g/ml de Ab3 inhibió con menor potencia la supresión de Treg. Tanto 1 μ g/ml como 10 μ g/ml de Ab6 inhibieron igualmente el TGF β derivado de Treg. Por lo tanto, Ab6 parece ser un inhibidor más potente de TGF β 1 de activación del complejo GARP-proTGF β 1 en Tregs.

Ejemplo 22: Efectos del tratamiento de combinación Ab6/anti-PD-1 sobre poblaciones de células inmunitarias intratumorales/contextura en tumores MBT2

[0813] Para comenzar a dilucidar diversas poblaciones de células inmunitarias que pueden mediar los efectos de regresión tumoral observados en ratones tratados con una combinación de anti-PD-1 y Ab6, se utilizó el modelo de tumor MBT2 para los estudios FACS. El diseño del estudio se resume a continuación.

Tabla 23. Diseño del estudio de contextura inmunitaria del tumor MBT2

Grupo	Descripción del Grupo	Programa de dosificación	Colecciones y análisis de muestras
1	IgG de control anti-PD1 + IgG de control de Ab6 (n=12)	Igual que los Grupos 2 y 3 (ver más abajo)	Para cada grupo: i) Tumores completos de 6 animales para citometría de flujo (FIGS. 33-35) Para los 6 animales restantes: ii) ½ tumor cada uno para análisis de ARN (FIGS. 27 y 28) iii) ½ tumor cada uno para IHC (FIGS. 36A-D y F)
2	Ab6 (n=12)	10 mg/kg los días 1 y 8 (10 mg/kg/semana)	
3	Anti-PD1 (n=12)	10 mg/kg los días 1, 4, 8 y 11 (20 mg/kg/semana)	
4	Ab6 + anti-PD1 (n=12)	Igual que los Grupos 2 y 3 (ver arriba)	

[0814] Cada grupo de estudio contenía 12 ratones con tumores MBT2 como se describe en el presente documento. El grupo de tratamiento con Ab6 recibió el anticuerpo semanalmente, el día 1 y el día 8, a 10 mg/kg. El grupo de tratamiento anti-PD1 se trató cada dos semanas a 10 mg/kg por inyección, los días 1, 4, 8 y 11, en total 20 mg/kg por semana. Cada grupo de control de IgG se trató en consecuencia para coincidir con el subtipo de IgG de anti-PD1 y Ab6. El día 13, se recogieron los tumores de los ratones como se muestra arriba.

[0815] **Análisis de citometría de flujo:** Subconjuntos de células inmunitarias asociadas a tumor también se analizaron por citometría de flujo de tumores en tumores de MBT-2. Brevemente, los tumores se extirparon y pesaron antes de la disociación usando el kit de disociación de tumores para gentleMACS (Miltenyi). Las muestras se filtraron a través de un colador de células de 70 µm para eliminar los agregados. Las células singlete Lve se lavaron con tampón FAC antes de aplicar el cóctel de tinción que contenía: MuTruStain FCX (Biolegend), Anti-FcyRIV (Biolegend), vivo/muerto (ThermoFisher), CD45-AF700 clon 30-F11 (Biolegend), CD3-PE clon 17A2 (Biolegend), CD4-BUV395 clon GK1,5 (BD Biosciences), CD8-APC-H7 clon 53-6,7 (BD Biosciences), CD11b-PerCP-Cy5,5 clon M1/70 (Biolegend), GR-1-FITC clon RB6-8C5 (Biolegend), FoxP3-APC clon FJK-16s (ThermoFisher), F4/80-PE-Dazzle clon BM8 (Biolegend), CD206-BV421 clon C068C2 (Biolegend). La citometría de flujo se realizó en un Attune NxT (ThermoFisher) y se analizó con FlowJo (BD Bioscience).

[0816] La estrategia de apertura de puerta a subpoblaciones de células T en los tumores elucidate MBT2 se proporciona en la **FIG. 33A**. Los resultados se resumen en la **FIG. 33B**, medidos en tumores recogidos el día 13 después del inicio del tratamiento. Como se demostró, el Ab6 usado junto con anti-PD1 pudo superar la exclusión inmunitaria al permitir la infiltración y expansión de las células T CD8+ en los tumores. Específicamente, la combinación anti-PD1/Ab6 indujo un aumento significativo en el número (frecuencias) de células T CD8+ intratumorales, mientras que no se observaron cambios en el % de células CD45+ del total de células vivas entre los grupos de tratamiento. La combinación de anti-PD1/Ab6 provocó un aumento significativo de Tregs; sin embargo, la relación CD8+:Treg no cambia significativamente, en relación con el tratamiento anti-PD1.

[0817] En la **FIG. 34A** se proporciona una estrategia de apertura de puertas para dilucidar las subpoblaciones de células mieloides. Los resultados se resumen en la **FIG. 34B**, medidos en tumores recogidos el día 13 después del inicio del tratamiento. El infiltrado mieloides del día 13 muestra que el número de células inmunitarias totales (p. ej., CD45+) permanece estable en todos los grupos de tratamiento. El número de células mieloides totales (p. ej., CD11b+, F4/80^{lo-hi}) se alteró significativamente por el tratamiento anti-PD1/Ab6. Específicamente, en el grupo de control, la fracción mieloides constituyó casi el 75% de las poblaciones de macrófagos en el tumor. Esta fracción se redujo a menos de la mitad en el grupo de tratamiento combinado, lo que coincidió con una marcada reducción en el número (frecuencias) de macrófagos protumor tipo M2, así como una eliminación casi completa de la fracción MDSC en este grupo, mientras que los macrófagos de tipo M1 se mantuvieron relativamente sin cambios.

[0818] Entre las subpoblaciones mieloides de células, los macrófagos M2 asociados a tumores MBT-2 mostraron expresión en la superficie celular alta de LRRC33 (**FIG. 34C**). Las subpoblaciones de MDSC también mostraron una fuerte expresión de LRRC33. La mayoría (67,8%) del subtipo G-MDSC aislado de LRRC de superficie celular expresada en tumor MBT-2, mientras que aproximadamente un tercio del subtipo MDSC aislado de LRRC33 de superficie celular expresada en tumor MBT-2 (**FIG. 34D**).

[0819] Además, hubo un aumento dramático en la proporción de células T CD8+: macrófagos M2 observados en el grupo de tratamiento anti-PD1/Ab6 (véase la **FIG. 35C**). Tomados en conjunto, los datos demuestran que los inhibidores selectivos de isoformas de TGFβ1 pueden usarse para superar la exclusión inmunitaria del tumor cuando se usan junto con una terapia de bloqueo de puntos de control. Esto puede estar mediado, al menos en parte, por la promoción de la infiltración y expansión de las células T CD8+, al tiempo que reduce los macrófagos pro-tumorales (M2) y las MDSC inmunosupresoras en el entorno del tumor. Es posible que estos efectos puedan estar mediados por el brazo GARP y el brazo LRRC33 de TGFβ1, respectivamente.

[0820] Para el análisis inmunohistoquímico, tumores de seis animales se cortaron en mitades y se fijaron. Se prepararon secciones para IHC y se tiñeron con varios marcadores de células inmunitarias. **FIG. 36** proporciona imágenes representativas el día 10 o el día 13. Como se muestra, se observó un marcado aumento en la frecuencia de células T

CD8+ dentro del tumor en el grupo tratado con la combinación anti-PD1/Ab6 (**FIG. 36D**). Los datos indican que Ab6 puede usarse junto con una terapia de bloqueo de puntos de control para superar la exclusión inmunitaria induciendo la infiltración y expansión de células T citotóxicas. **FIG. 36E** proporciona la cuantificación de los datos de IHC, que se muestran como % de células CD8 positivas del núcleo total. En este modelo de tumor, estaban presentes pocas células CD8+ basales (p. ej., tumor "frío"). En los grupos tratados con Ab6 solo o anti-PD-1 solo, se observó un ligero aumento en el porcentaje de CD8+ (cada uno de ~10%). Por el contrario, en el grupo tratado con combinación, se logró un aumento de mercado en la frecuencia de células CD8+ dentro del tumor, lo que indica que la inhibición de TGFβ1 en combinación con la inhibición del punto de control puede provocar sinérgicamente efectos antitumorales superando la exclusión inmunitaria. Los datos sugieren que la combinación puede convertir eficazmente un tumor "inmuno-excluido" en un tumor "inflamado/caliente".

[0821] Para confirmar los cambios en la expresión génica que correlacionan la respuesta inmunitaria observada en los tumores MBT2, se realizó un análisis de expresión de ARN. Las preparaciones de ARN de los tumores MBT2 del día 13 se sometieron a análisis de expresión génica basado en qPCR. Para el estudio se utilizó ARN preparado a partir de 5-6 animales por grupo. Los análisis incluyeron niveles de expresión de los siguientes genes, usados como marcador indicado: Ptprc (CD45); Cd8a (célula T CD8); Cd8b1 (célula T CD8); Cd4 (célula T CD4); Cd3e (célula T); Foxp3 (Treg); Ifng (inmunidad Th1); Prf1 (proteína CTL); Gzmb (proteína CTL); Gzma (proteína CTL); Klrk1 (NK/CTL); Adgre1 (macrófago F4/80); MrC1 (macrófago M2); Cd163 (macrófago M2); Cd80 (coestimulación APC/macrófago M1); PtgeR2 (angiogénesis tumoral); Nrros (LRRC33); Tgfb1 (tolerancia inmune); 18S (constitutivo); y Ppib (constitutivo).

[0822] Las **FIGS. 37A-37D** proporcionan cambios en la expresión de genes de respuesta inmunitaria de Ptprc, CD8a, CD4 y Foxp3, respectivamente. El tratamiento de combinación anti-PD1/Ab6 indujo aumentos significativos en el nivel de estos transcritos en tumores MBT2. Estas observaciones confirman que el tratamiento anti-PD1/Ab6 provoca un influjo masivo de células T CD8+, armadas con proteínas efectoras citotóxicas como la perforina y la granzima.

[0823] Las **FIGS. 38A-38C** proporcionan cambios de expresión génica en marcadores inmunes, Ifng, Gzmb, Prf1 y Klrk1 el día 10 o el día 13. Como se muestra, los análisis de pPCR de estos genes marcadores demuestran que el tratamiento combinado de anti-PD-1 e inhibidor de TGFβ1 induce expresión génica de marcadores de proteínas citolíticas (Granzima B y Perforina), inmunidad Th1 (IFNγ) y marcador de células CTL/NK (Klrk1) en el tumor. Estos datos proporcionan pruebas adicionales que apoyan los efectos sinérgicos de la inhibición del punto de control y la inhibición del TGFβ1 que median los efectos antitumorales.

[0824] En resumen, estos resultados muestran colectivamente movilización robusta de la inmunidad anti-tumor provocada por el bloqueo de puesto de control e inhibición de TGFβ1. Específicamente, mientras que la fracción de células inmunitarias que infiltran el tumor en general permanece constante en todos los grupos de tratamiento, la combinación anti-PD-1/Ab6 causa a) un aumento significativo en las células T CD8+ intratumorales (* P<0,05, prueba T de dos lados versus grupo anti-PD-1); b) aumento significativo en Tregs (* P<0,05), sin embargo, la relación CD8+: Treg no cambia (ns, no significativa frente a anti-PD-1); y, c) reducción significativa de las células mieloides en comparación con cualquier otro grupo, impulsada por una reducción de las poblaciones de células inmunosupresoras de macrófagos M2 y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) (* P<0,05, 146 prueba T de dos caras frente al grupo anti-PD-1). El análisis de PCR cuantitativo de lisados tumorales completos confirma un fuerte aumento en los genes efectores de CD8. De manera similar, la combinación de anti-PD-1 y Ab6 induce un marcado aumento en la frecuencia de células T CD8+ dentro de la masa tumoral, superando la exclusión inmunitaria.

[0825] Para confirmar efectos sobre la señalización de TGFβ1 corriente abajo, los análisis inmunohistoquímicos adicionales se llevaron a cabo para detectar y localizar fosforilados SMAD3 en tumores MBT2. Como se muestra en la **FIG. 36F** se encontró que FosfoSMAD3 estaba enriquecido cerca del endotelio vascular dentro de los tumores tratados con anti-PD-1. El tratamiento con Ab6 anula esta señal, lo que respalda la idea de que la inhibición de TGFβ1 puede promover la infiltración de células inmunitarias intratumorales, convirtiendo así un tumor inmuno-excluido en un tumor inflamado que responde al bloqueo del punto de control.

[0826] Los animales tratados con anti-PD-1 muestran algunas células T CD8+ infiltrantes asociadas estrechamente con la vasculatura del tumor (tinción de CD31; marcador endotelial). El tratamiento combinado apoya una mayor infiltración de células T. La proximidad de las células T CD8+ al endotelio vascular sugiere que las células T pueden infiltrar el tumor desde la vasculatura intratumoral. La relación entre las áreas CD8 positivas del tumor y la distancia de la vasculatura CD31 positiva se muestra en la **FIG. 36G**. El histograma demuestra que el tratamiento combinado (inhibición de TGFβ1 y bloqueo del punto de control) aumenta la fracción de área CD8+ especialmente en áreas que están distantes de los vasos sanguíneos, lo que sugiere que la inhibición de TGFβ1 promueve la infiltración de células CD8+ en el tumor a través de la vasculatura, superando de manera efectiva o revertiendo la inmunosupresión.

Ejemplo 23: Efectos de inhibidores de TOPβ1 independientes de contexto selectivos para isoformas en el modelo MPL de trastorno mieloproliferativo

[0827] El modelo MPLW515L preclínico de la mielofibrosis se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Wen et al., Nature Medicine volumen 21, páginas 1473-1480 (2015)). En resumen, los ratones receptores se irradian letalmente y posteriormente se trasplantan con células de la médula ósea del donante transducidas con el receptor de trombopoyetina humano MPL que tiene una mutación de activación constitutiva en W515L (MPLW515L). Los ratones receptores en este

modelo desarrollarán leucocitosis, policitemia y trombocitosis en 2-3 semanas.

[0828] Para evaluar los efectos de inhibición selectiva para TGFβ1 en el modelo murino de la mielofibrosis, un inhibidor independiente de contexto, de alta afinidad, específico a isoformas de TGFβ1 (Ab6) fue probado en el modelo MPL^{W515L}. Brevemente, se trasplantaron medio millón de células MPL+ ckit+ en ratones hembra BALB/c de 8-10 semanas de edad. Después de 3 semanas, los ratones receptores recibieron inyecciones i.p. semanales de Ab6 a 10 o 30 mg/kg/semana, o IgG de control negativo (30 mg/kg/semana) durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los ratones se sacrificaron 24 h después de la última dosis.

[0829] Se realizó histopatología de la médula ósea para evaluar el efecto antifibrótico de Ab6, evaluado mediante tinción con reticulina. Los datos preliminares indican que las secciones de médula ósea tomadas de los animales tratados con Ab6 mostraron un efecto antifibrótico. Las imágenes recogidas de la tinción con reticulina de secciones representativas de médula ósea se proporcionan en la **FIG. 42A**. Se observó una reducción aparente de las fibras de reticulina (principalmente colágeno III) en ratones que recibieron Ab6 a 10 y 30 mg/kg semanalmente. También se observaron efectos antifibróticos similares, pero de menor grado, con un segundo anticuerpo de inhibidor selectivo de TGFβ1 probado (datos no mostrados).

[0830] Para el análisis cuantitativo basado en la puntuación de fibrosis realizada por patólogos de secciones de médula ósea, la tinción de reticulina se puntuó utilizando un sistema de clasificación publicado por la OMS (Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A et al. Primary myelofibrosis In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds.) WHO Classifications of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4^a ed. IARC Press: Lyon, Francia, 2008, págs. 44-47). Brevemente, las secciones histológicas se puntúan usando un sistema de cuatro niveles (MF-0, MF-1, MF-2 y MF-3). Una puntuación de MF-0 indica reticulina lineal dispersa sin intersecciones (cruces), correspondiente a la médula ósea normal. Una puntuación de MF-1 indica una red suelta de reticulina con muchas intersecciones, especialmente en áreas perivasculares. Una puntuación de MF-2 indica un aumento difuso y denso de reticulina con intersecciones extensas, ocasionalmente con haces focales de colágeno y/o osteosclerosis focal. Una puntuación de MF-3 indica reticulina densa y difusa con intersecciones extensas y uniones gruesas de colágeno, a menudo asociadas con osteosclerosis.

[0831] Las puntuaciones de fibrosis se proporcionan en la **FIG. 42B**, que indica un efecto antifibrótico dependiente de la dosis de Ab6, en comparación con los animales que recibieron IgG de control. El gráfico de la izquierda muestra las puntuaciones de fibrosis del primer estudio (Estudio 1) en donde los animales con alta carga de enfermedad (>50%) al inicio del tratamiento fueron tratados con Ab6 o IgG de control como se muestra. El estudio se repitió (Estudio 2). Los datos combinados se presentan en el gráfico de la derecha. La dosificación semanal de 30 mg/kg de Ab6 redujo significativamente la fibrosis.

[0832] Los animales se evaluaron también para diversos parámetros hematológicos, por ejemplo, recuento sanguíneo completo (CBC) después de trasplante de médula ósea (incluyendo glóbulos blancos (WBC), plaquetas (PIT), hemoglobina (Hb) y hematocrito (HCT)) usando técnicas estándar (**FIGS. 42C y 42D**). Como era de esperar, después de 4 semanas de inicio del tratamiento, los ratones MPL tratados con control de IgG parecen manifestar anomalías hematológicas características de la mielofibrosis, que incluyen niveles aumentados de WBC y Plt. Los animales tratados con Ab6 mostraron una tendencia dependiente de la dosis hacia la normalización de las concentraciones de WBC, Plt y HB, así como un cambio sobre la línea de base, en comparación con los animales de control IgG. Además, los animales tratados con Ab6 mostraron una normalización estadísticamente significativa de las concentraciones de HCT, así como un cambio con respecto a la línea de base, en comparación con los animales de control de IgG, donde los niveles de Hct parecían restaurarse a la línea de base a las 4 semanas.

Ejemplo 24: Efectos del inhibidor de TOPβ1 de alta afinidad sobre el modelo de carcinoma de mama singénico EMT-6

[0833] El cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres en los Estados Unidos y es la cuarta causa principal de muerte por cáncer. Como se muestra en la **FIG. 25D** (izquierda) y **FIG. 41**, los tumores EMT6 expresan niveles significativos de TGFβ1 y TGFβ3 (p. ej., TGFβ1 y TGFβ3 codominantes), a diferencia de muchos tumores que expresan predominantemente TGFβ1. La contribución de TGFβ3 en estos tumores a la exclusión inmunitaria y la resistencia a la TCC no ha sido clara.

[0834] Anteriormente, se demostró que Ab3 (un inhibidor de TGFβ1 sesgado por contexto y selectivo de isoformas) mostraba efectos parciales sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor en este modelo, como se describe en el documento WO 2018/129329.

[0835] En estos estudios, los efectos de una combinación de un inhibidor de TGFβ1 selectivo para isoformas y un inhibidor de TGFβ3 selectivo para isoforma se evaluó en el modelo de EMT6, en conjunción con un inhibidor de punto de control inmune. Se razonó que debido a que este tumor es codominante con las isoformas de TGFβ1 y TGFβ3, dicha terapia de combinación podría mostrar eficacia en la regresión tumoral, mientras que se planteó la hipótesis de que cualquiera de los inhibidores selectivos de isoforma solos (TGFβ1 o TGFβ3) junto con un inhibidor de punto de control, debería producir un efecto parcial en la inhibición del crecimiento tumoral.

[0836] Los tumores EMT6 se implantaron subcutáneamente. El tratamiento comenzó cuando los tumores EMT6 alcanzaron los 30-80 mm³. Se dosificó Anti-PD-1 a 10 mkg dos veces por semana. Se dosificó Ab6 una vez a la semana a 10 mkg. El anticuerpo neutralizante anti-TGFβ3 se dosificó a 30 mkg una vez a la semana.

5 **[0837]** Los respondedores se definen como aquellos que logran el tamaño del tumor de <25% del volumen de punto final al final del estudio.

10 **[0838]** Sorprendentemente, Ab6, inhibidor selectivo de isoformas de TGFβ1, de alta afinidad, se utiliza en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, fue suficiente para superar la resistencia de punto de control de inhibición en EMT6. **FIG. 40A** muestra los efectos de Ab6 y/o anti-PD-1 sobre el crecimiento tumoral. Ninguno de los anticuerpos logró una regresión tumoral significativa cuando se usó solo. Sin embargo, en combinación, el 50% de los animales tratados (5 de 10) lograron una regresión tumoral significativa (reducción al 25% o menos del volumen del tumor de punto final). Estos datos muestran una eficacia antitumoral sinérgica, como lo demuestran los respondedores completos o el retraso del crecimiento tumoral, en grupos de terapia de combinación. Inesperadamente, la adición de un inhibidor selectivo de isoformas de TGFβ3 no produjo efectos añadidos. La observación de que la inhibición de la isoforma de TGFβ1 con Ab6 fue suficiente para sensibilizar los tumores a anti-PD-1, incluso en presencia de TGFβ3 intratumoral, apoya la hipótesis de que TGFβ1 es la isoforma que impulsa a la señalización asociada a TGFβ, exclusión inmunitaria y resistencia primaria a CBT.

20 **[0839]** En consecuencia, la terapia de combinación (TGFβ1 + anti-PD-1) logró un beneficio de supervivencia significativo en los animales tratados, en comparación con anti-PD-1 solo (***, P<0,001 prueba de rango logarítmico) (ver **FIG. 40B**). 56 días después del inicio del tratamiento, el 60% de los animales estaban vivos en el grupo de combinación, mientras que en los otros grupos de tratamiento, todos los animales habían muerto o tenían que ser sacrificados el día 28.

25 **[0840]** Un estudio separado (Estudio 2), también mostró una mejora significativa en la supervivencia en animales con tumores EMT6 TGFβ1/3 positivos tratados con una combinación de Ab6 y anti-PD-1, pero no en animales con cualquiera de los anticuerpos solos (**FIG. 40C**). En este modelo, detuvimos el tratamiento y se siguió a los supervivientes sin tumor EMT-6 durante 6 semanas sin dosificación (recuadro gris). Seis semanas después del cese de la dosificación, los respondedores completos permanecieron libres de tumor, demostrando de nuevo la durabilidad de la respuesta (**FIG. 40C**, derecha). El número informado es el número de animales sin tumor medible al final del estudio. Se observaron beneficios de supervivencia significativos del tratamiento de combinación (Ab6 + anti-PD-1), en comparación con los animales tratados con anti-PD-1 solo (**FIG. 40D**).

Ejemplo 25: Expresión de la proteína recombinante

35 **[0841]** Las proteínas recombinantes se expresaron en células Expi293F™ (Thermo Fisher) transfectadas transitoriamente con plásmidos pTT5 (NRC Canadá) que contiene el ADNc de interés. Se generaron grandes complejos de TGFβ latente cotransfectando células Expi293F™ con un plásmido que codifica proTGFβ1, proTGFβ2 o proTGFβ3, y un plásmido que codifica una proteína presentadora de LLC. Fragmentos LTBP que contienen el dominio TB3 de unión a TGFβ y de acompañamiento de dominios de tipo EGF fueron utilizados para mejorar los rendimientos y la calidad de las proteínas más LTBP de longitud completa (E873 a 11507 para LTBP1 humano; D866 a E1039 para LTBP3 humano). Los fragmentos de LTBP tenían una etiqueta His C-terminal para facilitar la purificación. Se prepararon líneas celulares Expi293 estables que expresaban ectodominios GARP o LRRC33 etiquetados con His en el extremo C-terminal. Estas células estables se transfectaron transitoriamente con un plásmido que codifica proTGFβ1 para generar complejos GARP o LRRC33 con TGFβ1 latente. Los complejos pequeños de TGFβ latente se expresaron con una etiqueta His N-terminal y la cisteína formadora de complejos latentes grandes mutada a serina (C4S en TGFβ1, C5S en TGFβ2 y C7S en prodominios TGFβ3). Los factores de crecimiento activos de TGFβ se adquirieron de R&D Systems. Los transfectantes se cultivaron en medio de expresión Expi293™ (Thermo Fisher) durante 5 días antes de que se recogiera el sobrenadante acondicionado. Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad Ni2 + seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La calidad de la proteína y la formación de complejos con enlaces disulfuro se confirmaron mediante SDS PAGE y SEC analítico. Los anticuerpos se expresaron mediante cotransfección de células Expi293F™ con plásmidos pTT5 que codifican cadenas ligeras y pesadas de interés. Los anticuerpos IgG4 humana e IgG1 de ratón se purificaron mediante captura de Proteína A seguida de SEC. La identidad de los anticuerpos que se utilizaron en modelos animales se confirmó mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 26: Modelos singénicos de ratón

60 **[0842]** Los modelos murinos se realizaron en Charles River Discovery Labs en Morrisville, NC según IACUC. Para el modelo MBT-2, se anestesiaron ratones hembra C3H/HeN (Charles River) de 8-12 semanas de edad con isoflurano para implantar 5 x 10⁵ células tumorales MBT-2 por vía subcutánea en el flanco. Los animales se distribuyeron en grupos de volúmenes tumorales promedio de 40-80 mm³ de manera que todos los grupos tuvieran promedios y rangos de volumen inicial iguales. Para CloudmanS91, se anestesiaron ratones hembra DBA/2 (Charles River) de 8-12 semanas de edad con isoflurano para implantar 5 x 10⁵ células tumorales CloudmanS91 en matrigel al 50% por vía subcutánea en el costado. Los animales se distribuyeron en grupos cuando el volumen tumoral medio alcanzó los 125-175 mm³, de modo que todos los grupos tenían la misma media y rango de volumen inicial. Para el modelo EMT-6, se implantaron 5 X 10⁶ células tumorales EMT-6 subcutáneamente en el flanco de ratones hembra BALB/c de 8-12 semanas de edad (Charles River).

Los animales se distribuyeron en grupos de volumen inicial medio entre 30-60 mm³ de modo que todos los grupos tuvieran la misma media y rango de volumen inicial. El control HuNeg-rlgG1 o anti-PD-1 (RMP1-14; BioXCell) se dosificaron a 10 mg/kg dos veces por semana. Se dosificó Ab6-mIgG1 o el anticuerpo de control HuNeg-mIgG1 al nivel de dosis indicado una vez a la semana. Todos los anticuerpos se dosificaron por vía intraperitoneal. El volumen del tumor se midió dos veces por semana y los animales se sacrificaron por asfixia con CO₂ cuando los tumores alcanzaron 1200 mm³ (MBT-2, EMT6) o 2000 mm³ (CloudmanS91) o tras la ulceración. El volumen tumoral se calculó como mm³ = (W₂ x l)/2. Los respondedores o la tasa de respuesta se definió como un volumen tumoral igual o inferior al 25% del volumen del punto final para ese modelo. La respuesta completa se clasificó como un tumor de menos de 13,5 mm³ para tres o más mediciones consecutivas. Los supervivientes sin tumor no tenían un tumor palpable al final del estudio. Los animales sacrificados debido a la necrosis según IACUC se retiraron por completo del análisis.

[0843] Se tomaron en consideración expresiones relativas de tres isoformas de TGFβ y moléculas presentadoras para la selección de modelos de farmacología preclínica que recapitulan datos clínicos humanos. Los análisis ELISA de las expresiones proteicas relativas de las tres isoformas en MBT-2, S91 y EMT6 se proporcionan en la **FIG. 25G**. Tanto en los tumores MBT-2 como en los S91, TGFβ1 es la isoforma dominante, reflejando la mayoría de los cánceres humanos. EMT-6 todavía mostraba una expresión predominante de TGFβ1, pero también coexpresaba, aunque en menor grado, TGFβ3, que es más similar a lo que se observa en ciertos carcinomas humanos.

[0844] Las cuatro moléculas presentadoras (LTBP1, LTBP3, GARP y LRRC33) se expresan por la ARN en los tumores MBT-2, S91 y EMT-6 (**FIG. 25H**).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a cada uno de los siguientes complejos de antígeno:

- i) LTBP1-proTGF β 1 humano;
- ii) LTBP3-proTGF β 1 humano;
- iii) GARP-proTGF β 1 humano; y
- iv) LRRC33-proTGF β 1 humano;

donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada según SEQ ID NO: 13 y un dominio variable de cadena ligera según SEQ ID NO: 15.

2. El anticuerpo o el fragmento de la reivindicación 1, que es de subtipo humano de IgG4 o IgG1.

3. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, que además comprende un inhibidor de punto de control en el mismo vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica según la reivindicación 3 o 4, para su uso en el tratamiento del cáncer.

6. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis.

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, cuando depende de la reivindicación 3, en donde la composición farmacéutica se usa en combinación con un inhibidor de punto de control.

8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en donde el sujeto tiene resistencia primaria o adquirida a una terapia contra el cáncer, en donde opcionalmente la terapia contra el cáncer es terapia de inhibición de puntos de control, quimioterapia y/o radioterapia.

9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tratamiento comprende la administración de la composición, junto con una terapia adicional contra el cáncer seleccionada del grupo que consiste en un inhibidor del punto de control, quimioterapia y radioterapia y/o vacuna contra el cáncer.

10. La composición farmacéutica, o composición farmacéutica para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 7 o 9, en donde el inhibidor del punto de control se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, una proteína de fusión PD-L1 o PD-L2, un antagonista de CTLA4, un agonista de GITR, un anticuerpo anti-ICOS, un anticuerpo anti-ICOSL, un anticuerpo anti-B7H3, un anticuerpo anti-B7H4, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-CD27, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-41BB, un anticuerpo anti-PD-1, un virus oncolítico, un inhibidor de PARP, Nivolumab, Pembrolizumab, BMS-936559, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Ipilimumab, Tremelimumab, IMP-321, BMS-986016 y Lirilumab.

11. La composición farmacéutica, o composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 10, en donde el inhibidor del punto de control es un antagonista de PD-1 o un antagonista de PD-L1.

12. La composición farmacéutica, o composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 11, en donde el inhibidor del punto de control es un anticuerpo anti-PD-1.

13. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 7-12, en donde el cáncer comprende un tumor sólido.

14. Un método para fabricar una composición farmacéutica que comprende:

- i) proporcionar un anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2;
- ii) formular el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Inhibición de activación de LTP1-proTGFβ por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1
en un ensayo basado en células LN229

FIG. 1A

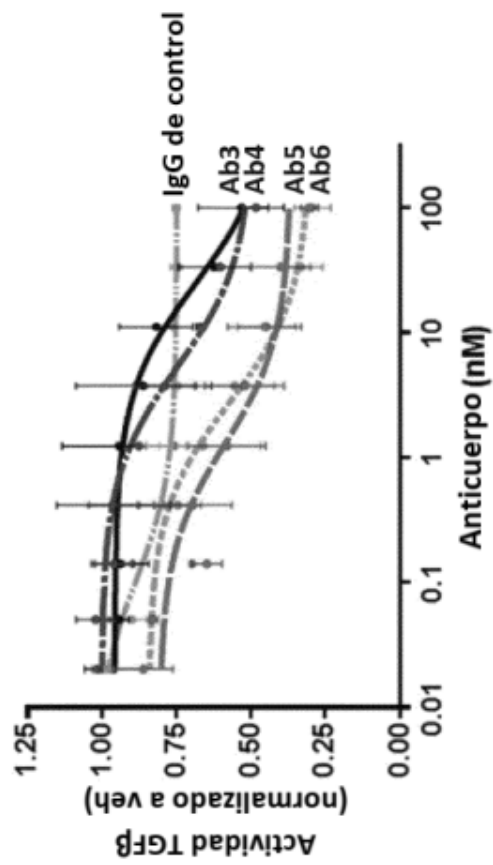
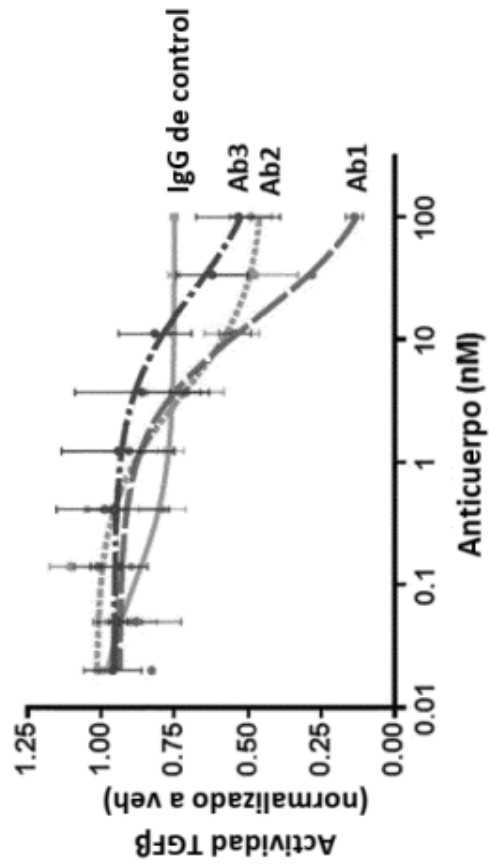


FIG. 1B



Inhibición de activación de LTP3-proTGFβ1 por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1
en un ensayo basado en células LN229

FIG. 2A

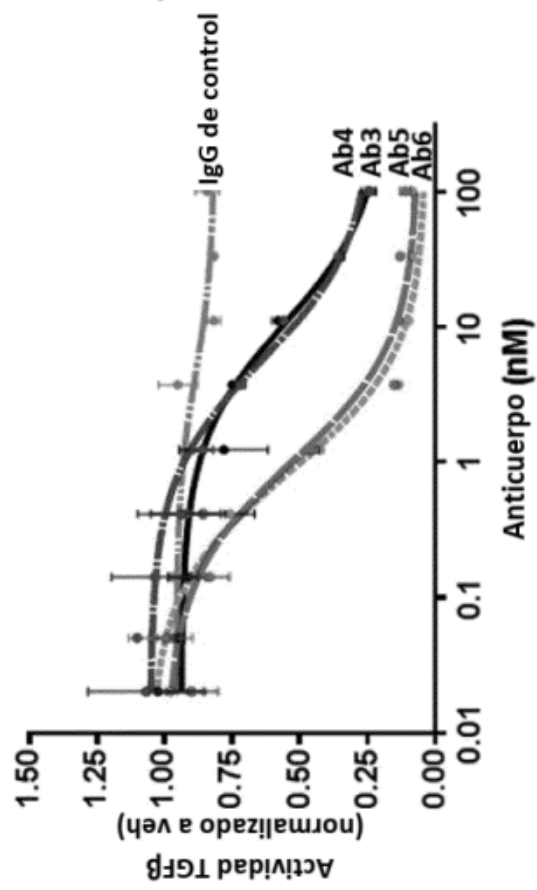
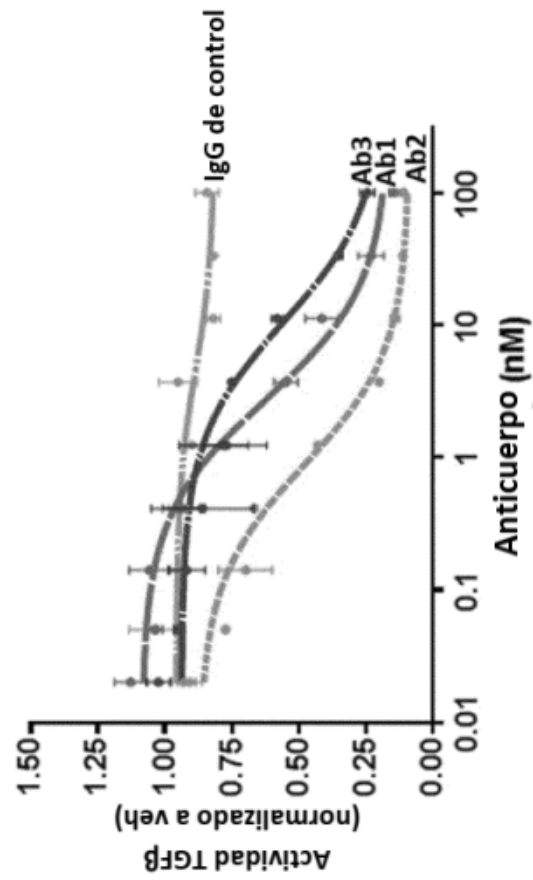


FIG. 2B



Inhibición de activación de GARP-proTGFβ1 por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1
en un ensayo basado en células SW480β6

FIG. 3A

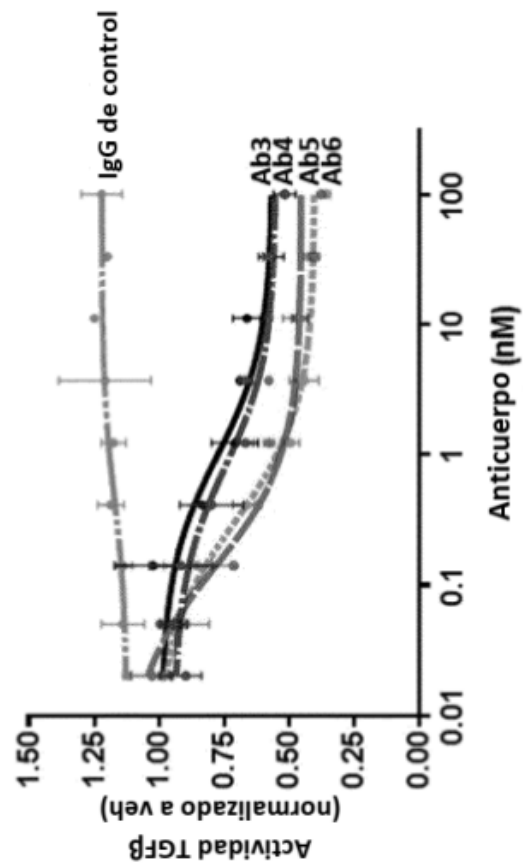
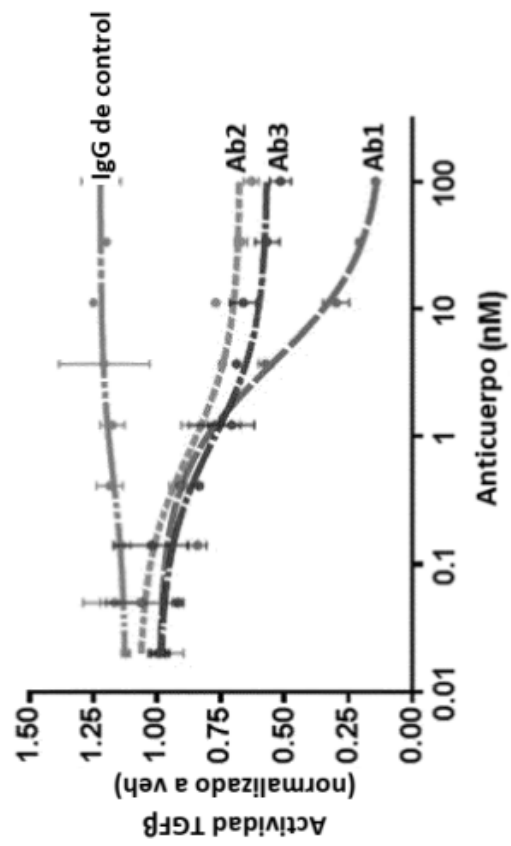


FIG. 3B



Inhibición de activación de LRRC33-proTGFβ1 por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1
en un ensayo basado en células SW480β6

FIG. 4A

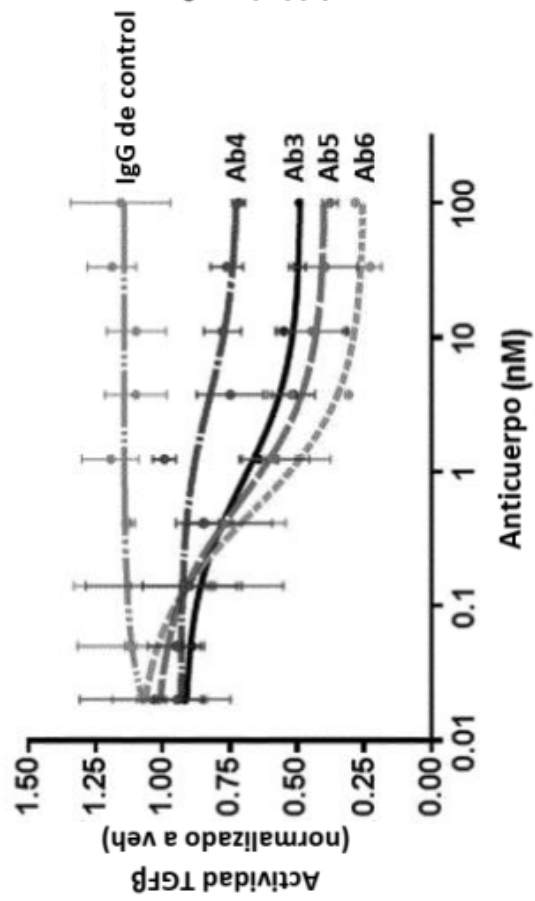


FIG. 4B

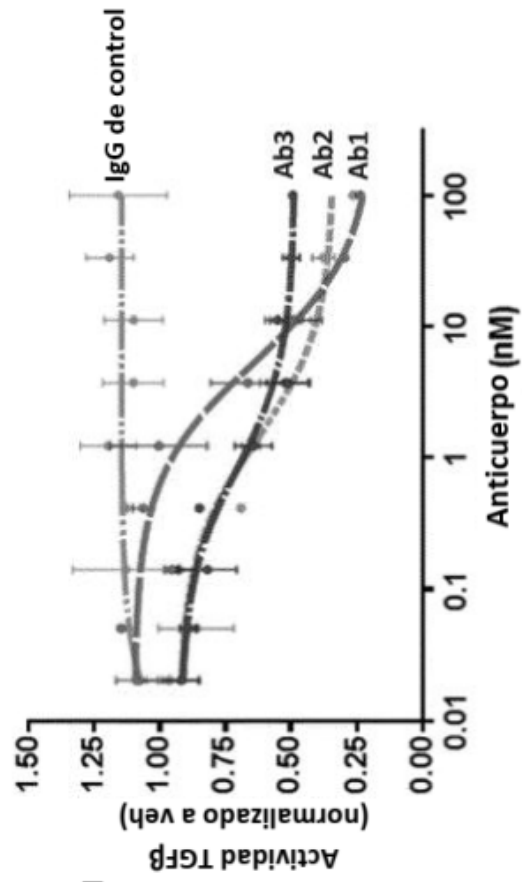


FIG. 5A

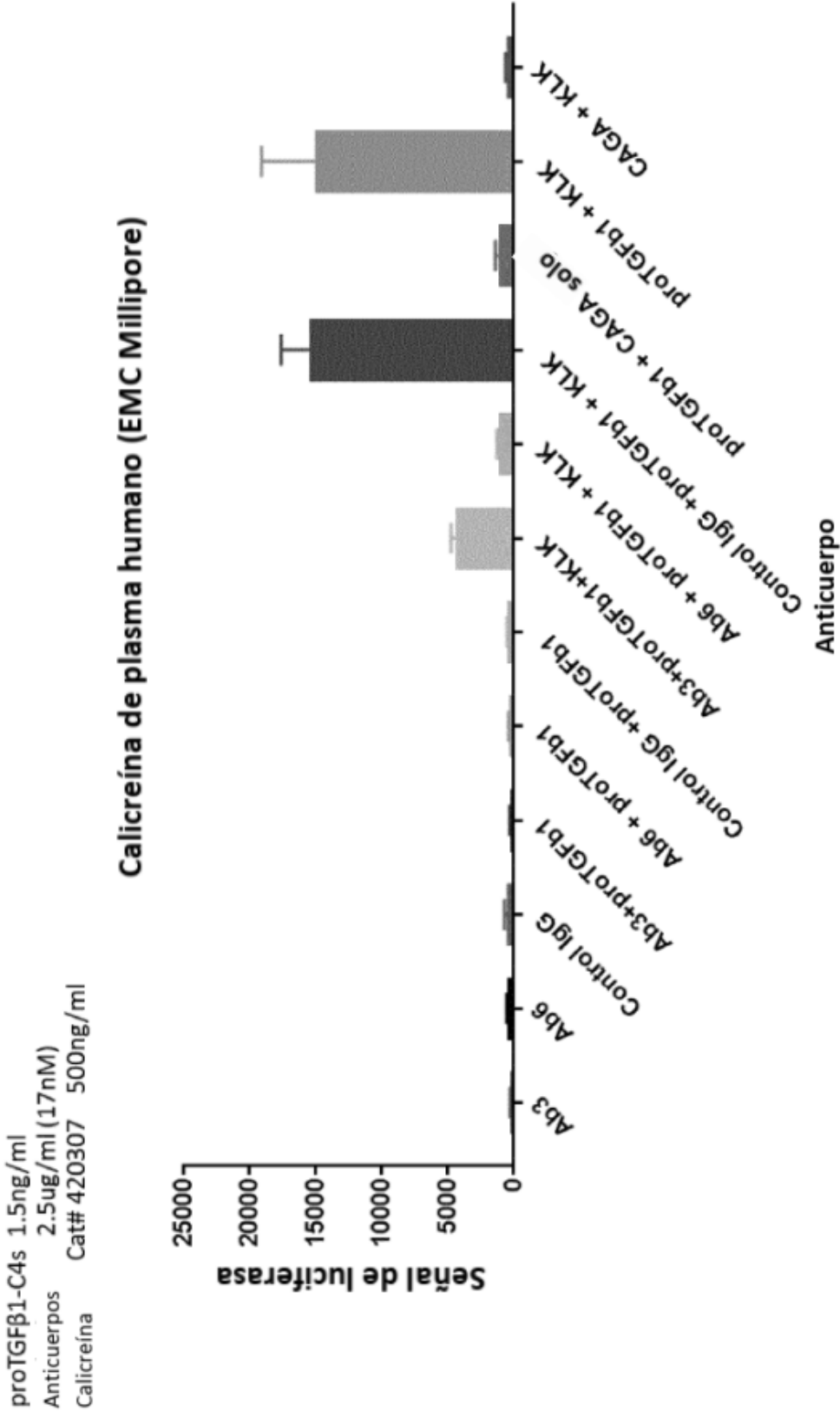


FIG. 5B

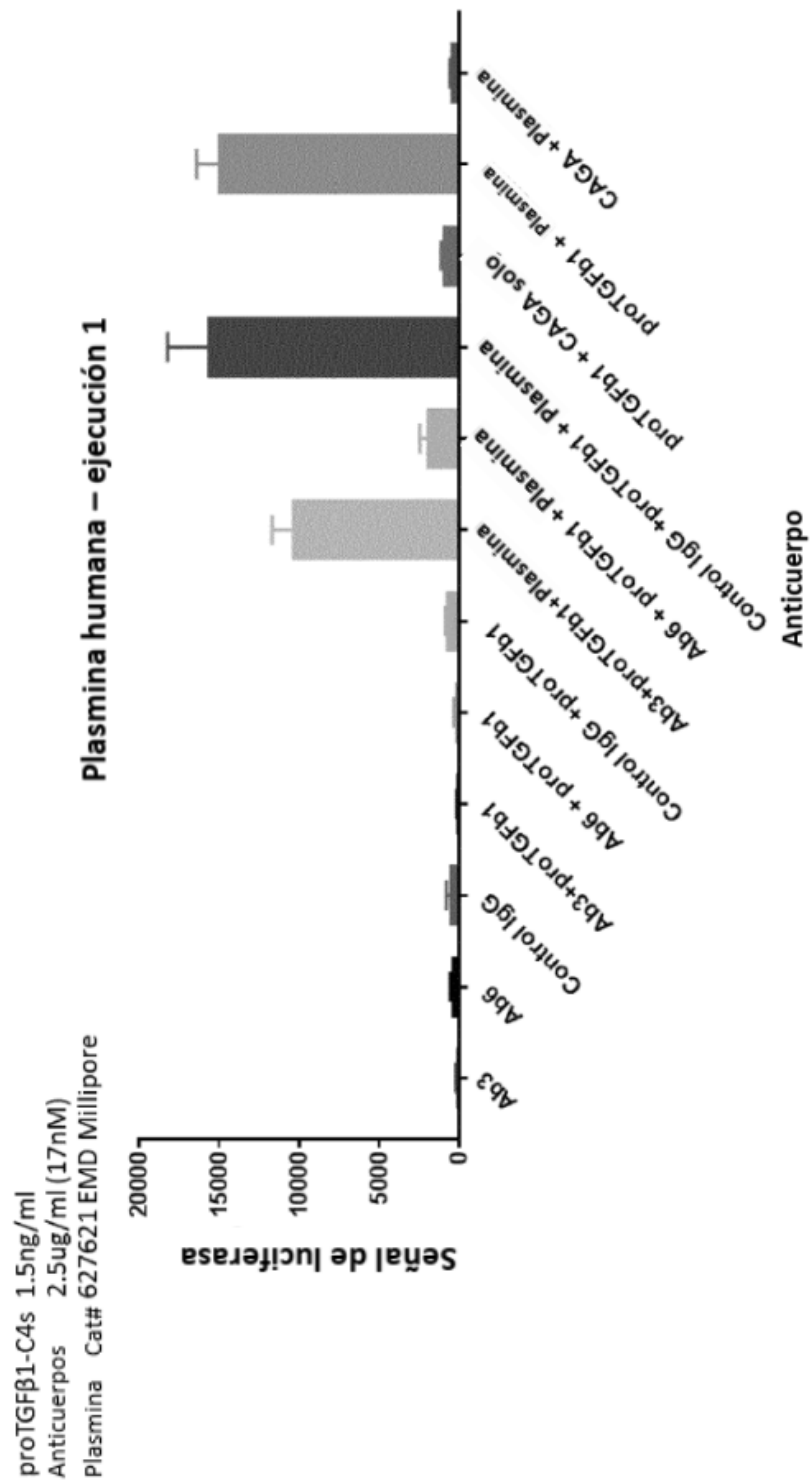


FIG. 6

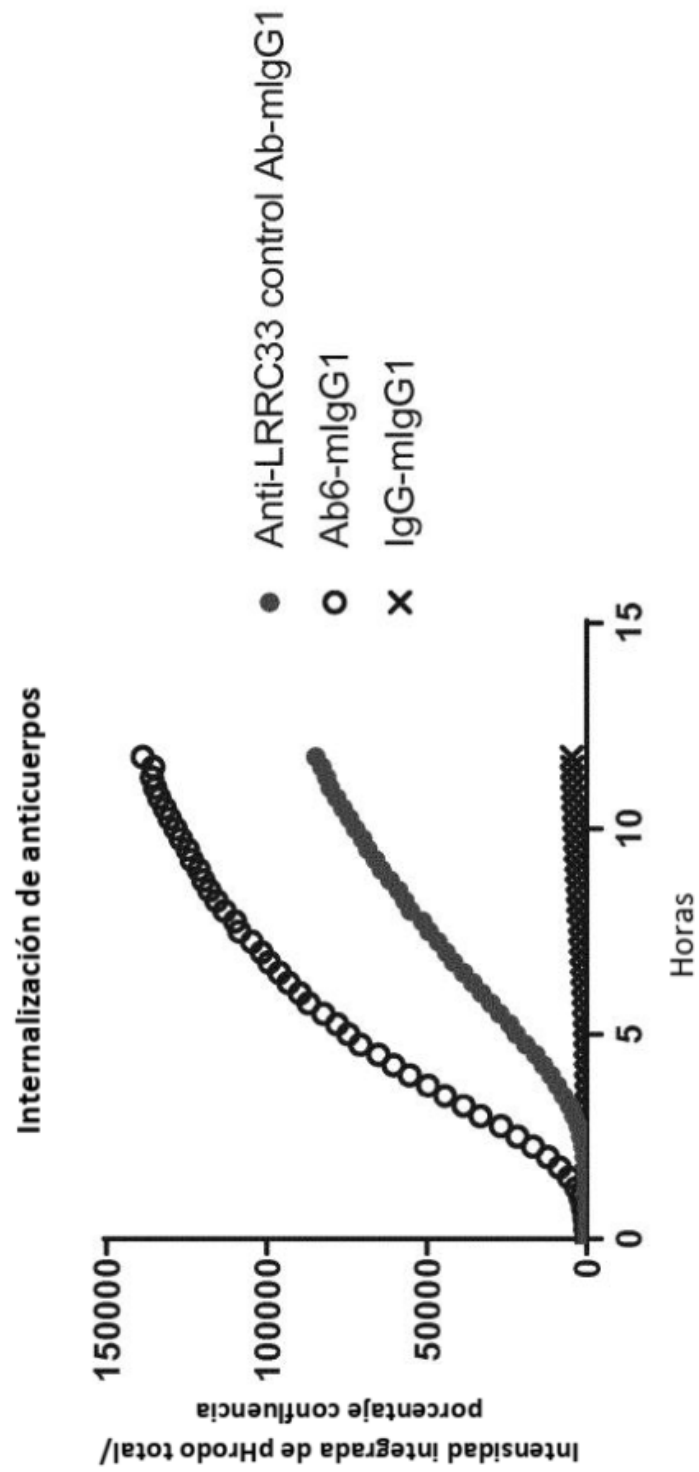


FIG. 7A

Inhibición de expresión de gen de colágeno por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1 en un modelo de ratón UUO

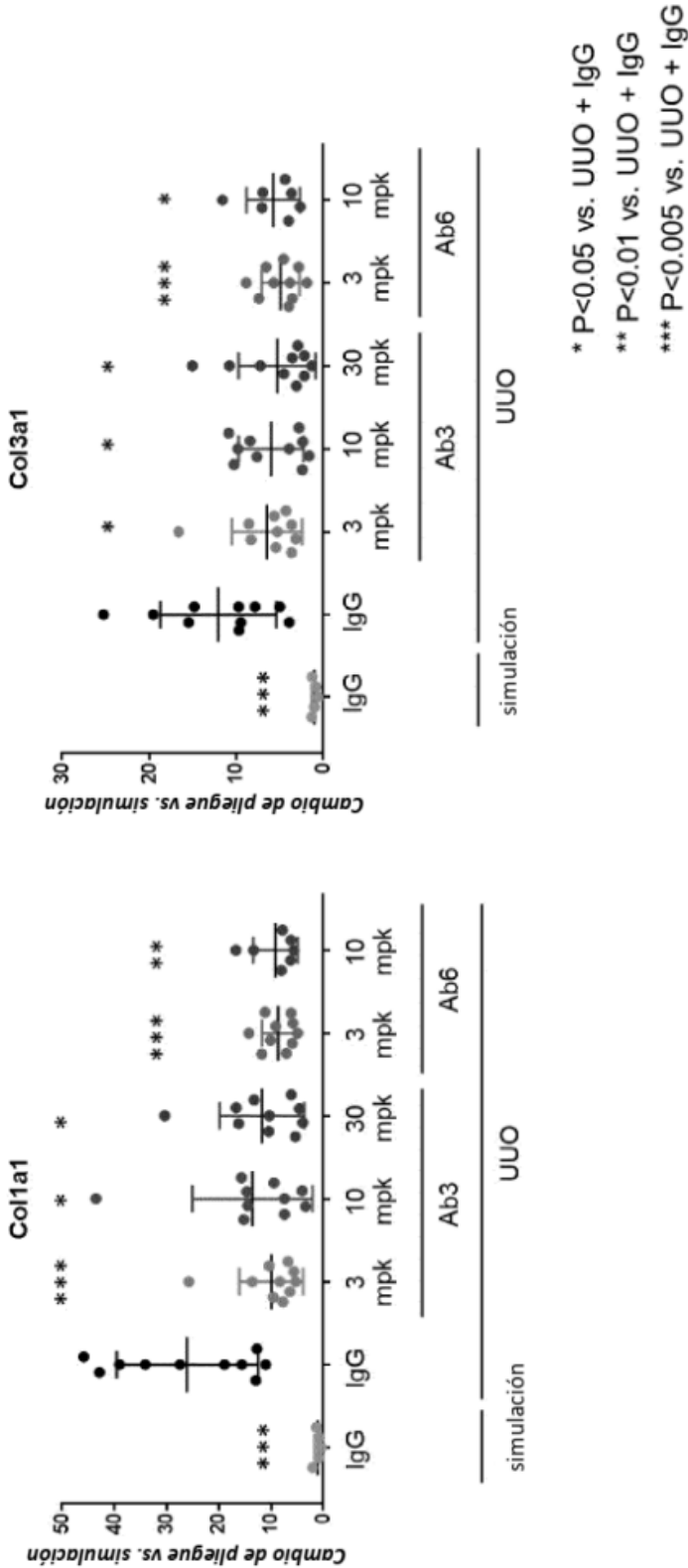


FIG. 7B

Inhibición de expresión génica de fibronectina y Lox12 por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1 en un modelo de ratón UUO

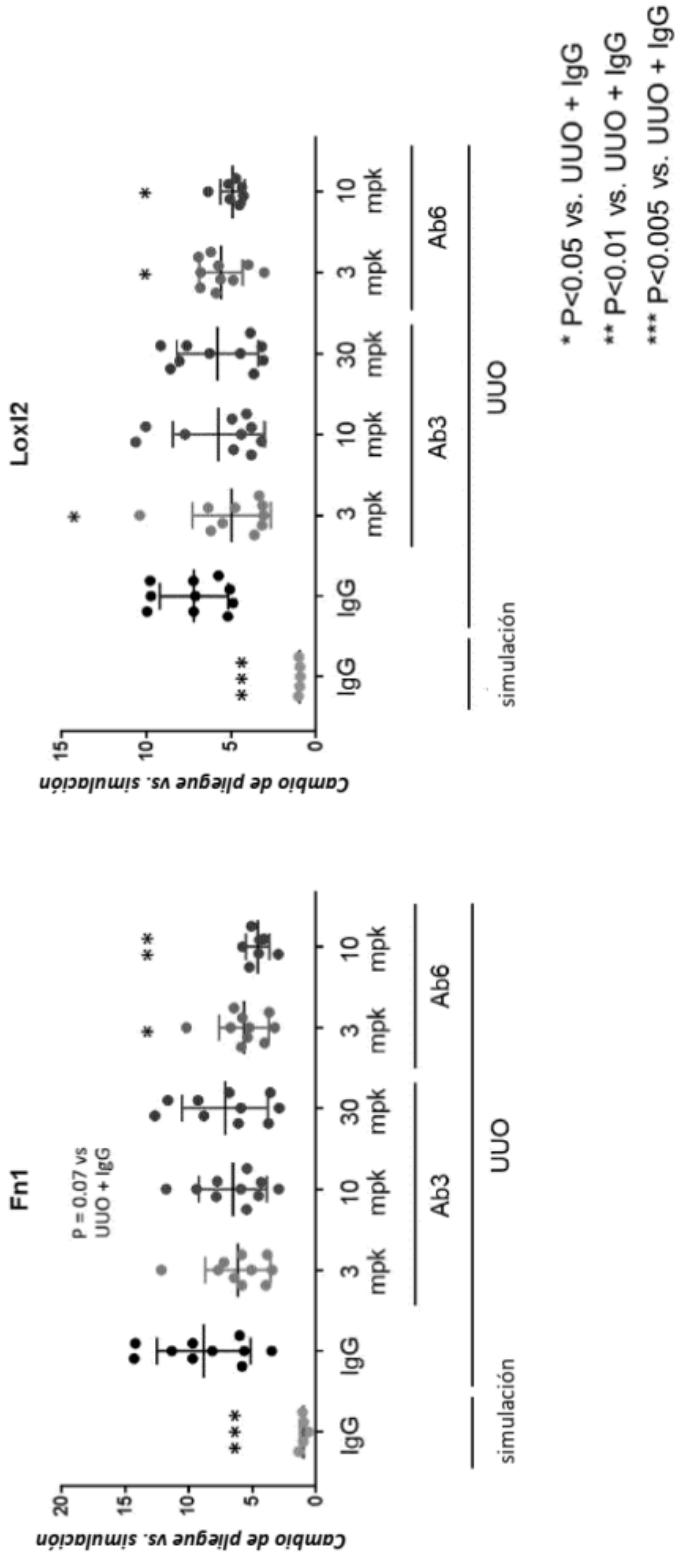


FIG. 8A

Inhibición de expresión de gen de colágeno por anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1 en un modelo de ratón UUO

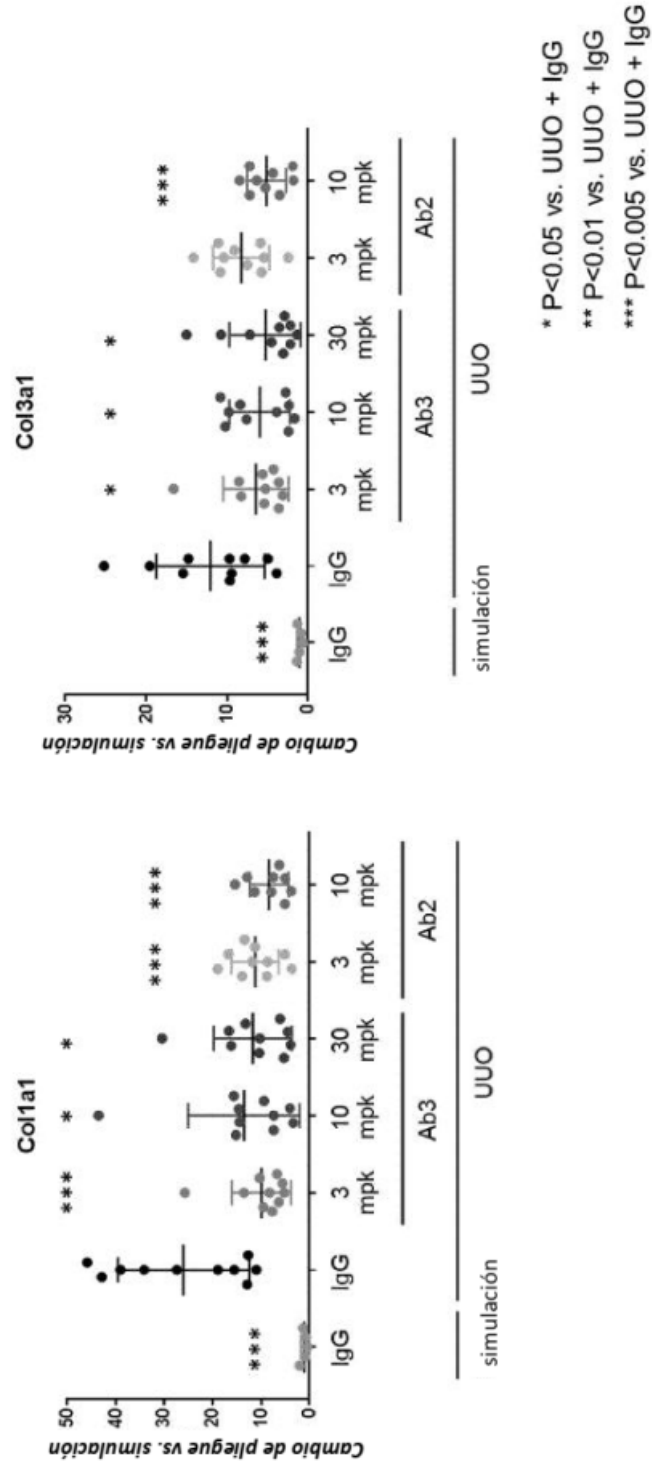


FIG. 9

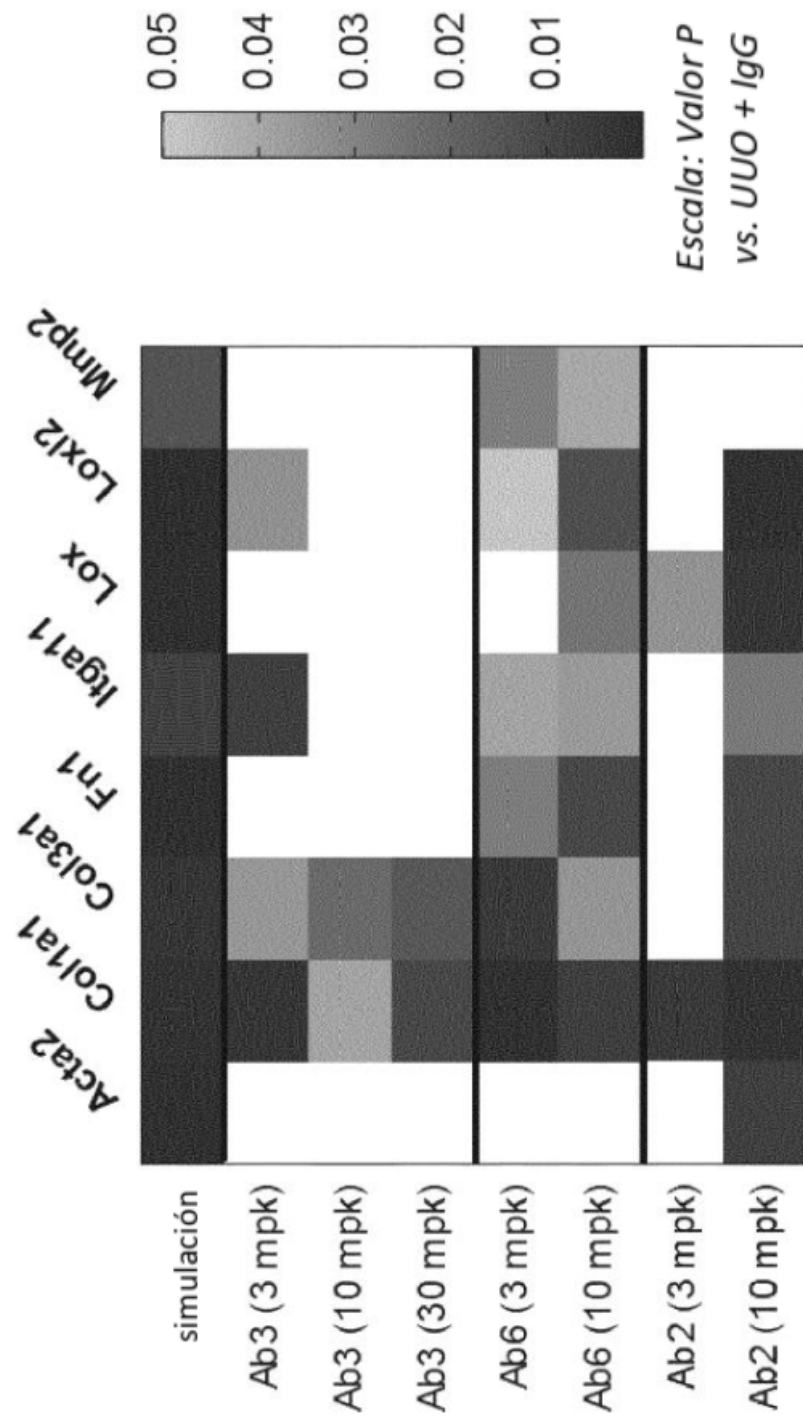


FIG. 10A

Dosis única (10 mg/kg, 48h post-dosis) de Ab2 inhibe pSmad2/3 en riñones en un modelo genético de síndrome de Alport

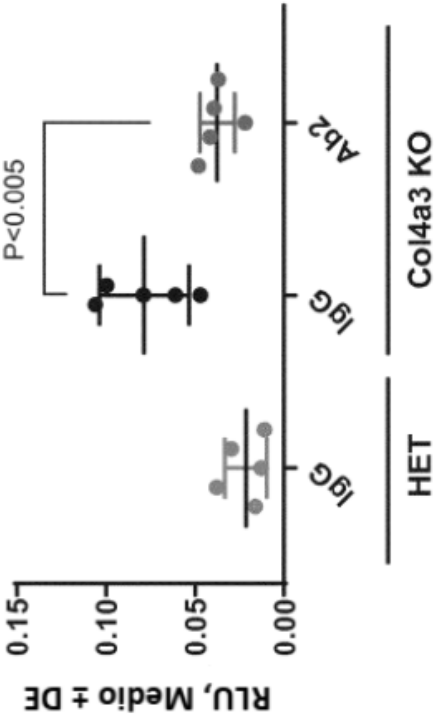


FIG. 10B

Efecto de anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1 en pSmad2/3 en un modelo genético de síndrome de Alport

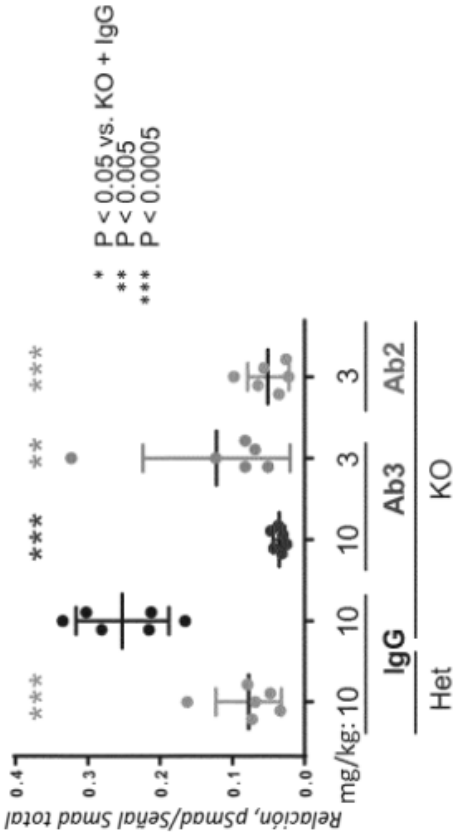


FIG. 10C

Efecto de anticuerpos específicos a isoformas de TGFβ1 en expresión génica fibrótica en un modelo genético de síndrome de Alport

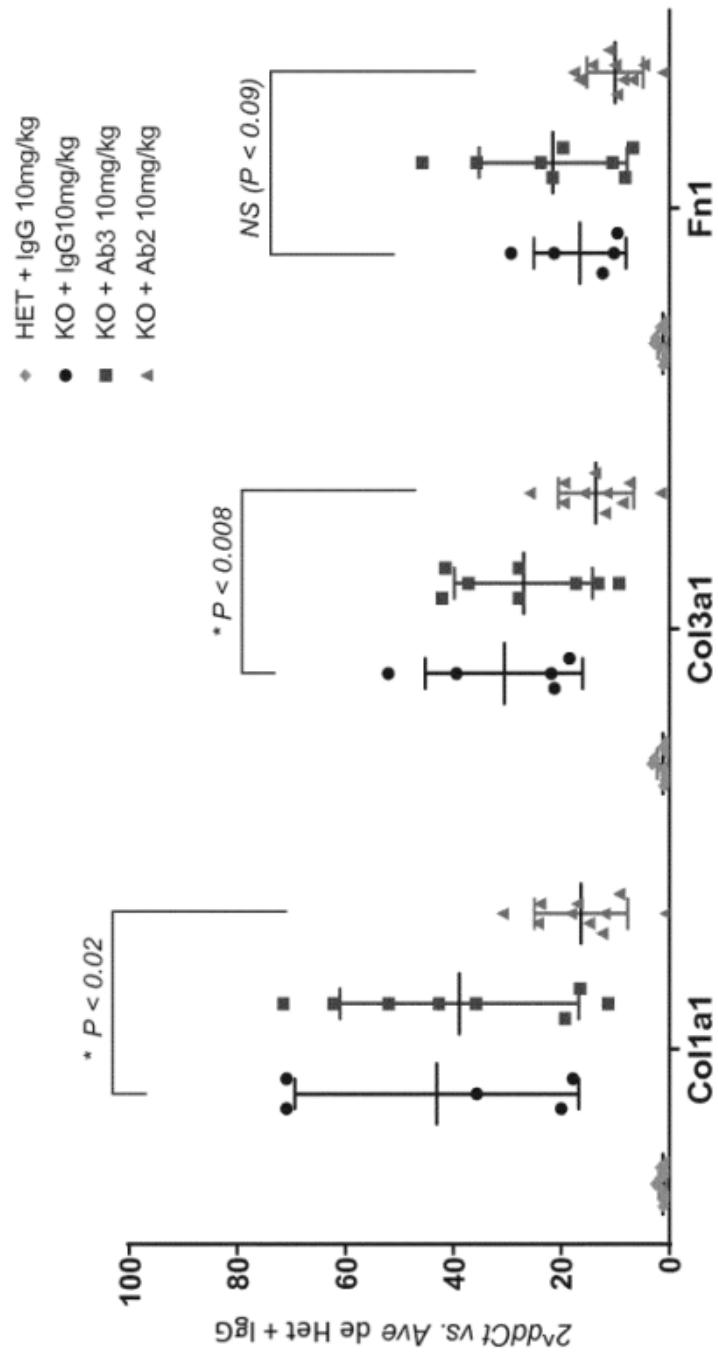


FIG. 11A

Exposición de suero de Ab2 en modelo CDHFD de ratón NASH

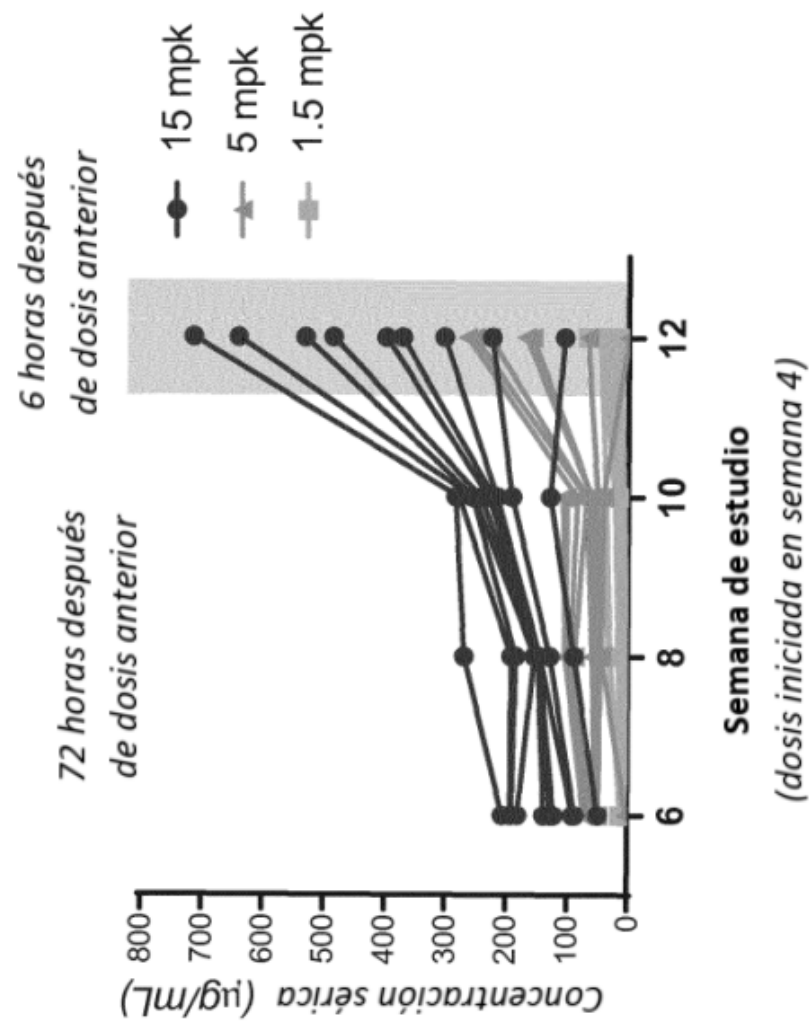


FIG. 11B

Ab2 inhibe fosforilación Smad2/3 en tejido del hígado de ratones tratados con CDHFD

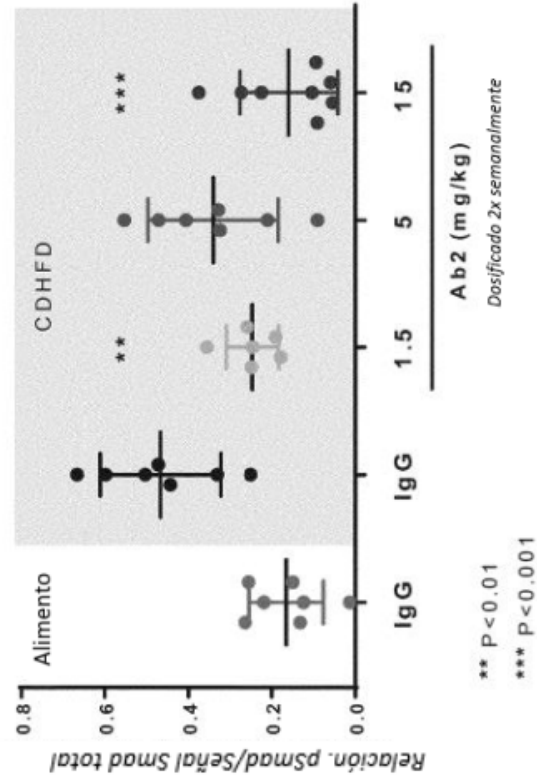


FIG. 11C

Correlación de pSmad hepático a exposición de punto final en ratones CDHFD dosificados con Ab2

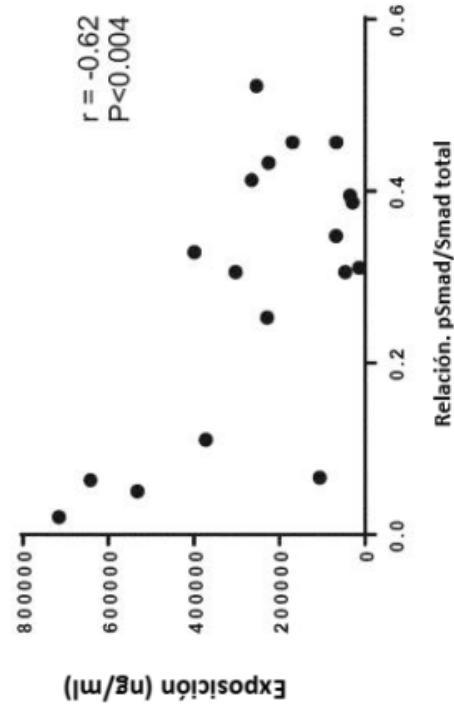
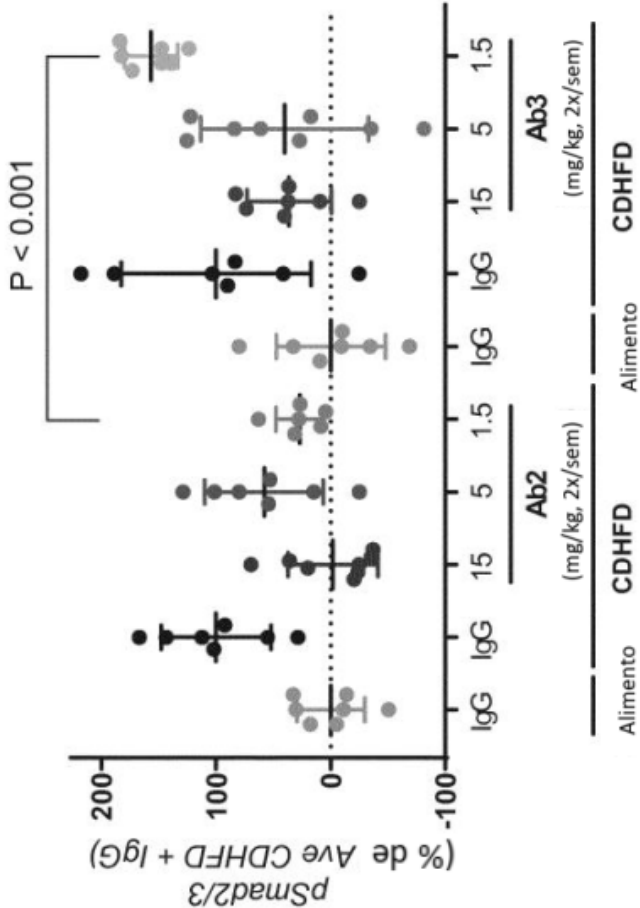


FIG. 11D

Efecto de inhibición de TGFb1 en pSMAD en hígados del modelo de ratón CDHFD



Para permitir una comparación directa de datos de muestras Ab2 y Ab3, los datos fueron normalizados por la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{muestra} - \text{AVE}_{\text{Alimento} + \text{IgG}}}{\text{AVE}_{\text{CDHFD} + \text{IgG}} - \text{AVE}_{\text{Alimento} + \text{IgG}}} \times 100$$

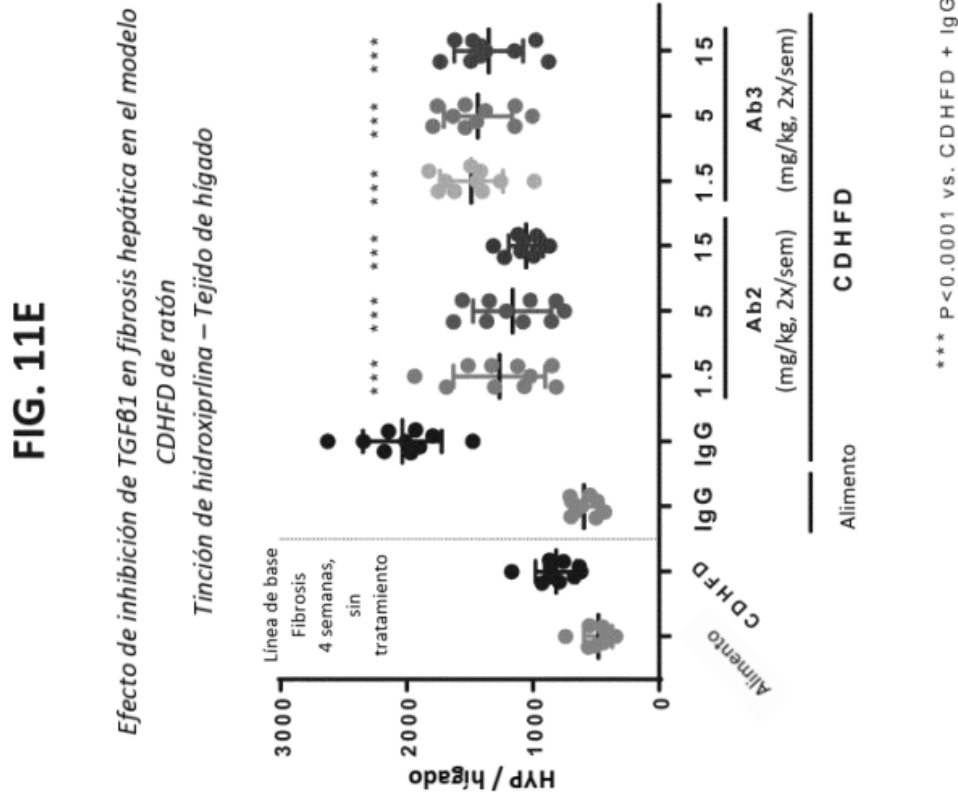


FIG. 11F

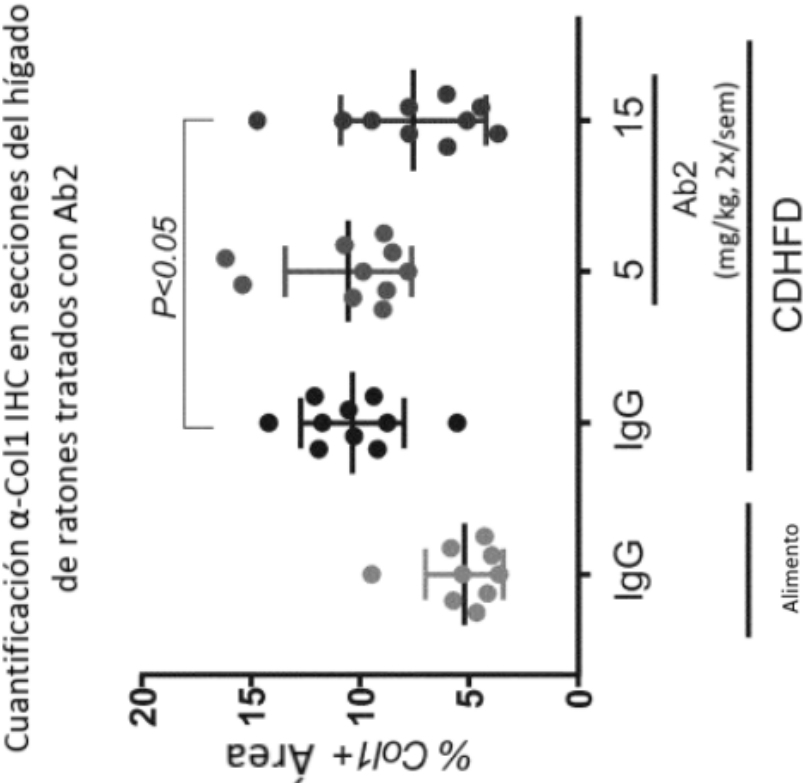


FIG. 11G

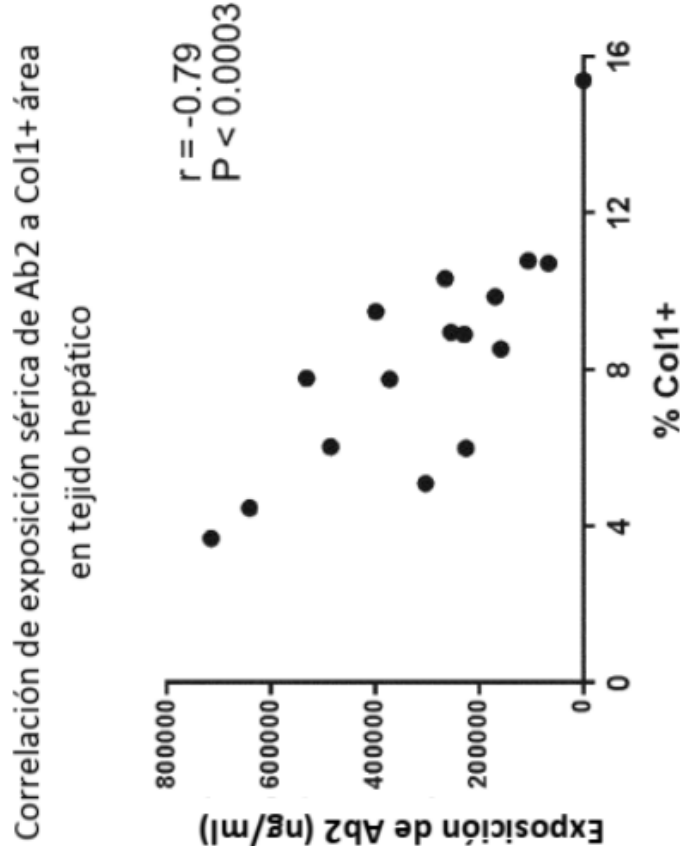


FIG. 12

Tratamiento de anti-TGFβ1 reduce el área PS-Rojo+ en el modelo CCl₄ de fibrosis hepática

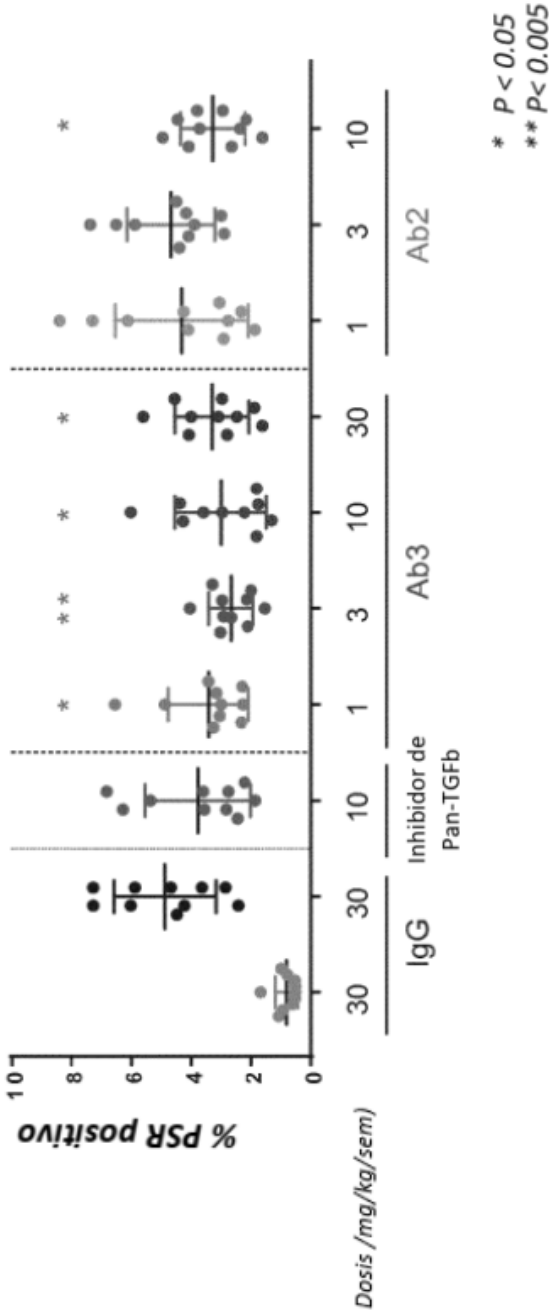


FIG. 13

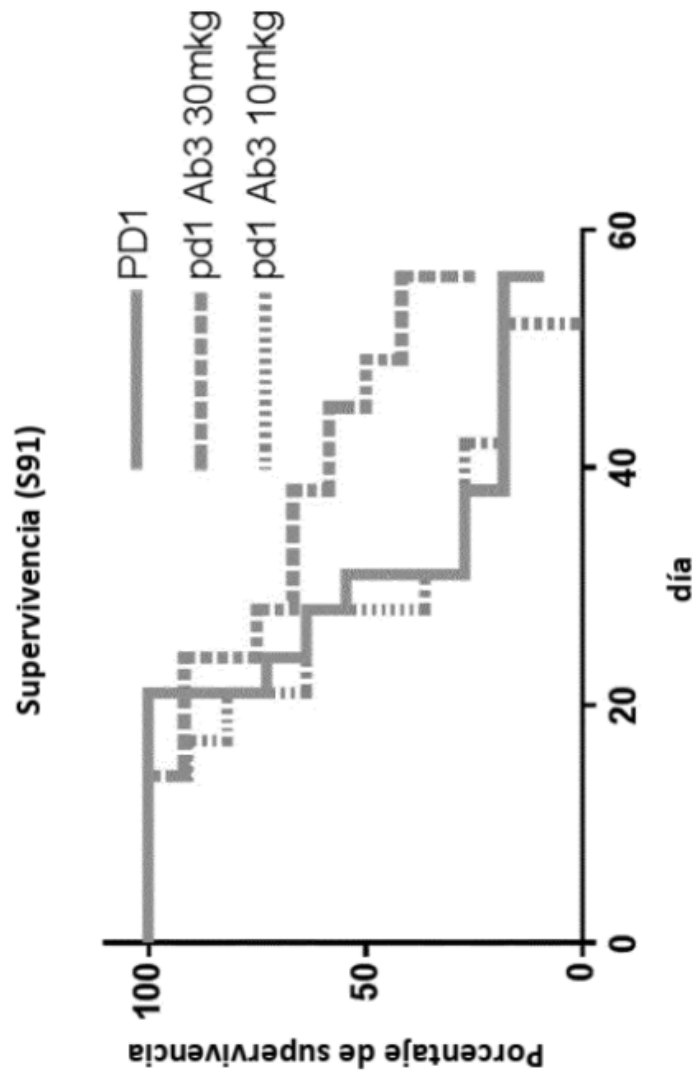


FIG. 14A

Efectos de Ab3 y Ab6 en combinación con anticuerpo anti-PD-1 en progresión del tumor en el modelo de melanoma Cloudman S91

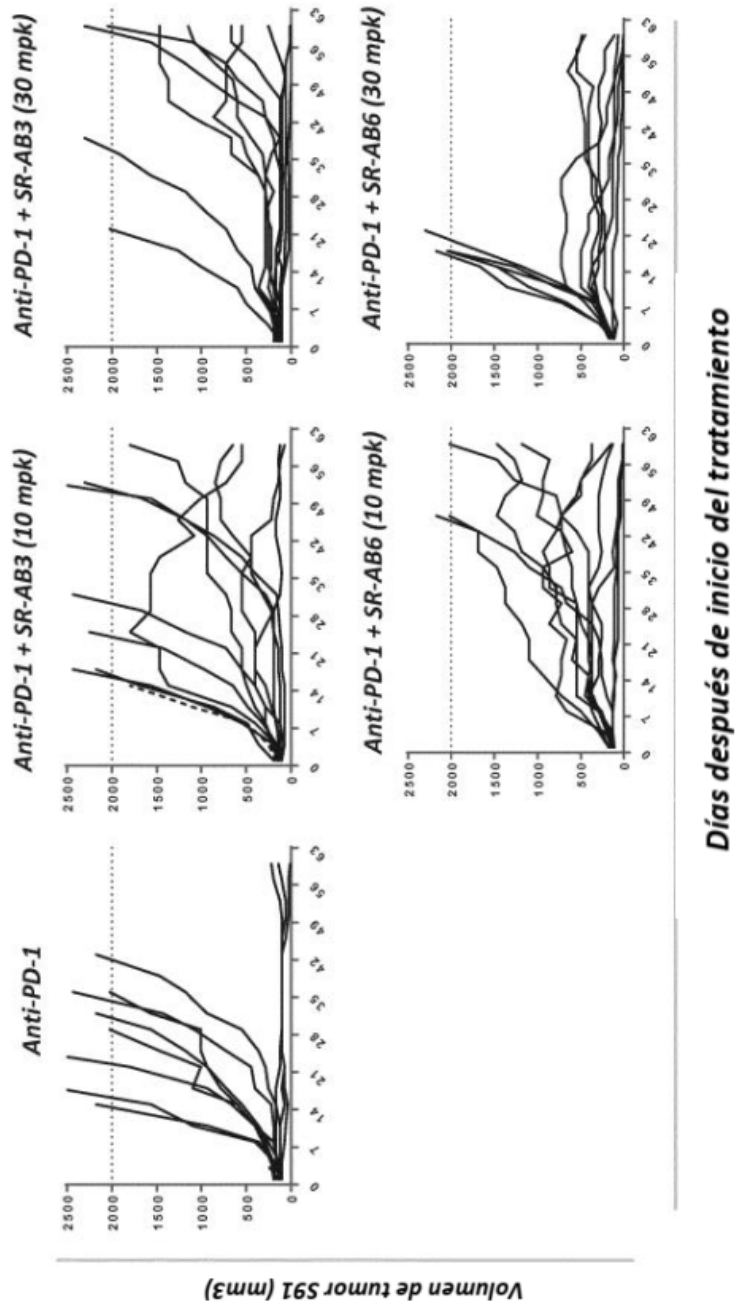


FIG. 14B

*Progresión del tumor en el modelo de melanoma Cloudman S91
después del tratamiento con Ab3 o Ab6 en combinación con el anticuerpo anti-PD-1*

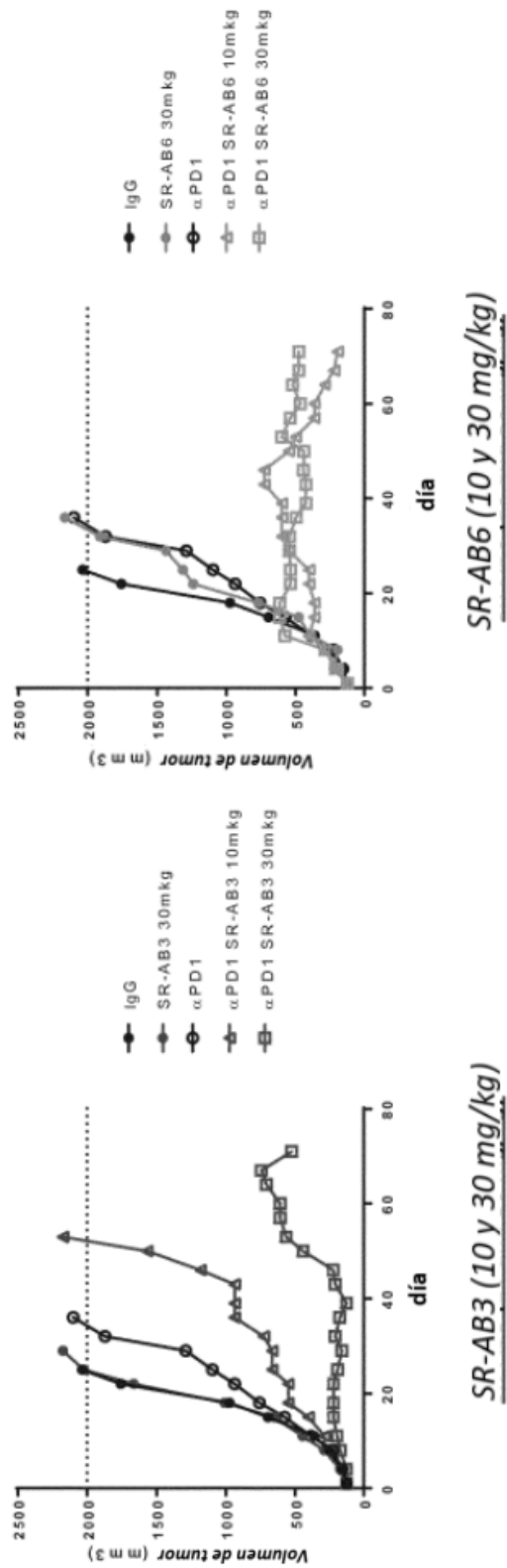
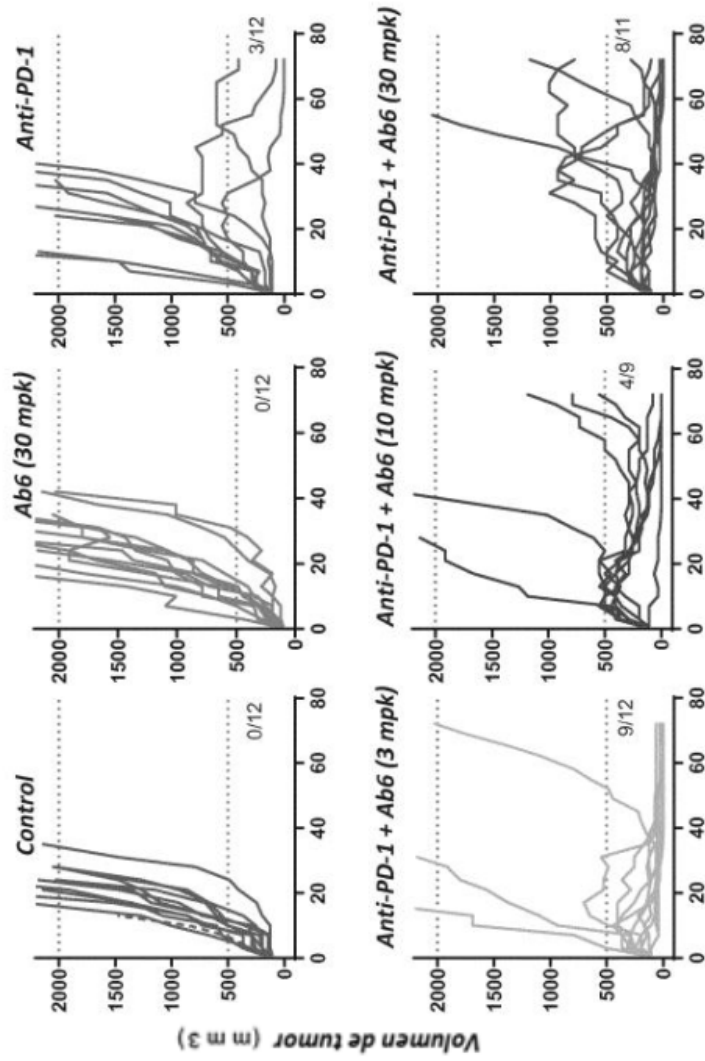


FIG. 14C

Inhibición de TGFβ1 y bloqueo de PD-1 en modelo de melanoma Cloudman S91



Días después de inicio del tratamiento

Respondedores:
 tamaño de tumor < 25% punto final
 volumen a final del estudio

FIG. 14D

Efectos anti-tumor durables de Ab6 y anti-PD-1 en tumores S91

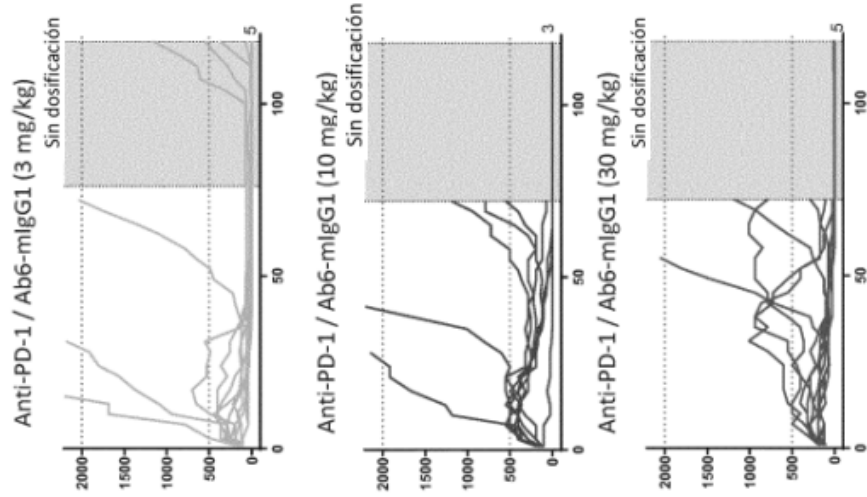


FIG. 14E

Efectos de inhibición de TGFβ1 y bloqueo PD-1 en volumen de tumor mediano en modelo de melanoma Cloudman S91

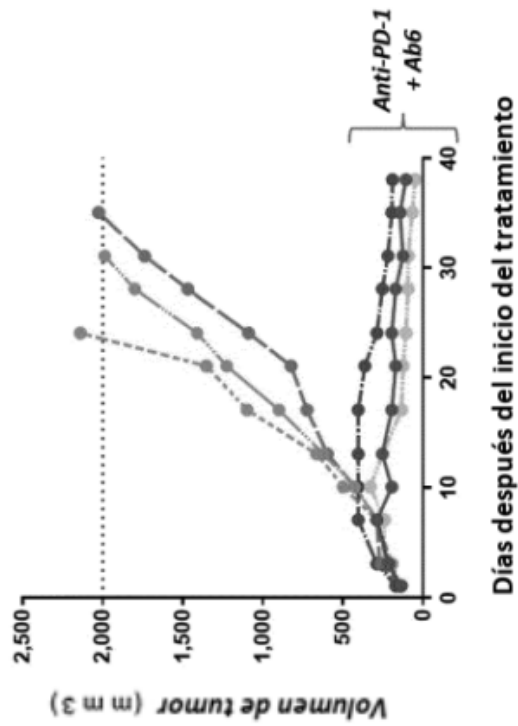
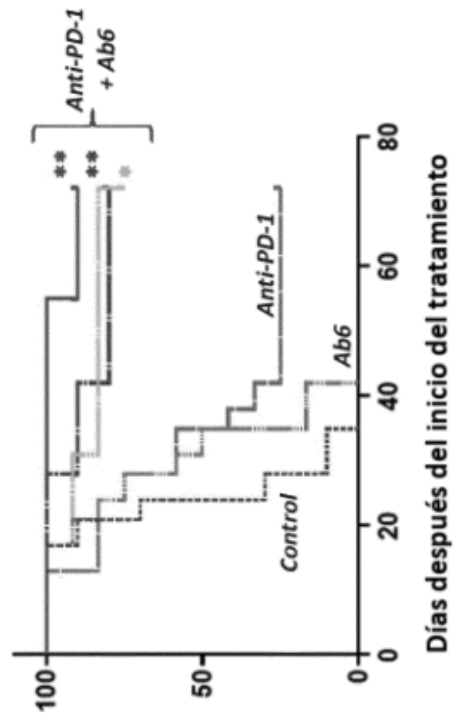


FIG. 14F

Efectos de supervivencia de inhibición de TGFβ1 y bloqueo PD-1 en modelo de melanoma Cloudman S91



** $P < 0.005$, * $P < 0.05$; Rango log (Mantel-Cox) prueba vs. anti-PD-1

Diseño de estudio: Células S91 implantadas subcutáneamente. Tratamiento iniciado con promedio de tumores de 125-175mm³. Anti-PD-1 (RMP1-14) administrado 10 mg/kg 2x por semana; Ab6 (mIgG1) administrado 3, 10 o 30 mg/kg una vez por semana.

FIG. 15

Combinación de inhibidores de anti-PD1/anti-TGFβ1 disminuye los niveles de pSMAD en los tumores MBT2

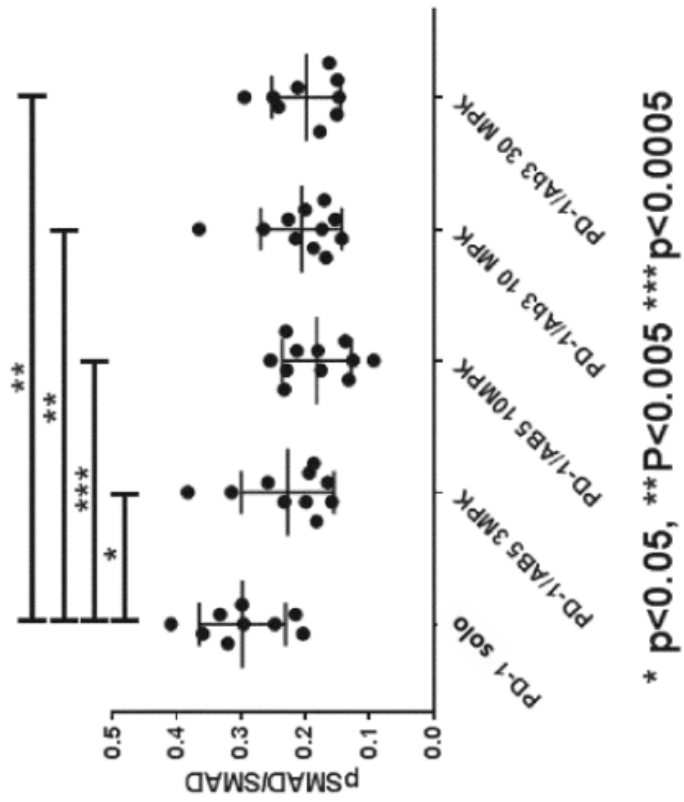


FIG. 16A

Efectos de Ab3 y Ab6 en combinación con anticuerpo anti-PD-1 en progresión de tumor en el modelo de cáncer de vejiga singeneico MBT2 (escala lineal)

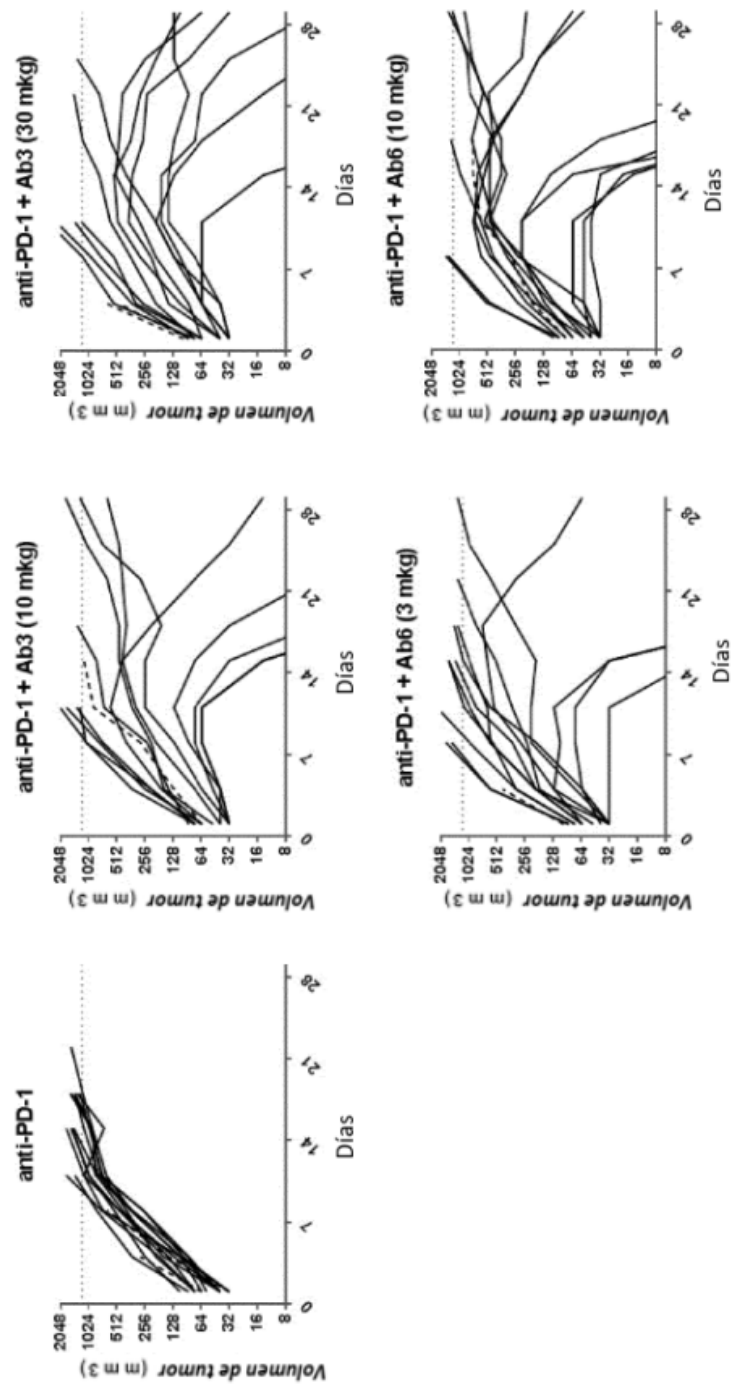


FIG. 16B

Efectos de Ab3 y Ab6 en combinación con anticuerpo anti-PD-1 en progresión de tumor en el modelo de cáncer de vejiga singeneico MBT2 (escala lineal)

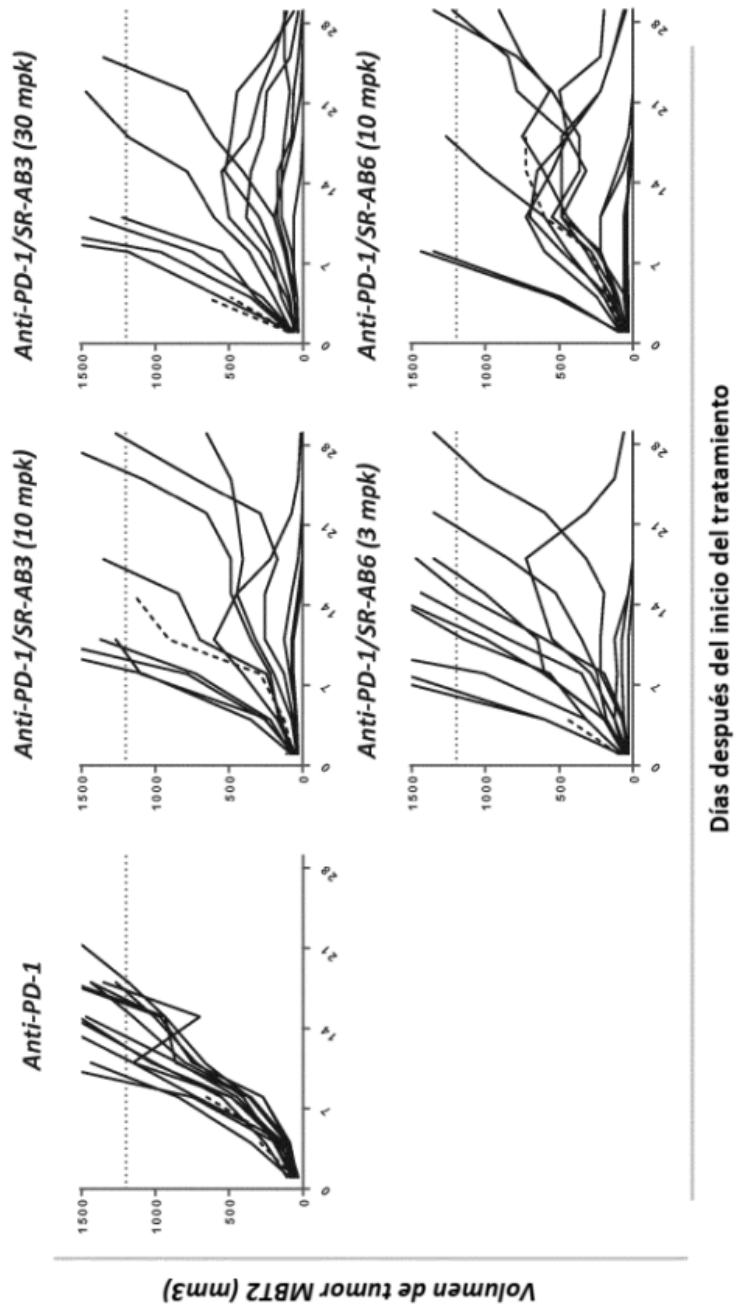


FIG. 16C
Progresión de tumor mediano en modelo de cáncer de vejiga singeneico MBT2 después del tratamiento con Ab3 o Ab6 en combinación con anticuerpo anti-PD-1

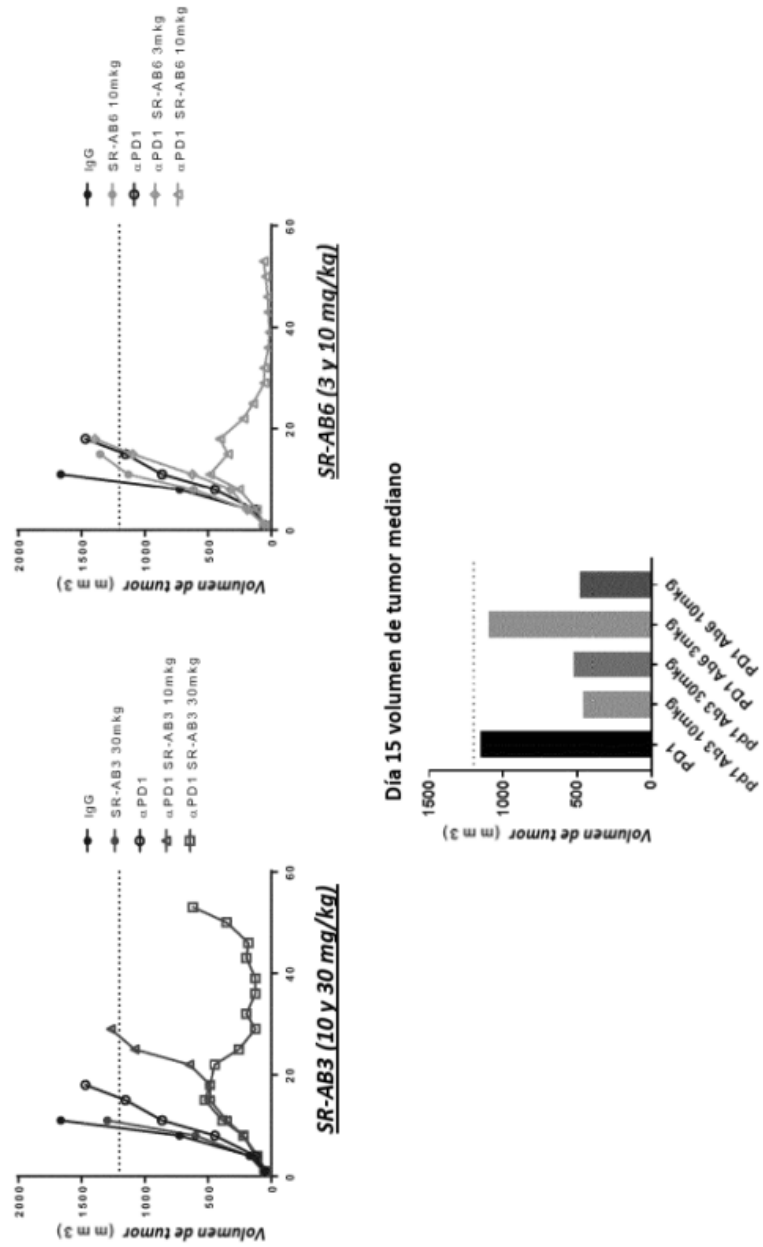
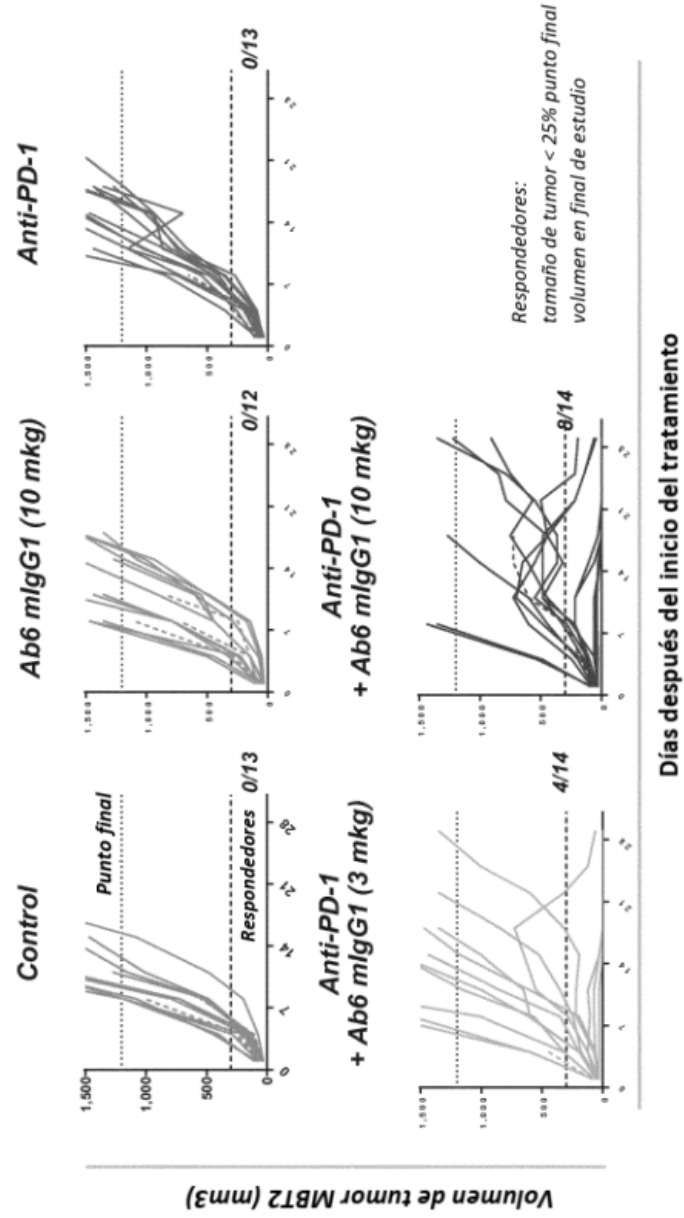


FIG. 16D

*Efectos de Ab6 en combinación con anticuerpo anti-PD-1
en progresión de tumor en el modelo de cáncer de vejiga singeneico MBT2*



Diseño de estudio: Células MBT-2 implantadas subcutáneamente. Tratamiento iniciado con promedio de tumores de 40-80 mm3. Anti-PD-1 (RMP1-14) administrado 10 mg/kg 2x por semana; Ab6 (mlgG1) administrado 1x por semana con la dosis indicada.

FIG. 17

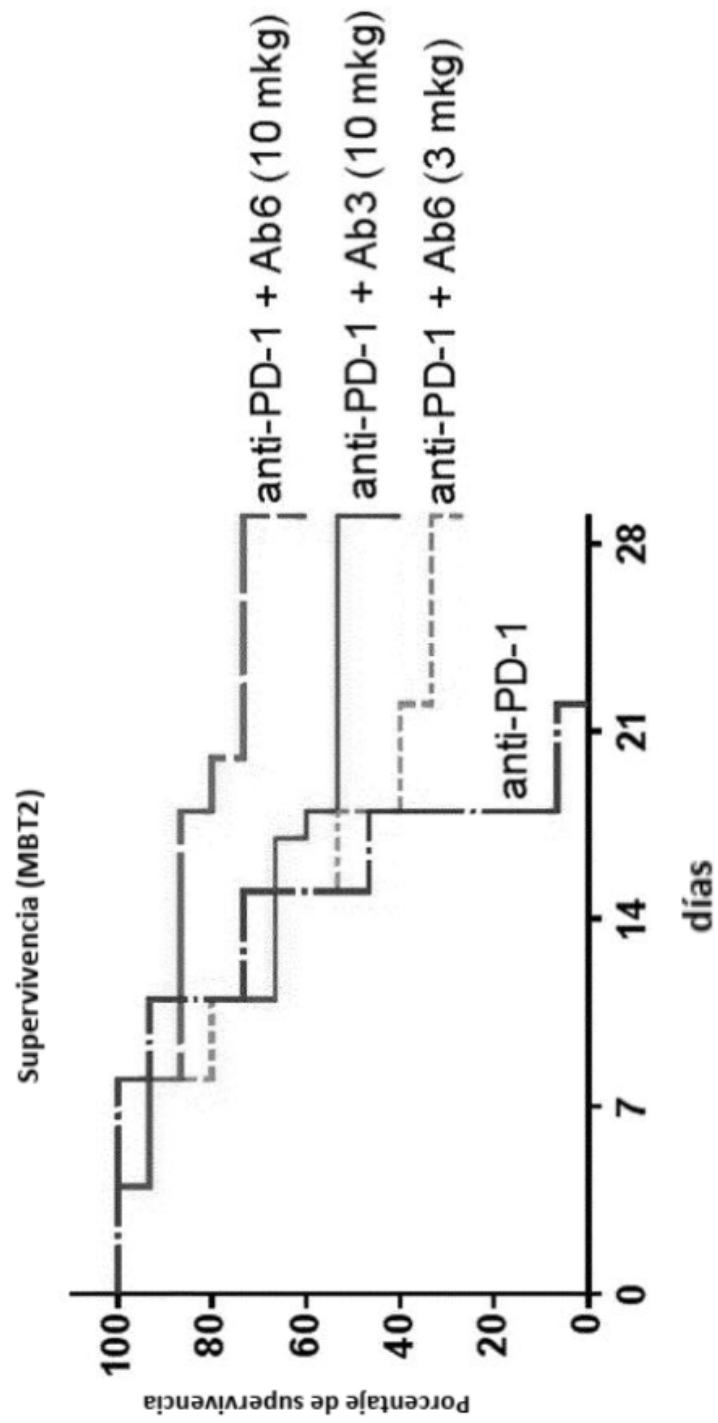
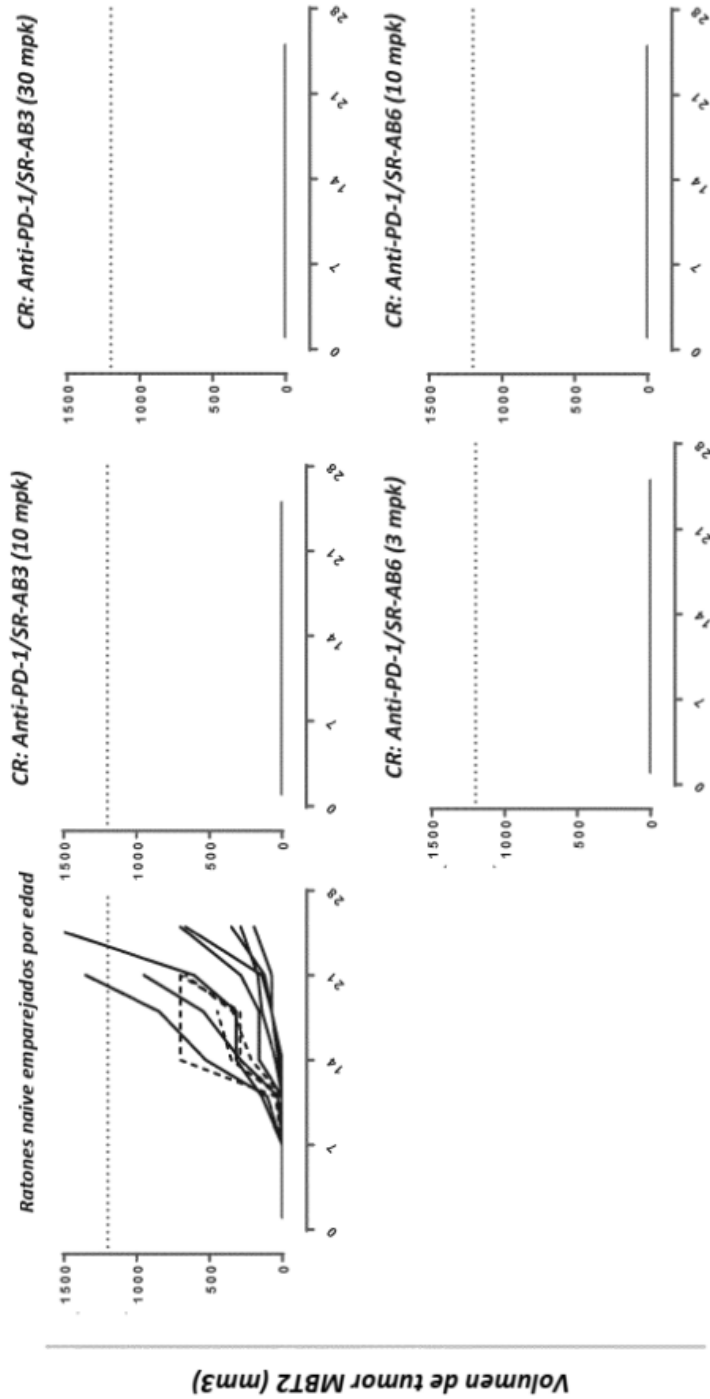


FIG. 18

Memoria inmunitaria durable en respondedores completos MBT2



Días después de la implantación

FIG. 19A

Inhibición de crecimiento de tumor MBT2 en ratones tratados con anticuerpos específicos a isoformas TGFβ1 en combinación con un anticuerpo anti-PD1

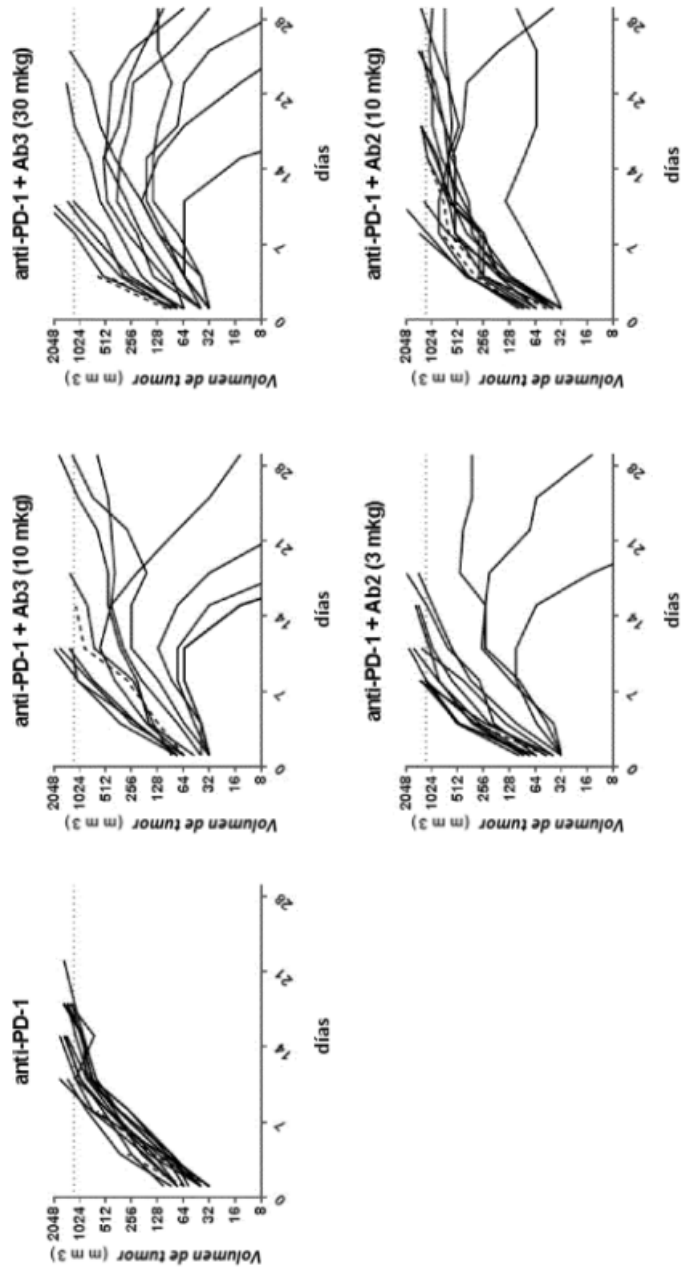


FIG. 19B

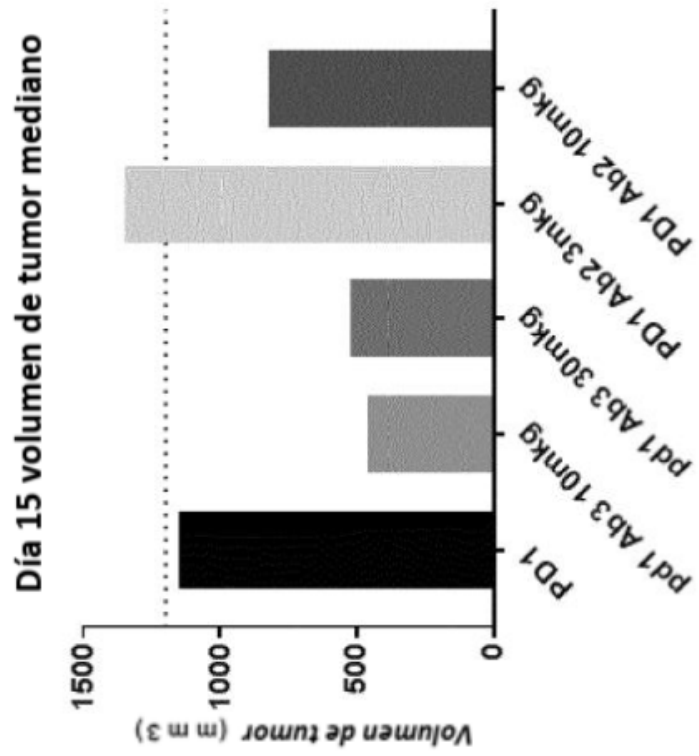


FIG. 20A

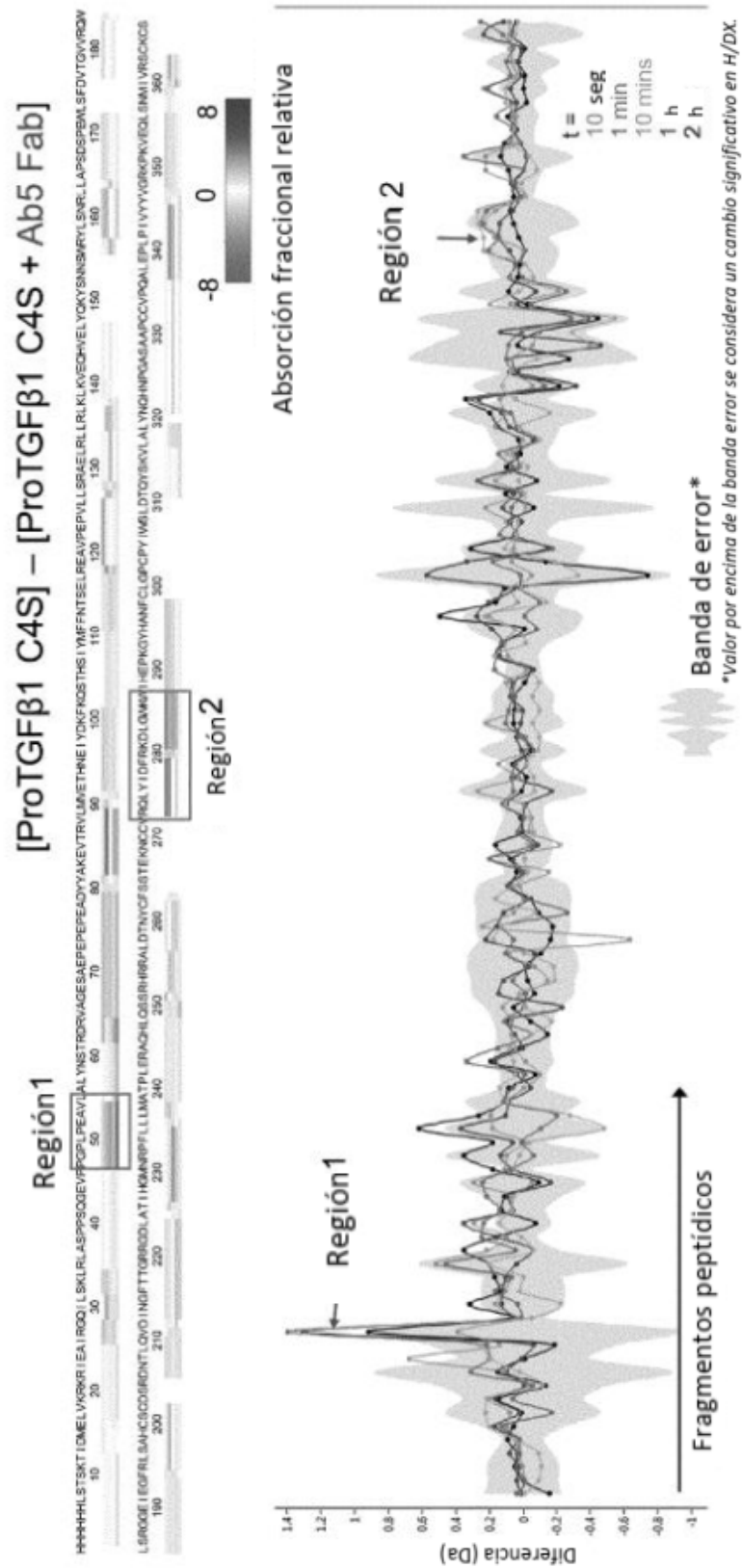


FIG. 20B

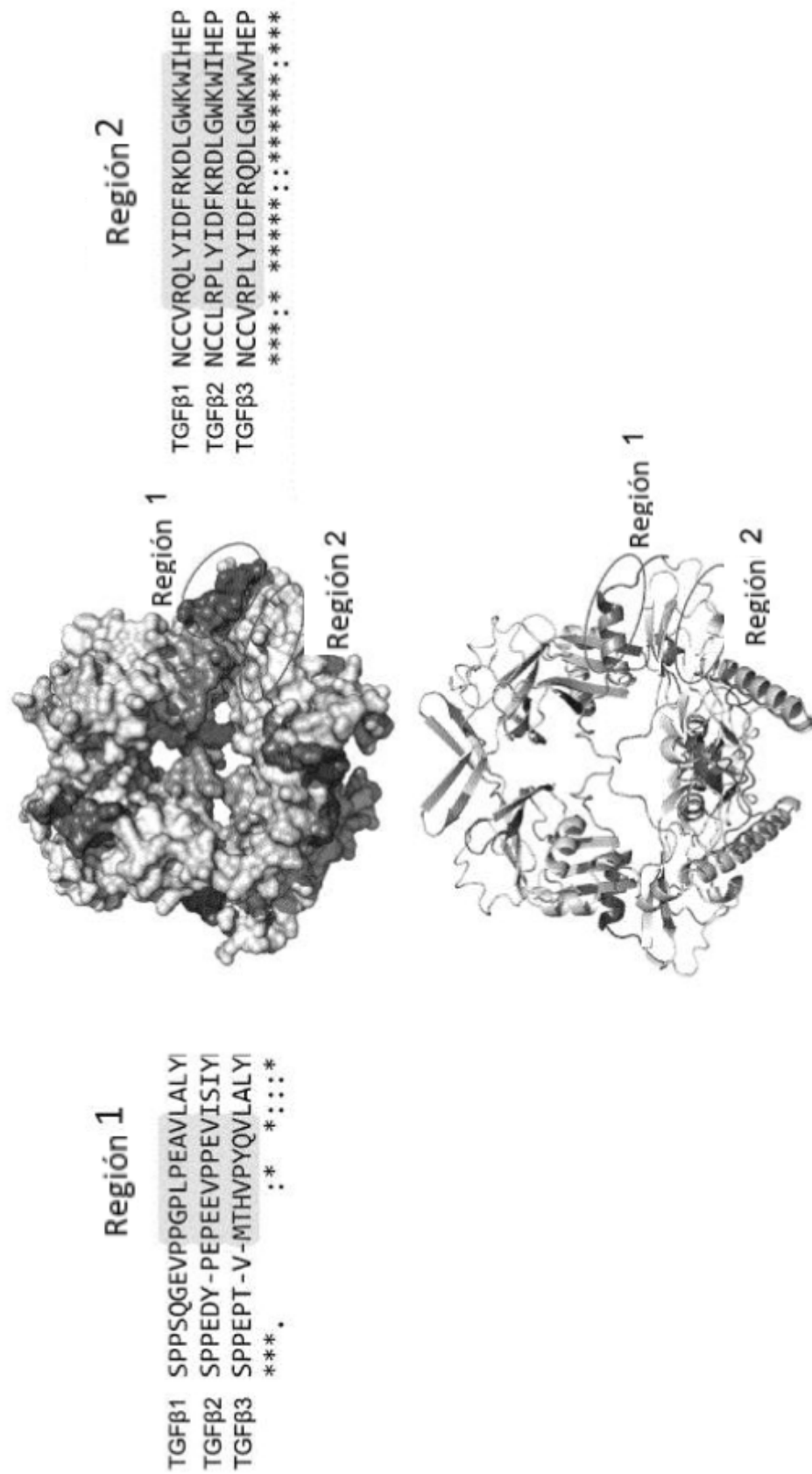


FIG. 21A

Mapa térmico diferencial

[ProTGFβ1 C4S] - [ProTGFβ1 C4S + Ab6 Fab]

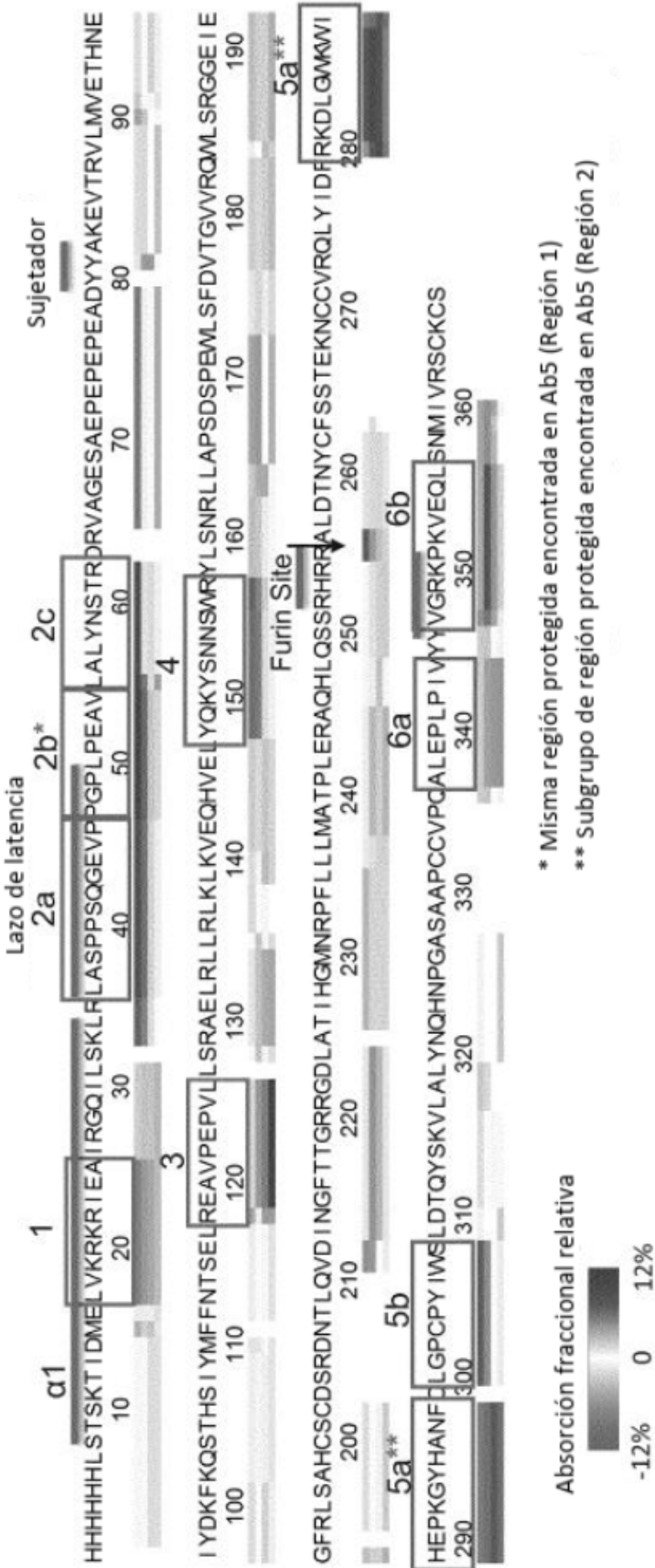
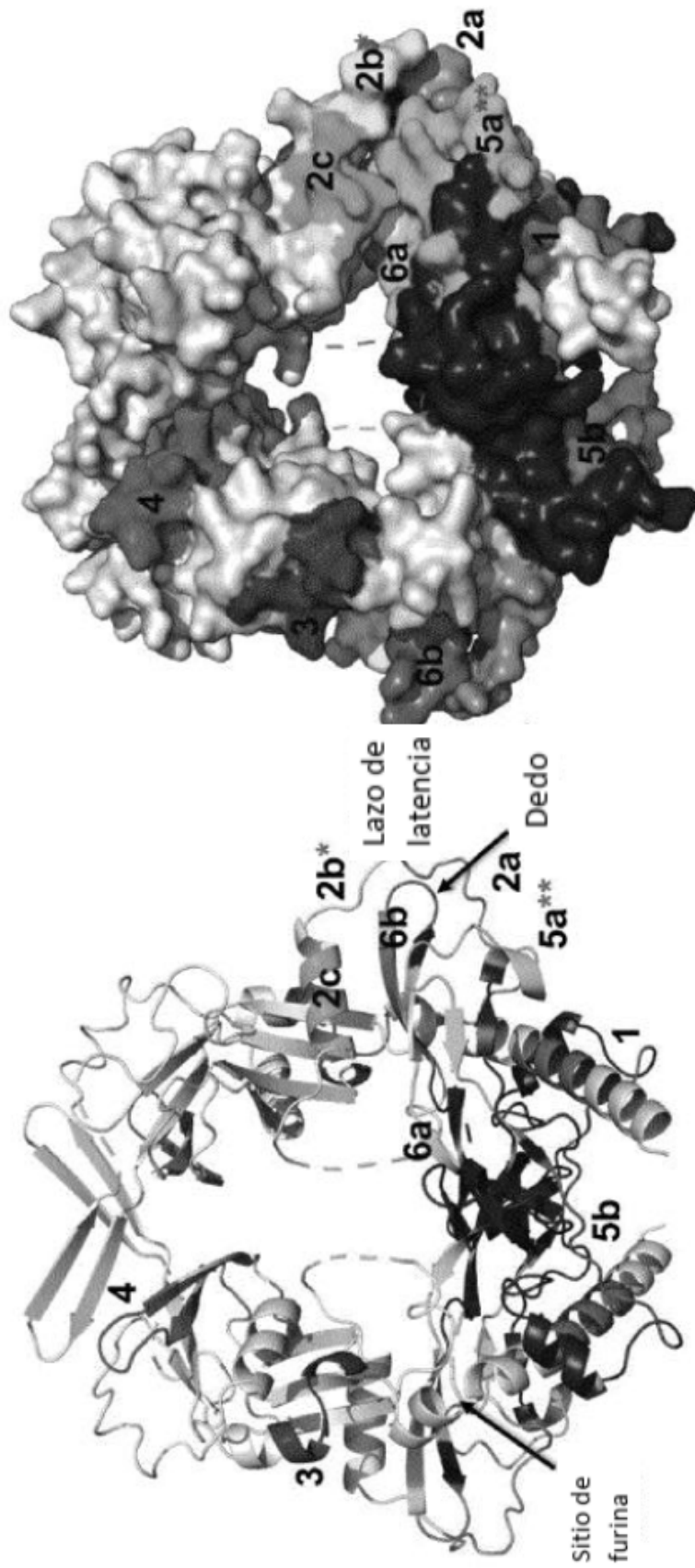


FIG. 21B



* Misma región protegida encontrada en Ab5 (Región 1)
 ** Subgrupo de región protegida encontrada en Ab5 (Región 2)

FIG. 22B

Mapeo de regiones protegidas por H/DX de proTGFβ1 por unión de Ab6

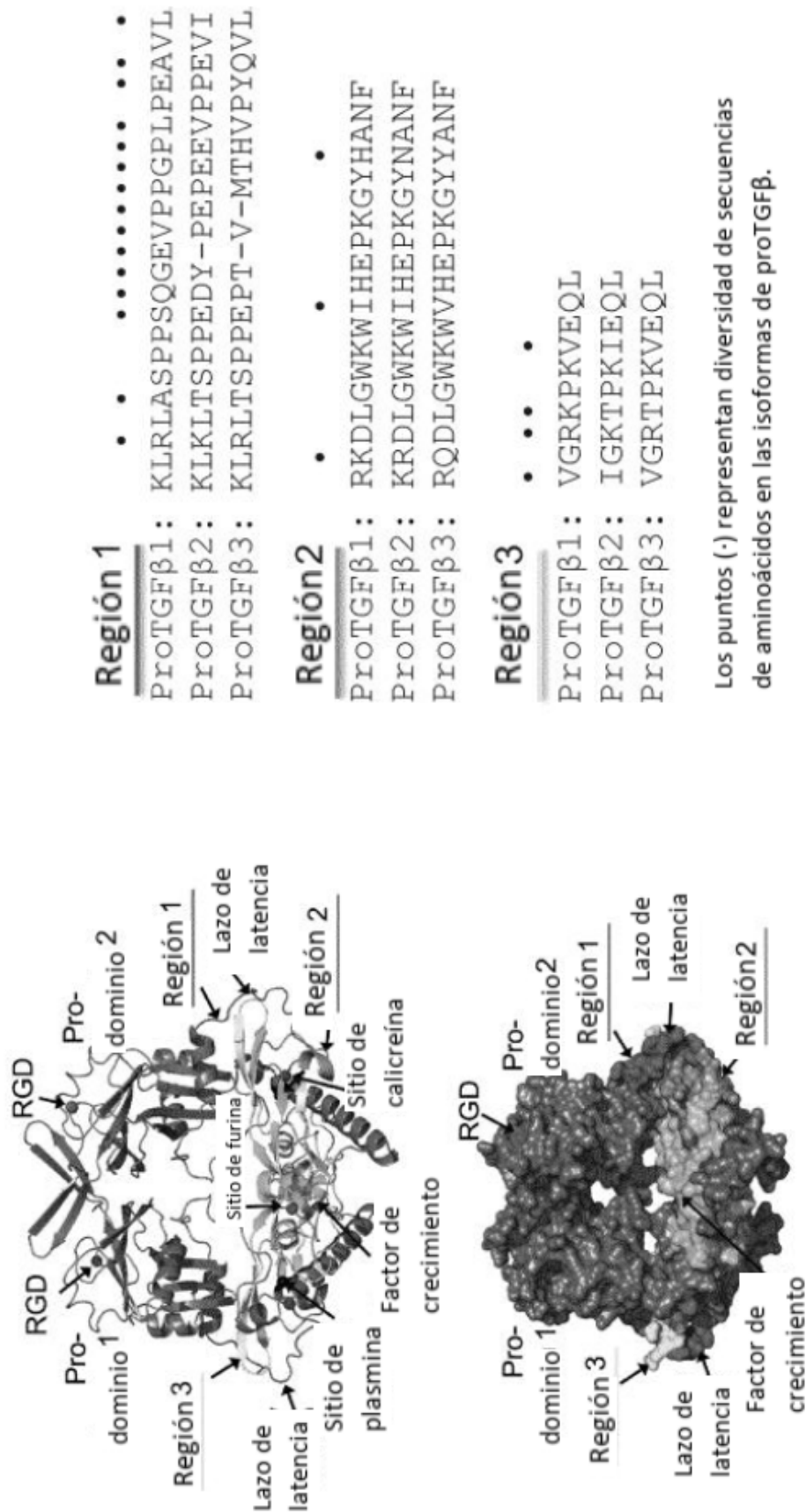


FIG. 23A

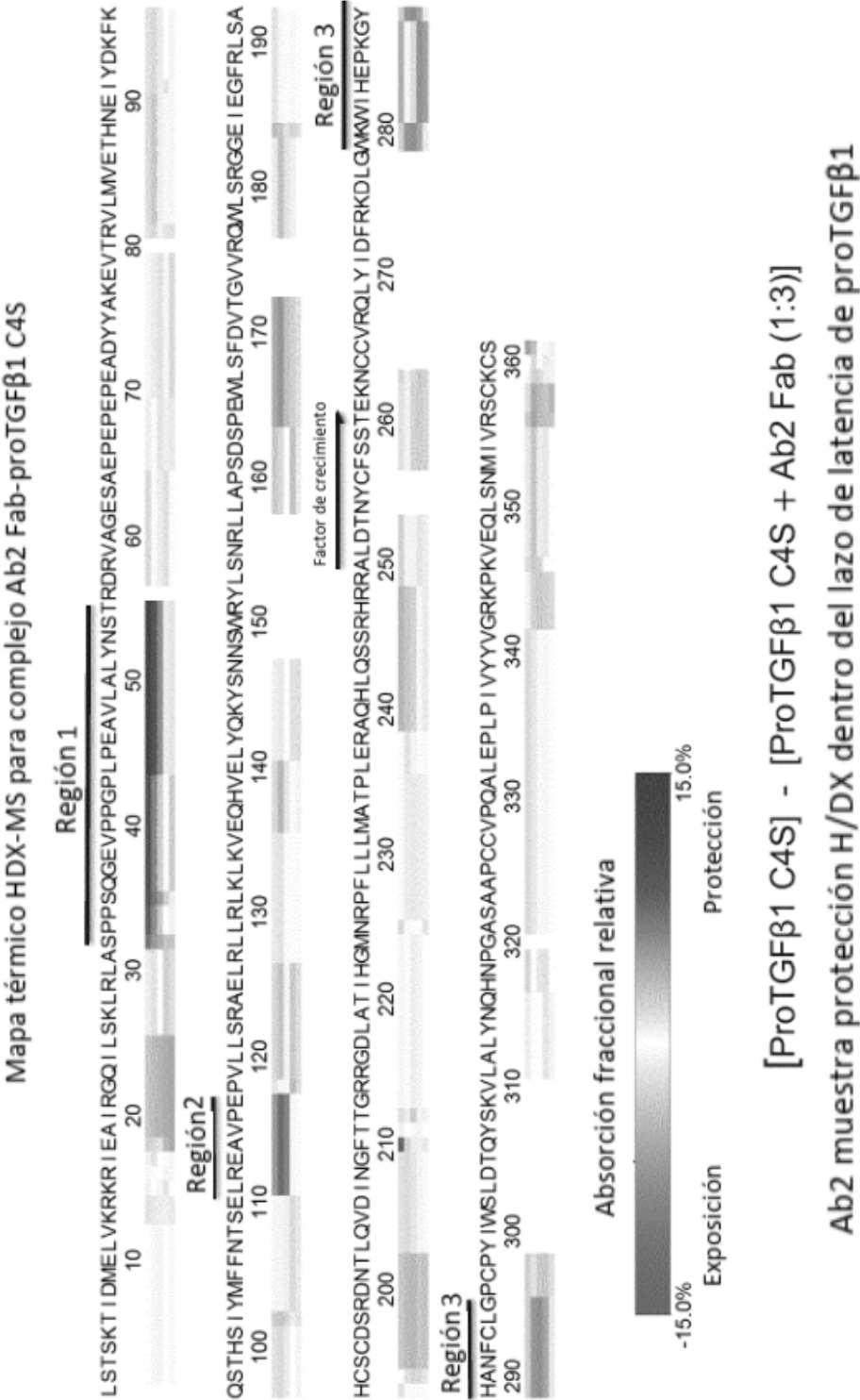


FIG. 23B

Las regiones protegidas de Ab2 muestran diversidad de secuencias altas

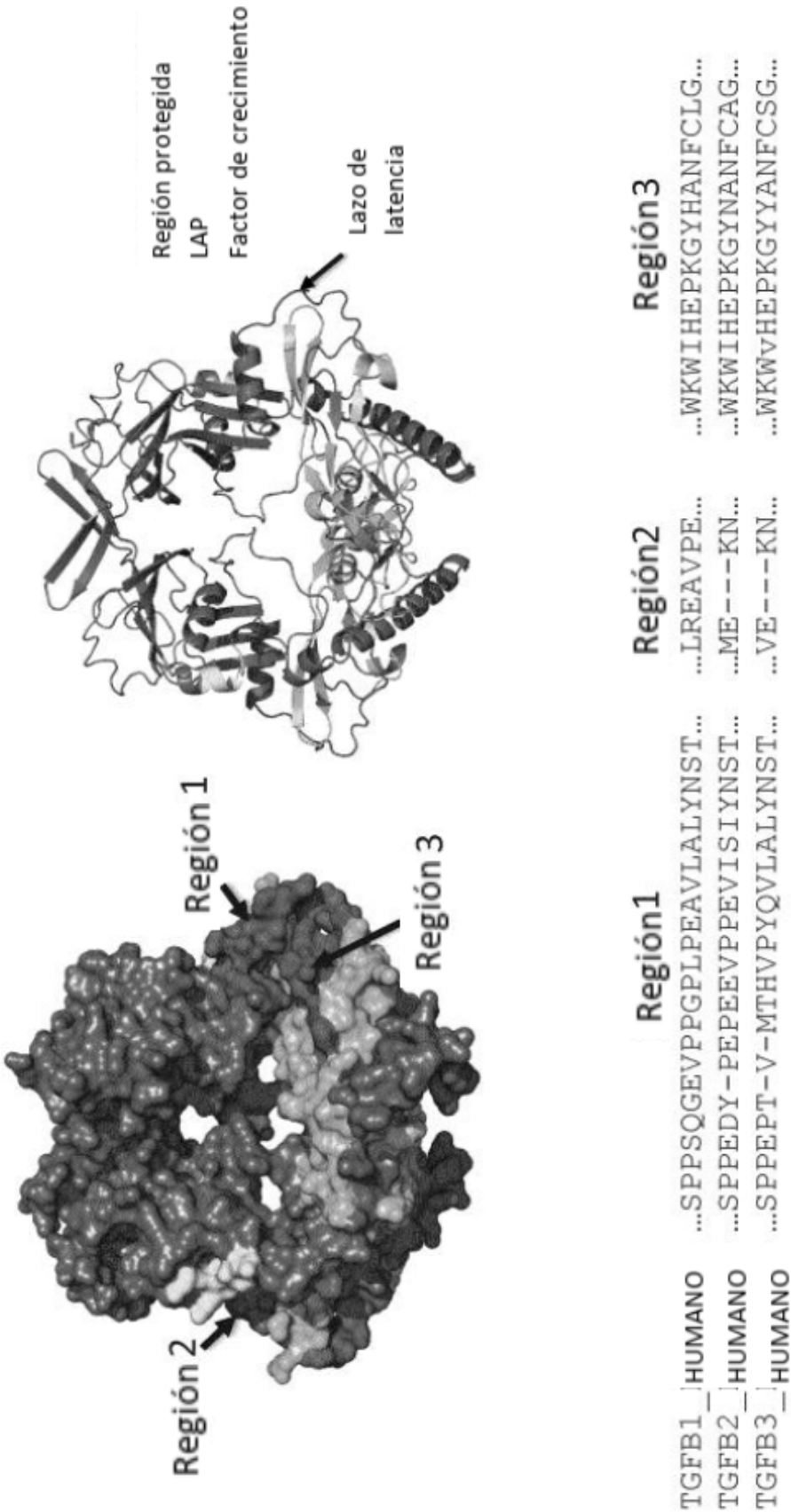


FIG. 24

Estructura de cristal del complejo de Ab2-Fab/ProTGFβ

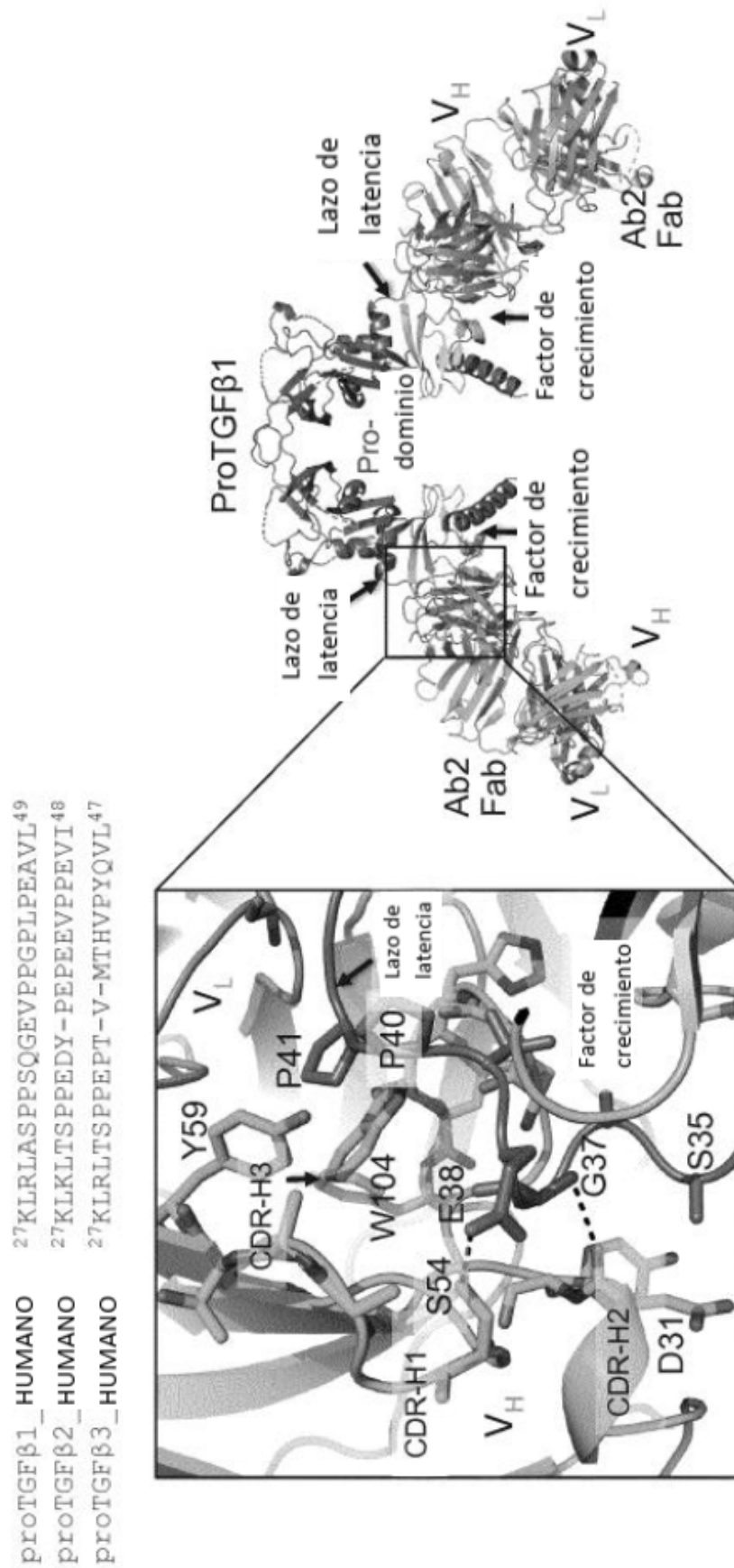


FIG. 25A Expresión de isoformas TGFβ vs. comparador normal (por tipo de cáncer)

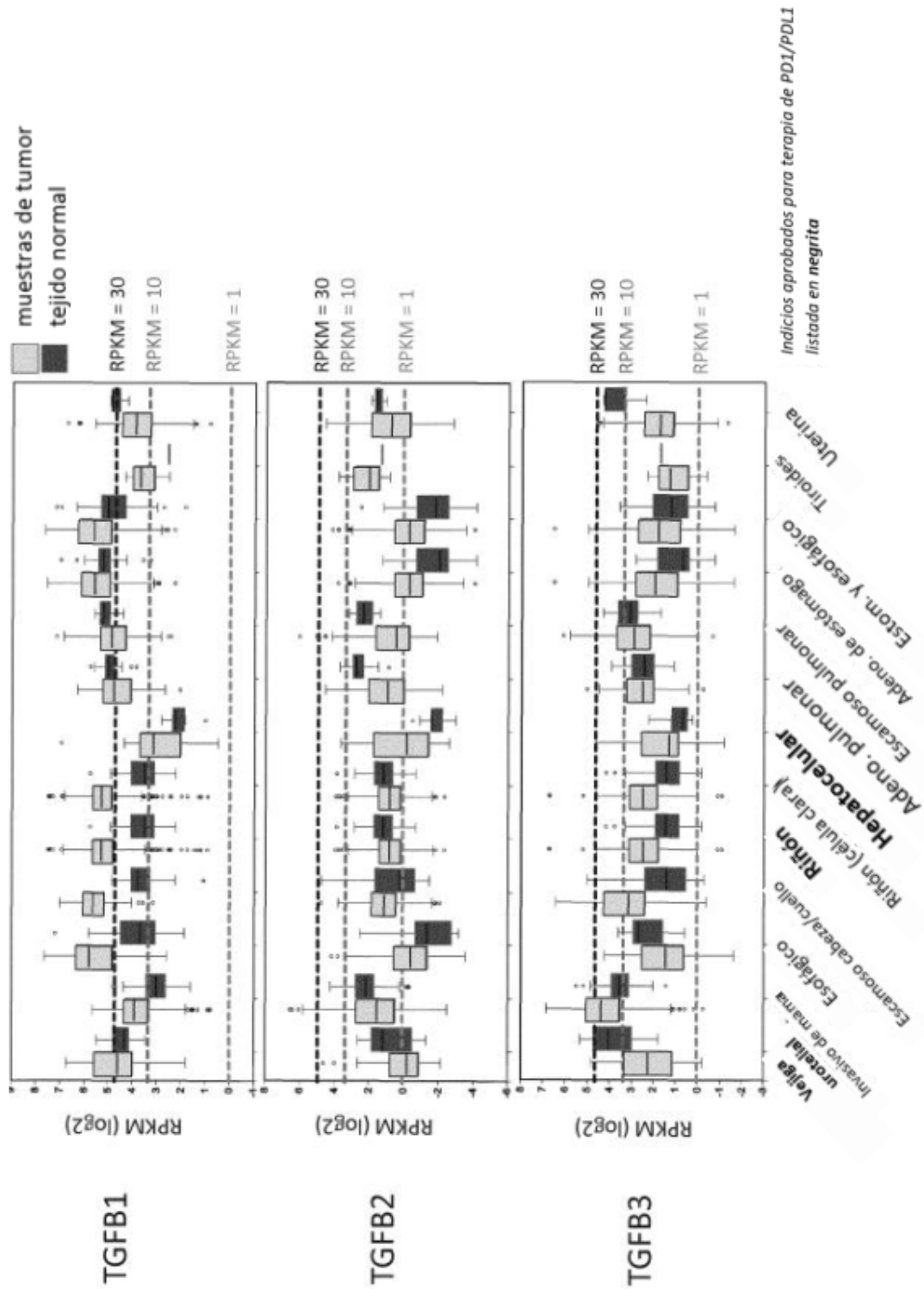


FIG. 25B Porcentaje de tumores que expresan isoformas de TGF β , por tipo de cáncer

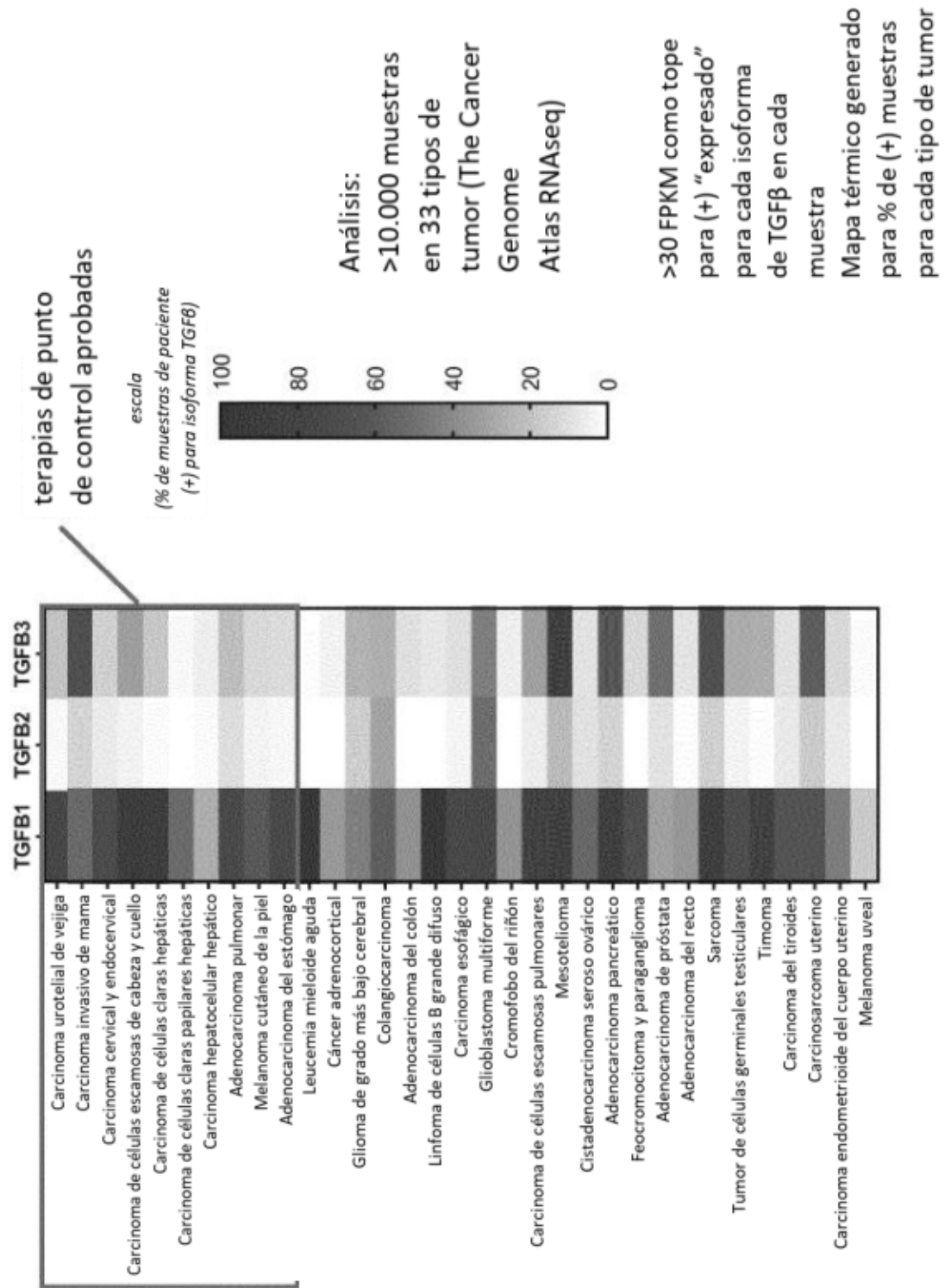
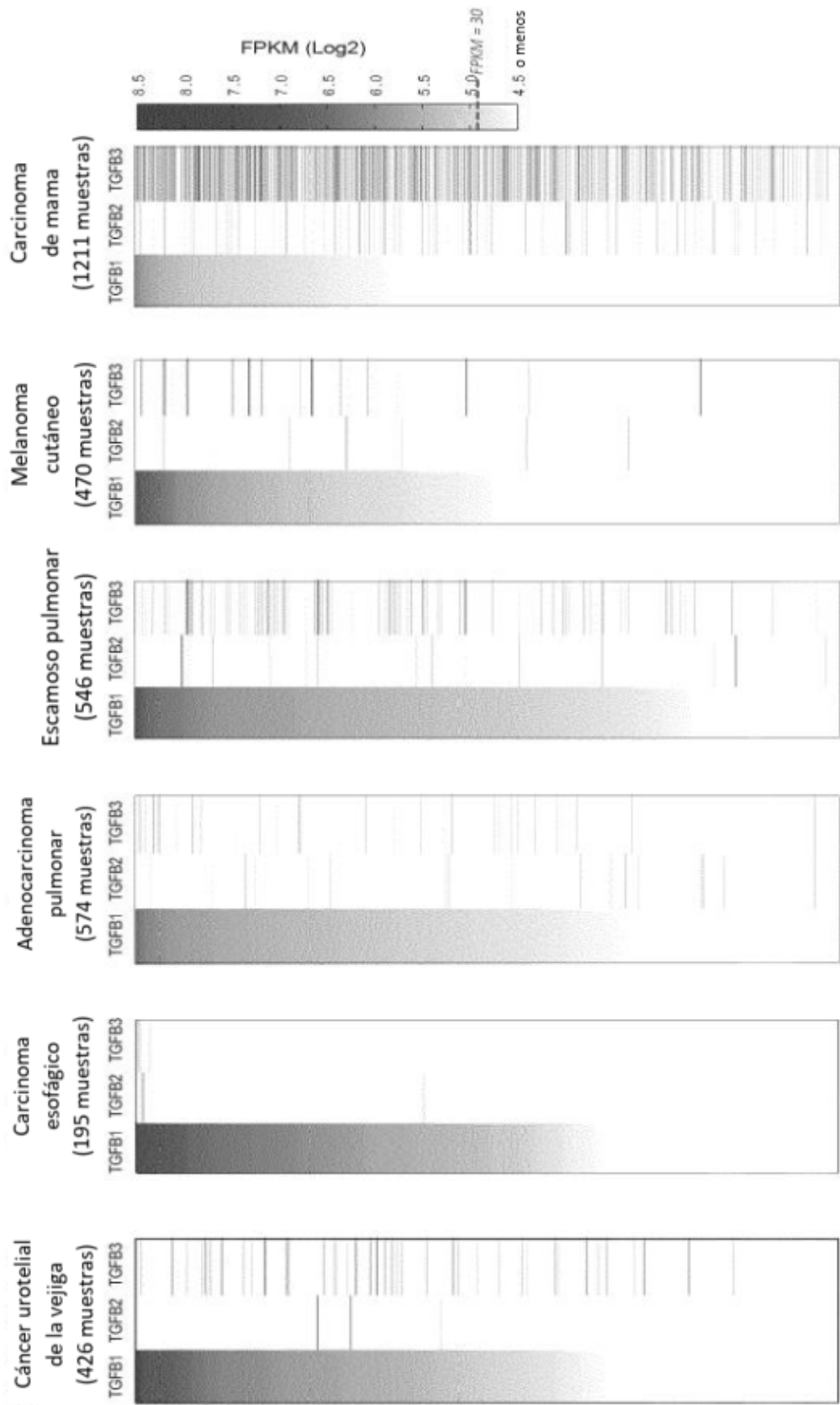


FIG. 25C Expresión de isoformas de TGFβ en muestras de tumor individuales, por tipo de cáncer



Datos RNAsea de muestras de pacientes (TCGA): Umbral para grupo "positivo" a FPKM>30

FIG. 25D Expresión de isoformas de TGFβ en líneas de modelo de células cancerosas singeneicas de ratón

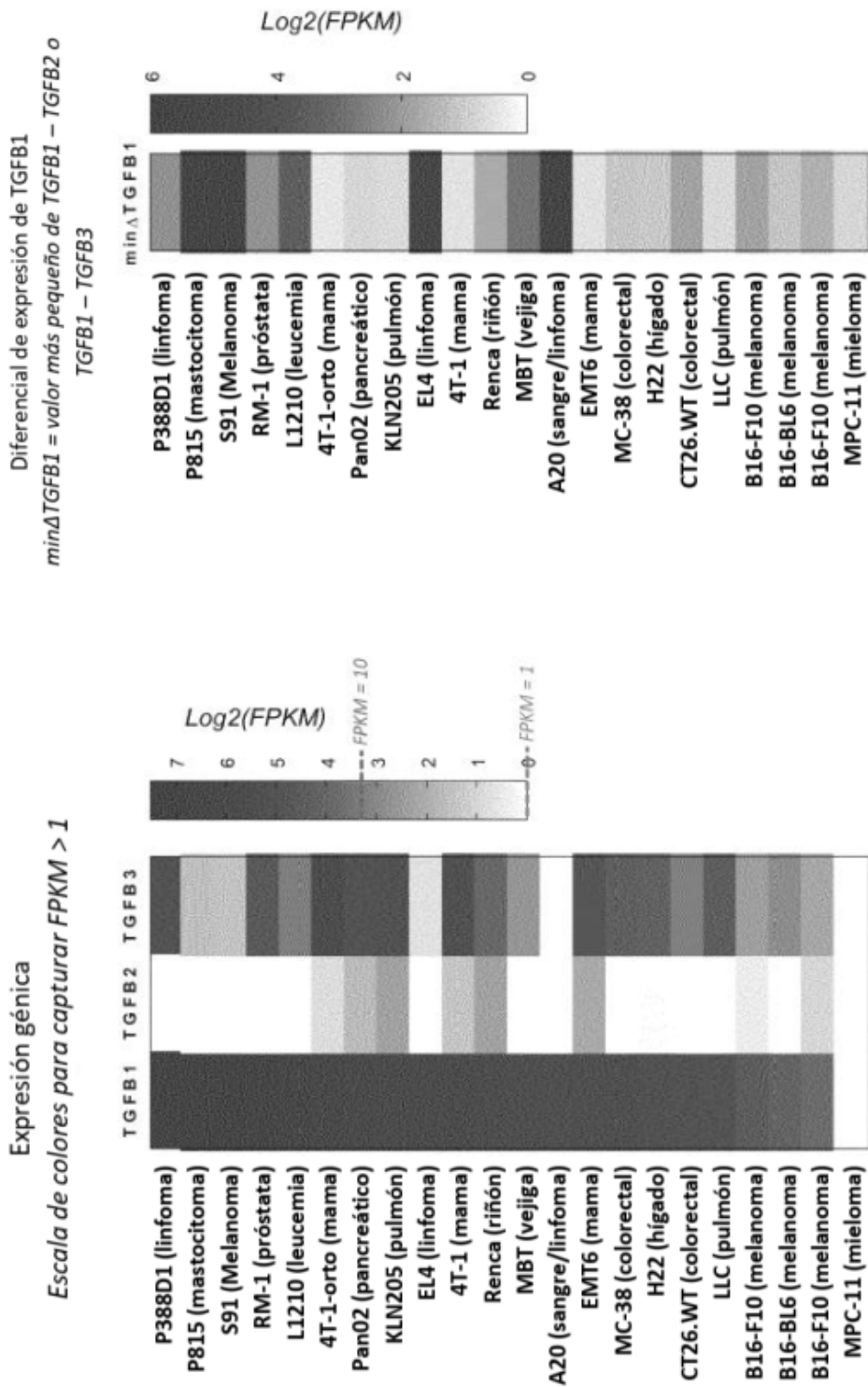


FIG. 25E
Todas las moléculas presentadoras están altamente expresadas en la mayor parte de los tipos de cáncer humano

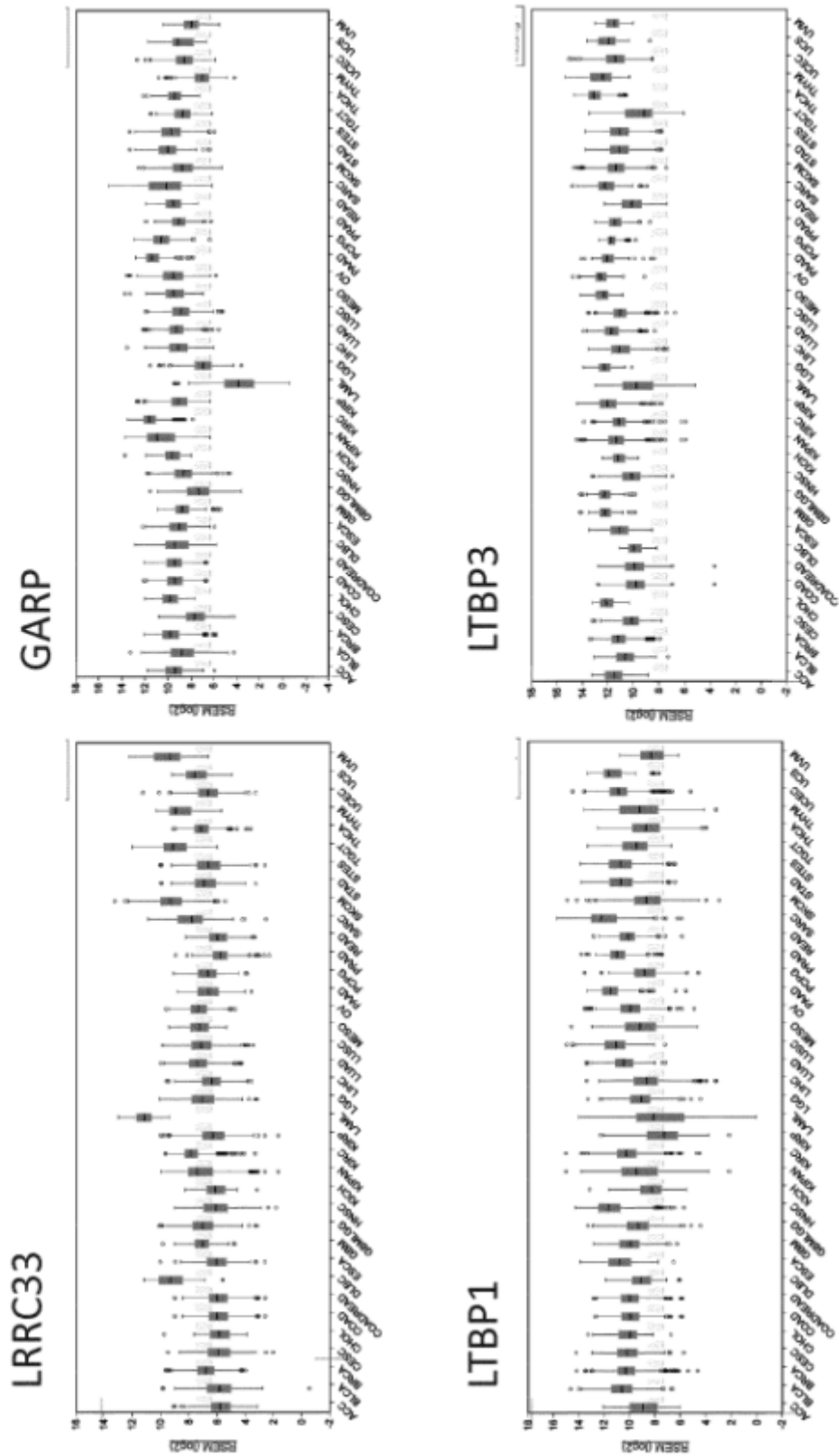


FIG. 25F

Selección de modelos de tumor de ratón singeneicos que
recapitulan los datos clínicos

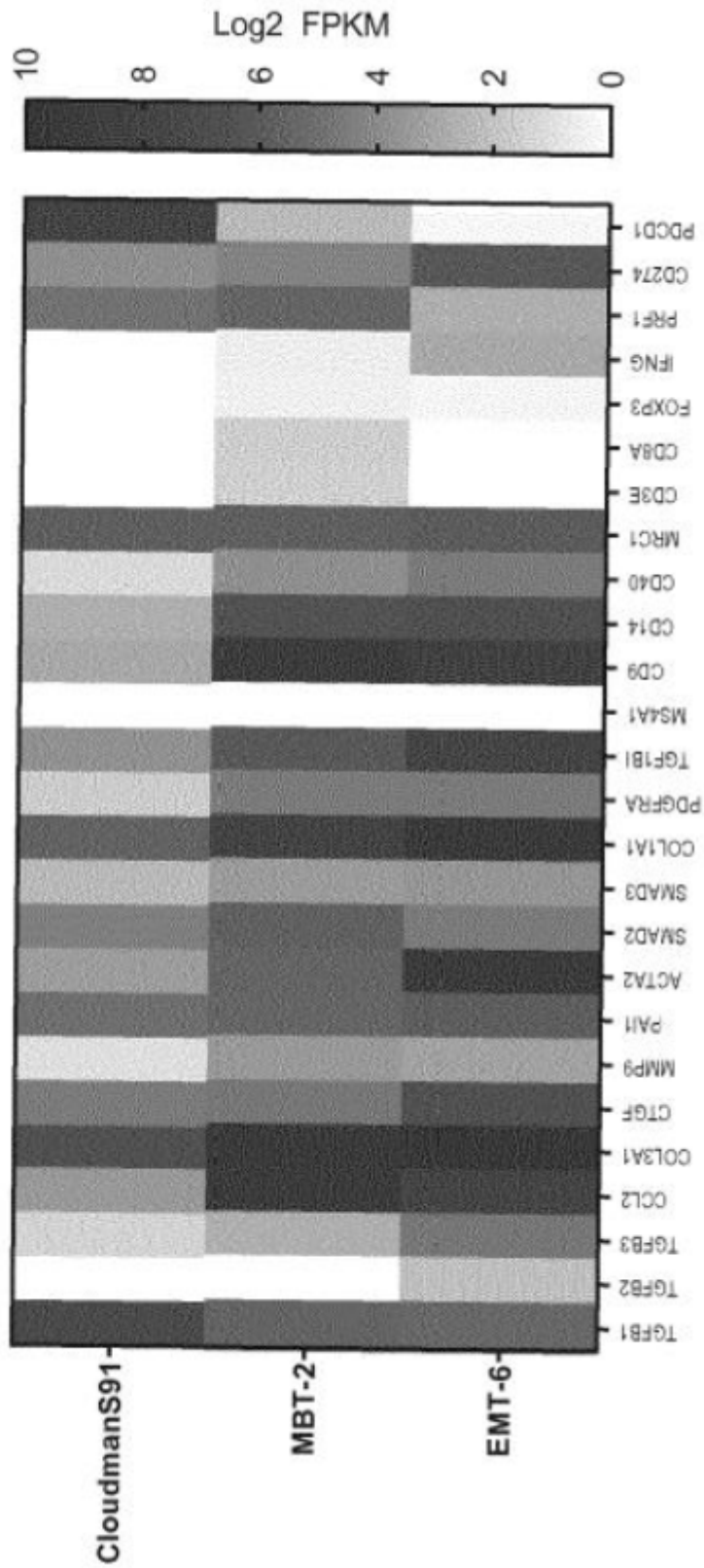


FIG. 25G
Expresiones de proteína relativas en modelos de tumor de ratón
singeneicos que recapitulan los datos clínicos

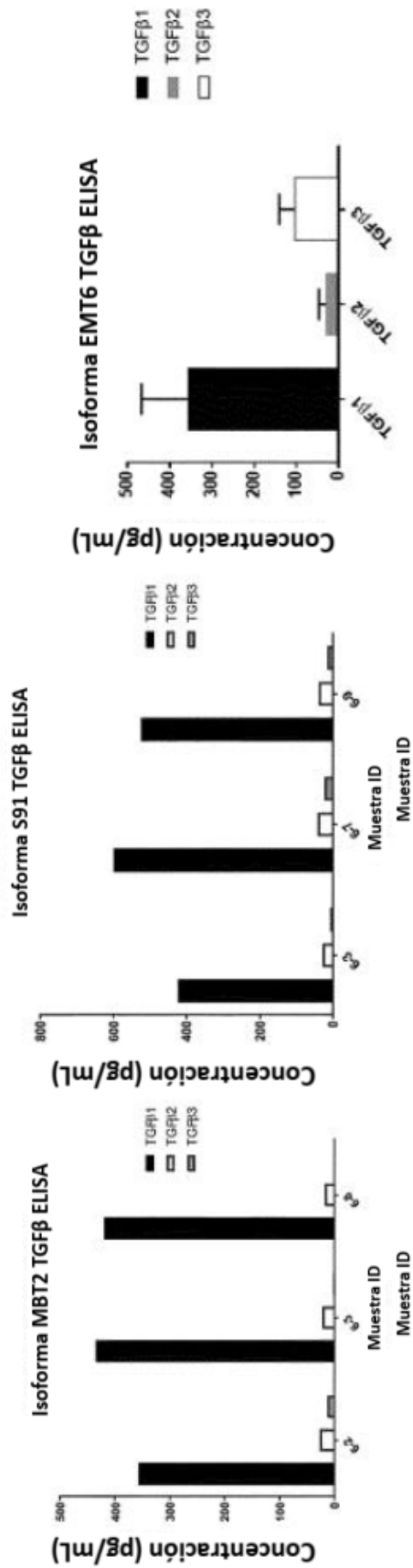


FIG. 25H

Expresiones relativas de ARN en modelos de tumor de ratón singeneicos que recapitulan datos clínicos

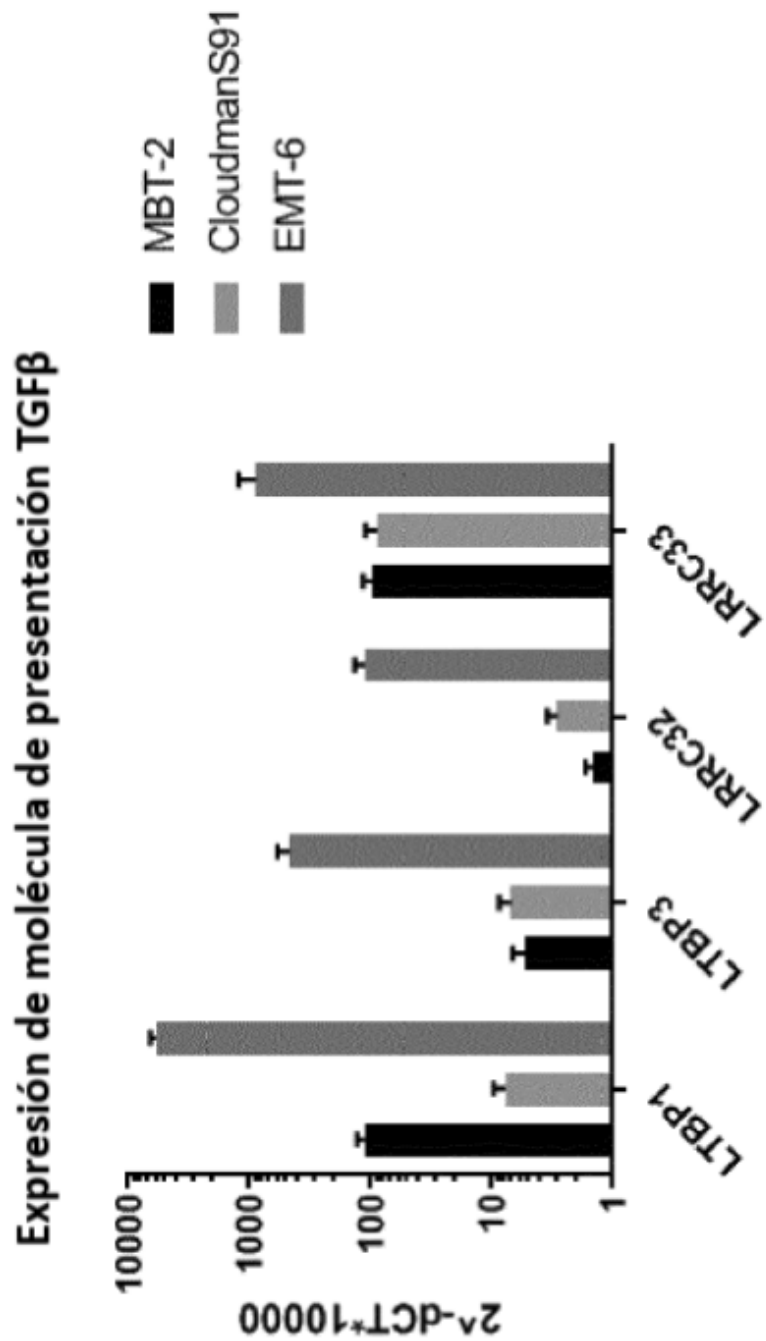


FIG. 26A

Datos de anticuerpo Pan-TGFβ de estudio de seguridad de toxicología de 1 semana

Ejemplo de corazón, resultados microscópicos

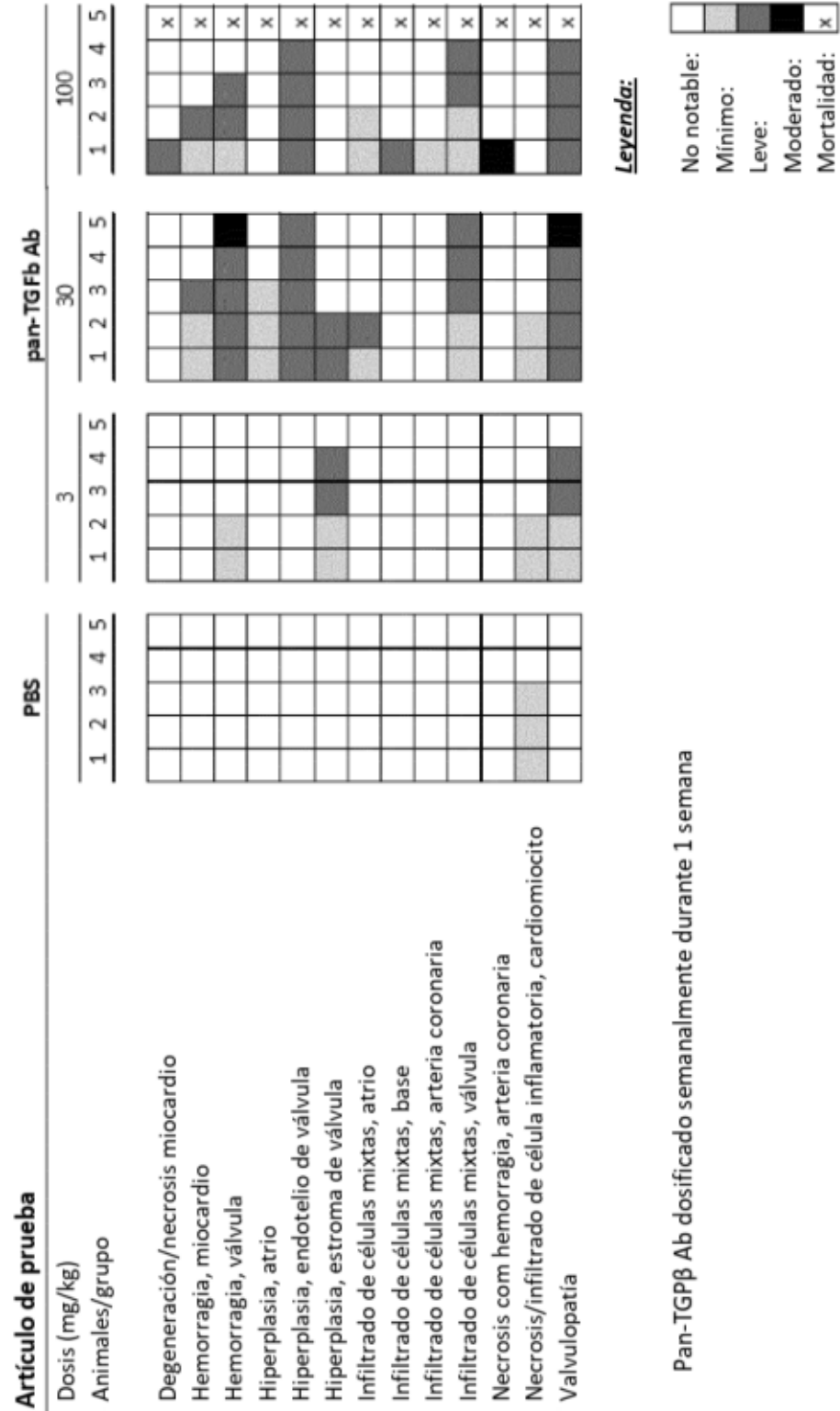


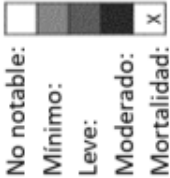
FIG. 26B

Datos de anticuerpo TGPβ (Ab3) de estudio de seguridad de toxicología de rata de 4 semanas de edad

Patología del corazón, resultados microscópicos

Artículo de prueba Dosis (mg/kg) Animales/grupo	PBS					SR-AB3					Inhibidor ALK5					pan-TGFβ Ab				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Degeneración/necrosis miocardio																				
Hemorragia, atrio																				
Hemorragia, miocardio																				
Hemorragia, válvula																				
Hiperplasia, endotelio de válvula																				
Infiltrado de células mixtas, válvula																				
Mineralización																				
Necrosis con hemorragia, arteria coronaria																				
Necrosis/infiltrado de célula inflamatoria, cardiomiocito																				
Valvulopatía																				

Leyenda:

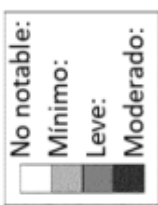


SR-AB3 dosificado semanalmente durante 4 semanas
Inhibidor ALK5 dosificado diariamente durante 5 días
Pan-TGFβ Ab dosificado semanalmente durante 1 semana

FIG. 26C

Datos de anticuerpo TGPβ (Ab6) de estudio de seguridad de toxicología de rata de 4 semanas de edad

Artículo de prueba Dosis (mg/kg)	PBS			SR-AB6			Inh. ALK5			Pan-TGFβ AB		
	10	30	100	10	30	100	300	300	300	30	30	30
Muerte temprana/sacrificio no programado												
Corazón												
Válvulas de corazón – Valvulopatía												
Atrio – Infiltrado de células mixtas												
Miocardio – Degeneración/necrosis												
Miocardio – Hemorragia												
Miocardio – Infiltrado de células mixtas, base												
Arteria coronaria – Necrosis con inflamación												
Cardiomiocito – Necrosis/Infiltrado de células inflamatorias												
Estérnon												
Espeor aumentado de zona hipertrófica												
Tibia												
Espeor aumentado de zona hipertrófica												
Fémur												
Espeor aumentado de zona hipertrófica												
Pulmón												
Congestión/hemorragia												
Infiltración de linfocitos/macrofagos												
Alvéolo, macrofagos infiltrantes												
Colón												



SR-AB6 dosificado semanalmente durante 4 semanas
 Inhibidor ALK5 dosificado diariamente durante 7 días
 Pan-TGFβ Ab dosificado semanalmente durante 1 semana
 Concentración sérica de Ab6 alcanzó 2.300 µg/ml a 100 mg/kg durante 4 sem.

FIG. 26D

Datos de estudio de seguridad de toxicología de rata de 4 semanas de edad en ratas Sprague Dawley

Artículo de prueba	PBS					Inhibidor ALK5					pan-TGFβ Ab				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Dosis (mg/kg)															
Muerte temprana/sacrificio no programado															
Animales/grupo															
Corazón															
Válvulas de corazón – Valvulopatía															
Atrio – Infiltrado de células mixtas															
Atrio – Hemorragia															
Miocardio – Degeneración/necrosis															
Miocardio – Hemorragia															
Miocardio – Infiltrado de células mixtas, base															
Arteria coronaria – Necrosis con inflamación															
Cardiomiocito – Necrosis/infiltrado de células inflamatorias															
Estérnon															
Espesor aumentado de zona hipertrofica															
Tibia															
Espesor aumentado de zona hipertrofica															
Fémur															
Espesor aumentado de zona hipertrofica															
Pulmón															
Congestión/hemorragia															
Infiltración de linfocitos/macrófagos															
Alvéolo, macrófagos infiltrantes															
Cristales eosinofílicos															
Hemorragia aguda															
Hipertrofia pneumocítica															
Eosinófilos infiltrantes perivasculares															
Macrófagos infiltrantes, vacuolados															
Infiltrados de células mixtas															

Legenda:

No notable: 
 Mínimo: 
 Leve: 
 Moderado: 

Dosificación de ALK5i fue p.o. qd x 7

Dosificación de panTGFb Ab de alta afinidad fue IV una vez

Animales de fase I fueron evaluados después de 7 días

FIG. 26E

Datos de estudio de seguridad de toxicología de rata de 4 semanas de edad en ratas Sprague Dawley

Artículo de prueba		PBS					Ab3					Ab2				
Dosis (mg/kg)																
Muerte temprana/sacrificio no programado																
Animales/grupo																
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Corazón	Válvulas de corazón – Valvulopatía															
	Atrio – Infiltrado de células mixtas															
	Atrio – Hemorragia															
	Miocardio – Degeneración/necrosis															
	Miocardio – Hemorragia															
	Miocardio – Infiltrado de células mixtas, base															
Estérnon	Arteria coronaria – Necrosis con inflamación															
	Cardiomiocito – Necrosis/infiltrado de células inflamatorias															
	Espeor aumentado de zona hipertrófica															
	Espeor aumentado de zona hipertrófica															
	Espeor aumentado de zona hipertrófica															
	Espeor aumentado de zona hipertrófica															
Pulmón	Congestión/hemorragia															
	Infiltración de linfocitos/macrófagos															
	Alvéolo, macrófagos infiltrantes															
	Cristales eosinofílicos															
	Hemorragia aguda															
	Hipertrofia pneumocítica															
Colón	Eosinófilos infiltrantes perivascular															
	Macrófagos infiltrantes, vacuolados															
	Infiltrados de células mixtas															

Legenda:

No notable: 
Mínimo: 
Leve: 
Moderado: 

"Un animal administrado 30 mg/kg/dosis [Ab2] fue encontrado muerto inmediatamente después de la dosificación en el día 8 de fase II. Esta muerte estaba relacionada al proceso de dosificación y no relacionada con el artículo. No hubo otra mortalidad durante la duración de la Fase II"

Dosificación de anticuerpos fue qd x 4; IV
Animales de fase II fueron evaluados después de 28 días

FIG. 27

Efecto de combinación en crecimiento de tumor S91 observado con inhibidores TGF β independientes del contexto múltiples

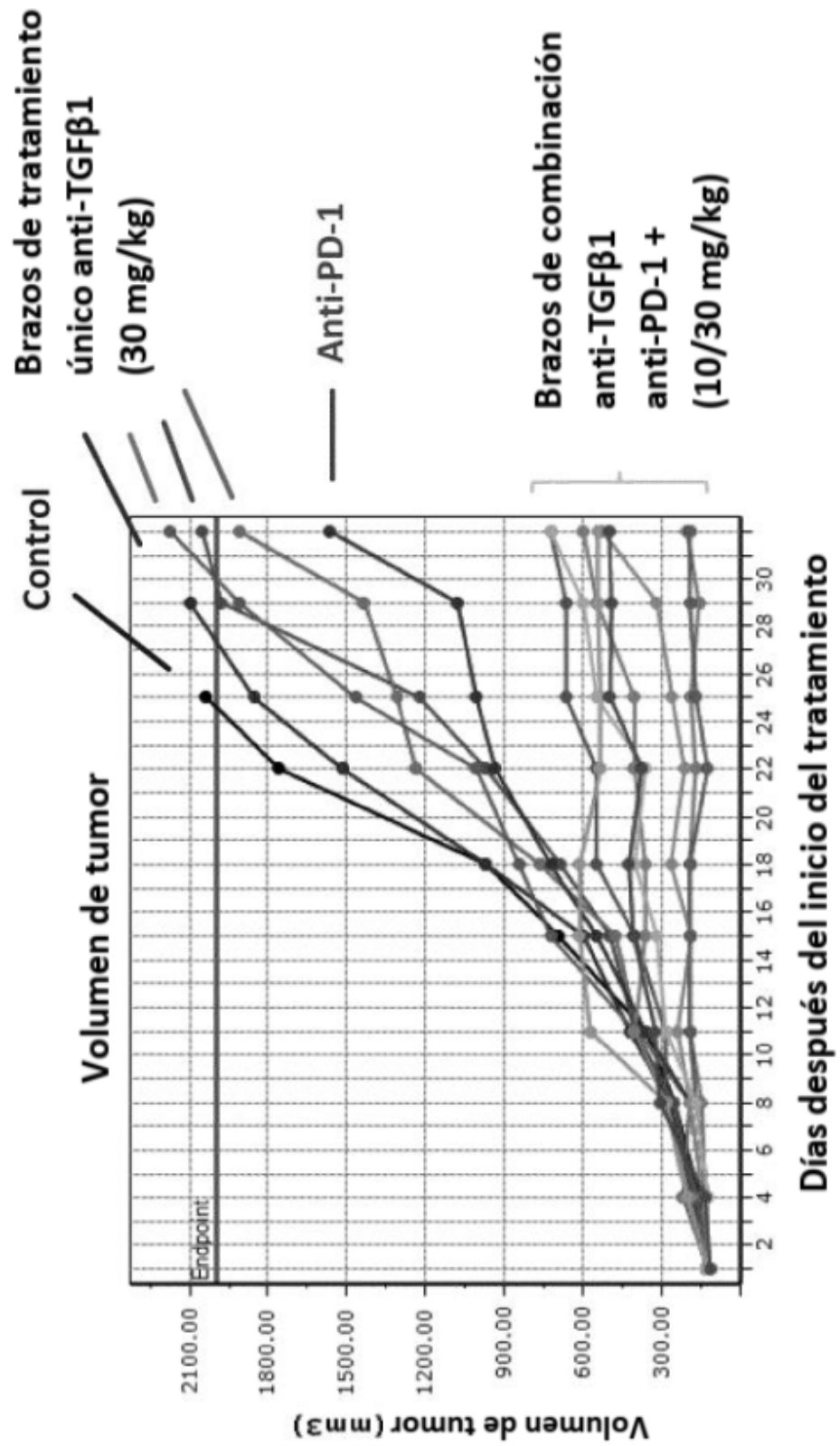
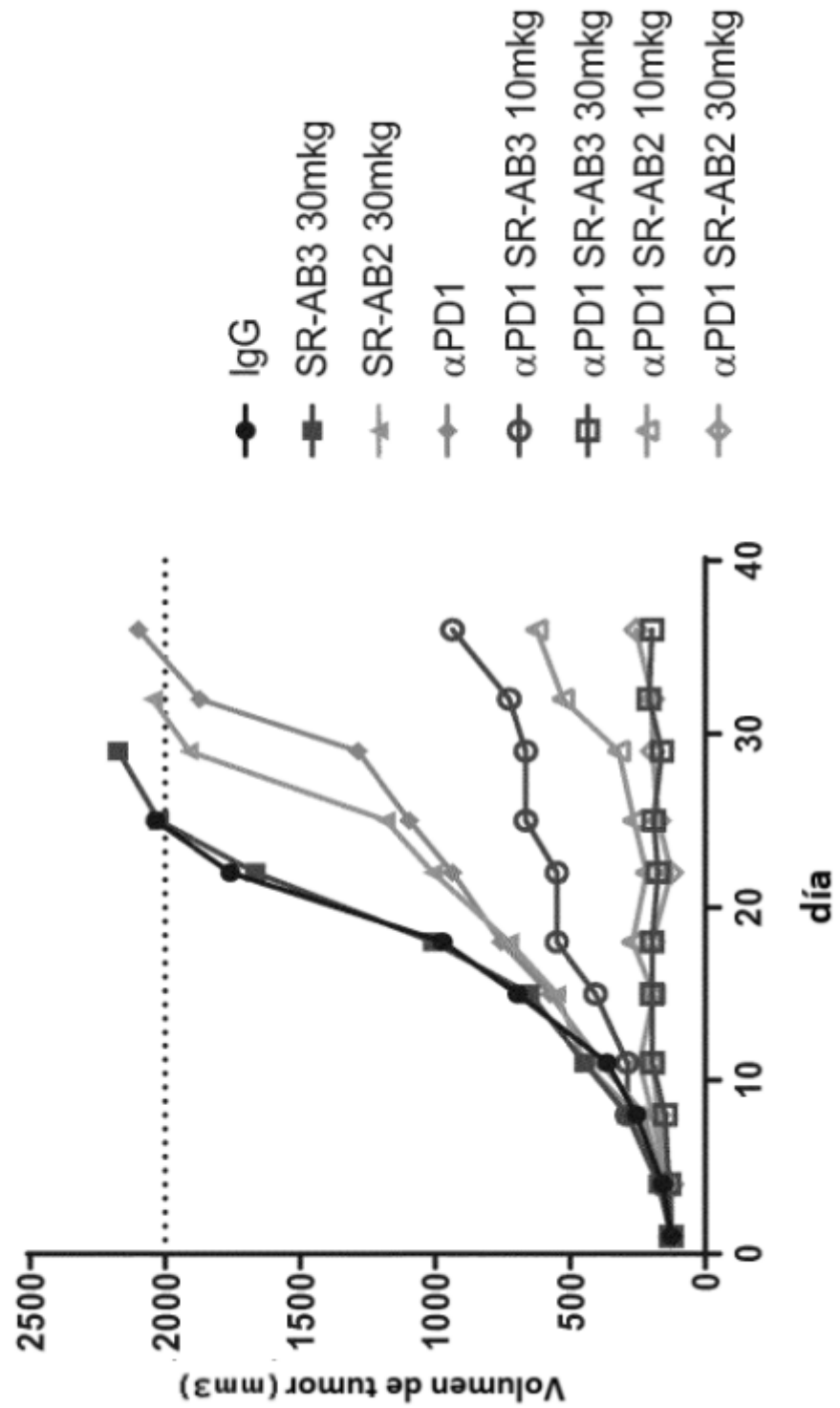


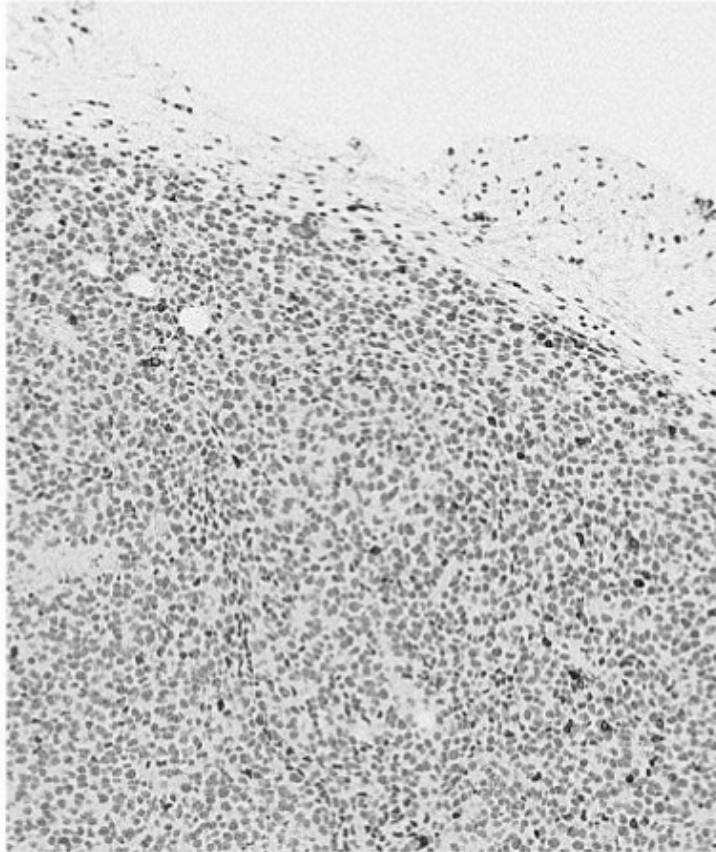
FIG. 28

Efecto de combinación en crecimiento de tumor S91 observado con inhibidores de TGF β 1 independientes de contexto y anti-PD-1



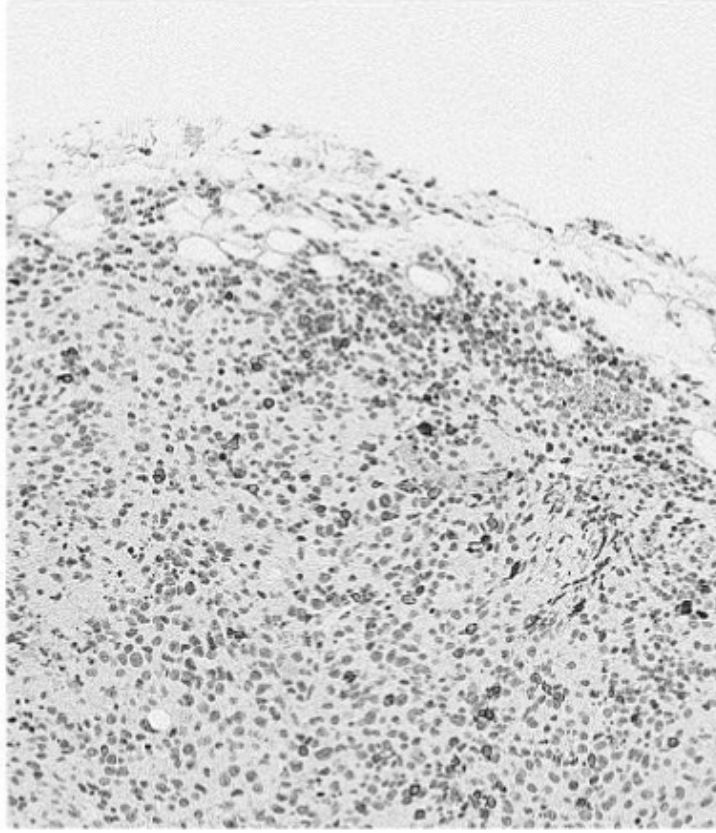
Inhibición de TGFβ1 y PD-1 lleva a un aumento en células T CD8 en tumores S91

FIG. 29A



Tratado con anti-PD-1;
Teñido con un marcador de CD8+ (CD8a)

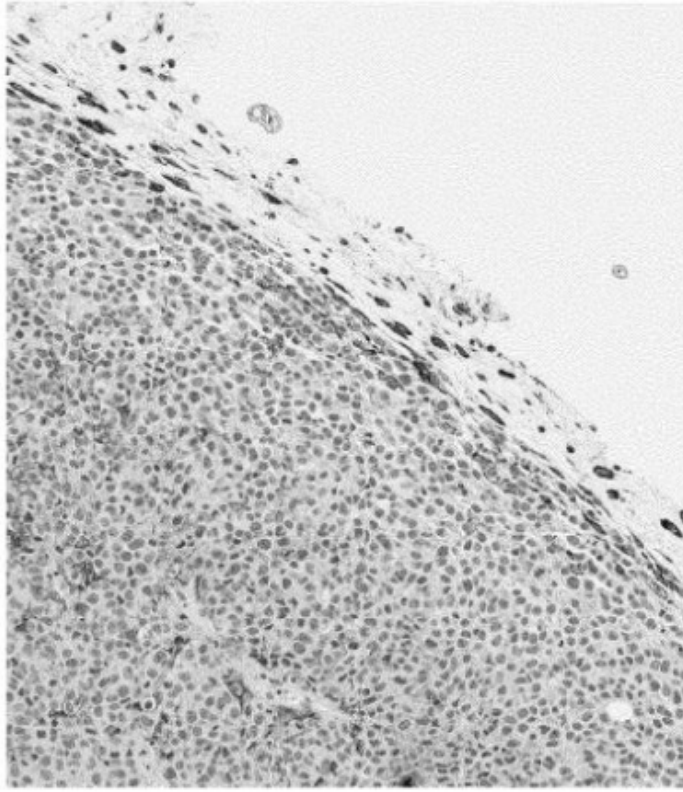
FIG. 29B



Tratado con anti-PD-1 + inhibidor de
TGFβ1 independiente de contexto
Teñido con un marcador CD8+ (CD8a)

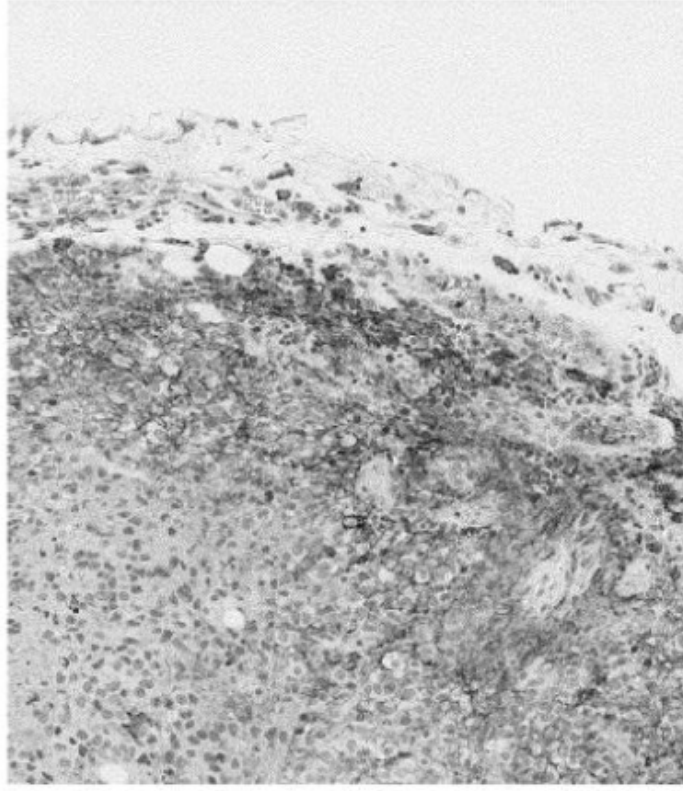
Infiltración de macrófagos en tumores S91 observados después del tratamiento de combinación

FIG. 30A



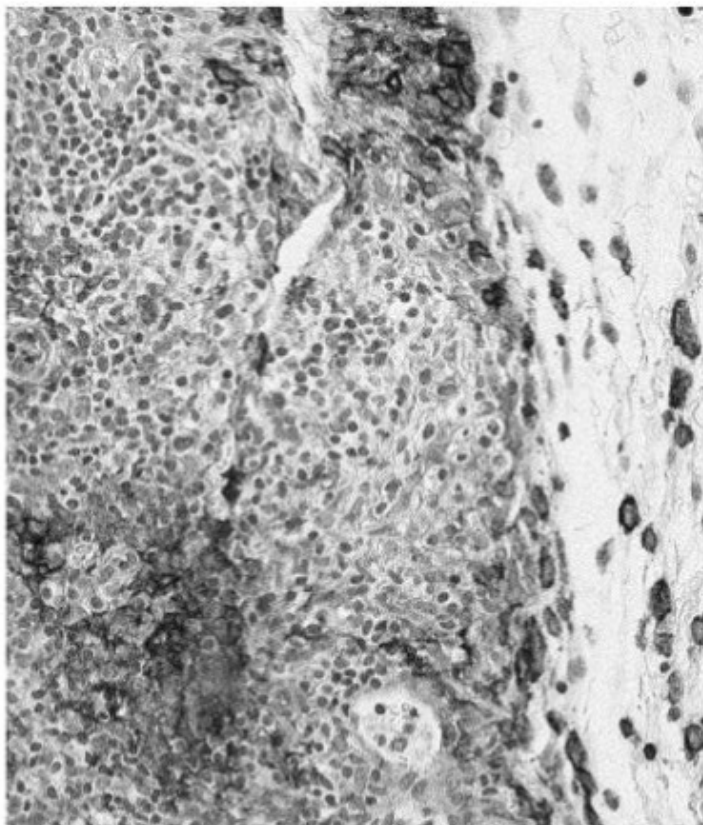
Tratado con anti-PD-1;
Teñido con un marcador de macrófagos
(F4/80)

FIG. 30B



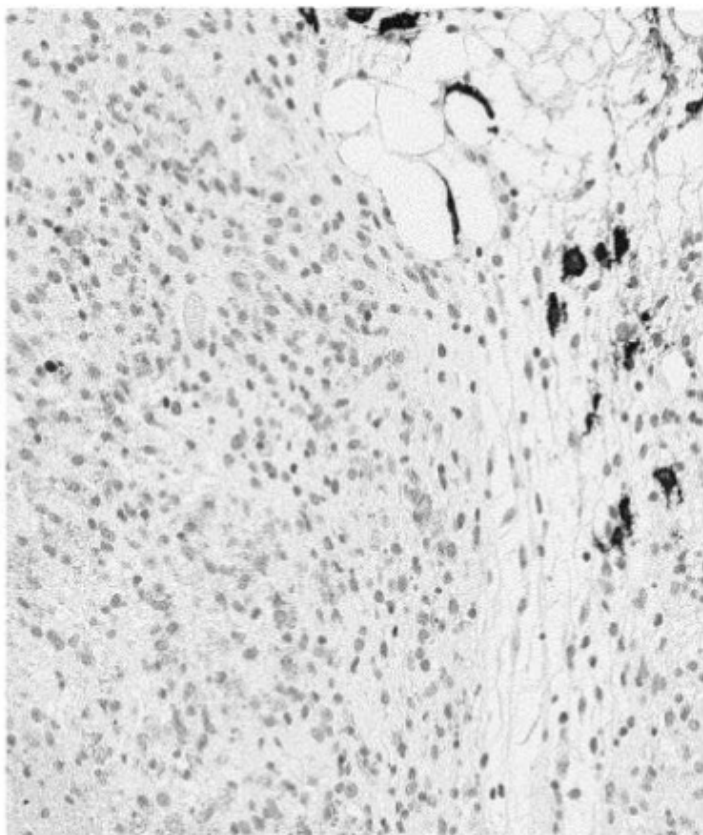
Tratado con anti-PD-1 + inhibidor de
TGFβ1 independiente de contexto
Teñido con un marcador de macrófagos (F4/80)

FIG. 30C



F4/80

FIG. 30D

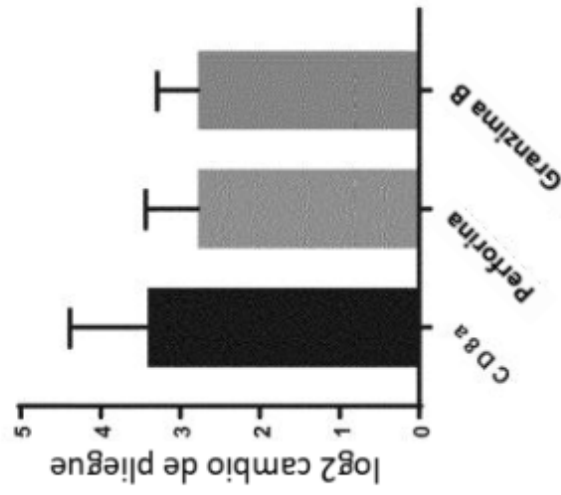


CD163

Anti-PD1 plus inhibidor de TGFβ1 independiente de contexto 30 mg/kg

FIG. 31

Combinación de inhibidor anti-PD1/anti-TGF β 1 (AB3) induce un aumento de marcadores de células T CD8 en tumores de MBT2

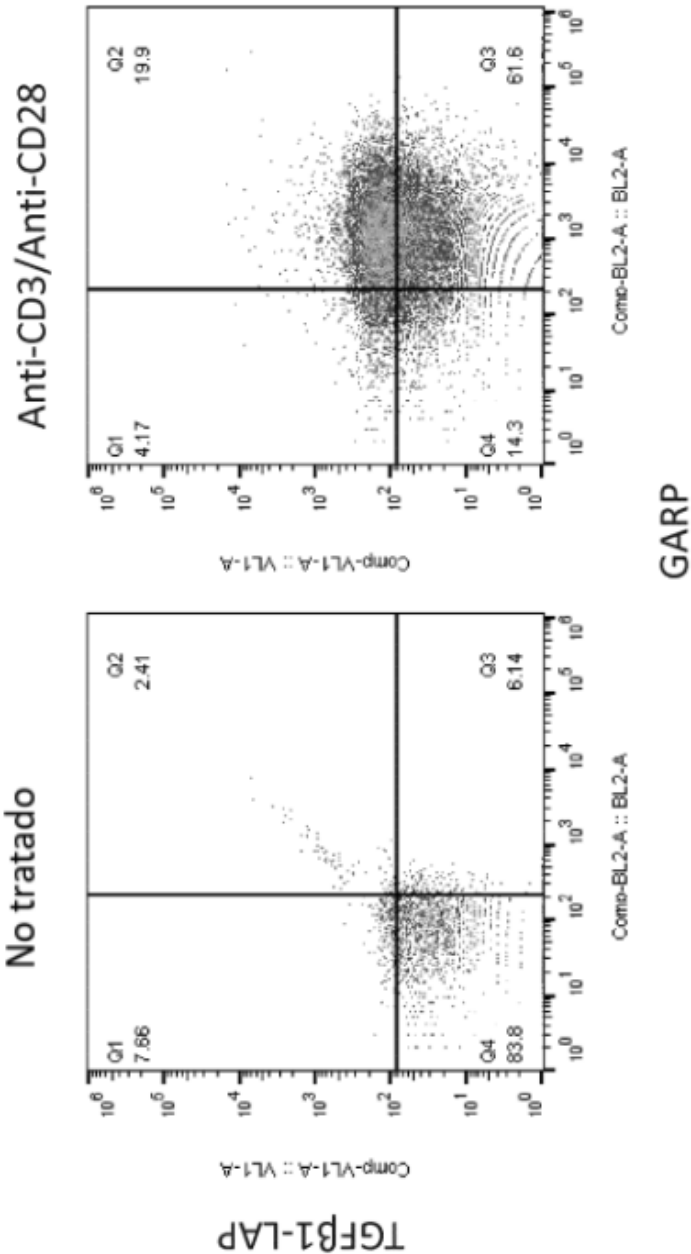


Anti-PD1/SR-AB3 sobre anti-PD1

N = 10 animales/grupo

FIG. 32A

Activación Tregs humanos periféricos induce expresión de superficie de células GARP y TGFβ1



nTregs humano clasificados aumentaron el complejo de GARP-proTGFβ1 después de la estimulación de CD3/CD28

FIG. 32B

Efectos de anticuerpos TGF β 1 en inhibición
mediada por Treg de proliferación Teff

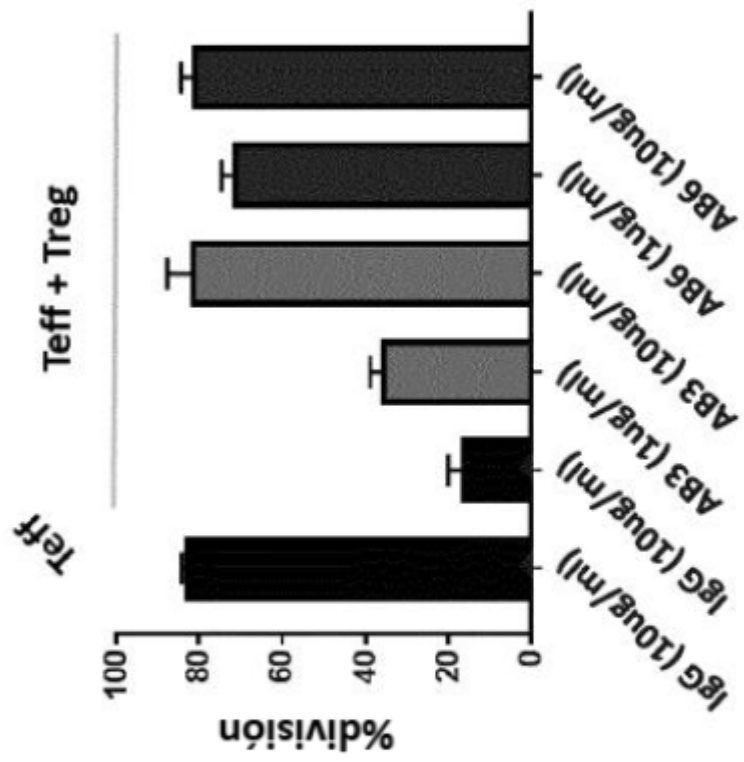
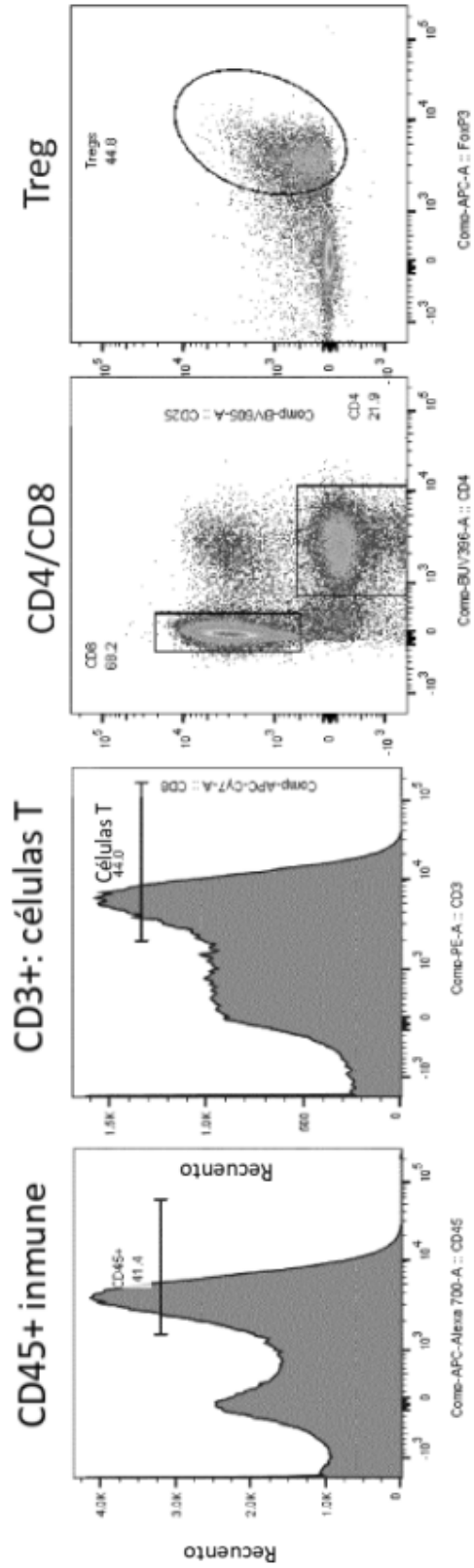


FIG. 33A

Estrategia de *gating* para elucidar subgrupos de células T en tumores MBT-2

Células -> discriminación de dobletes -> células vivas



CD8+ anti-tumor: células T citotóxicas (CTL): CD3+CD8+
CD4+ auxiliar: CD3+CD4+
Células T regulatorias CD3+CD4+Foxp3+

Todos los portales obtenidos de controles FMO

FIG. 33B
Subgrupos de células T en tumores MBT-2

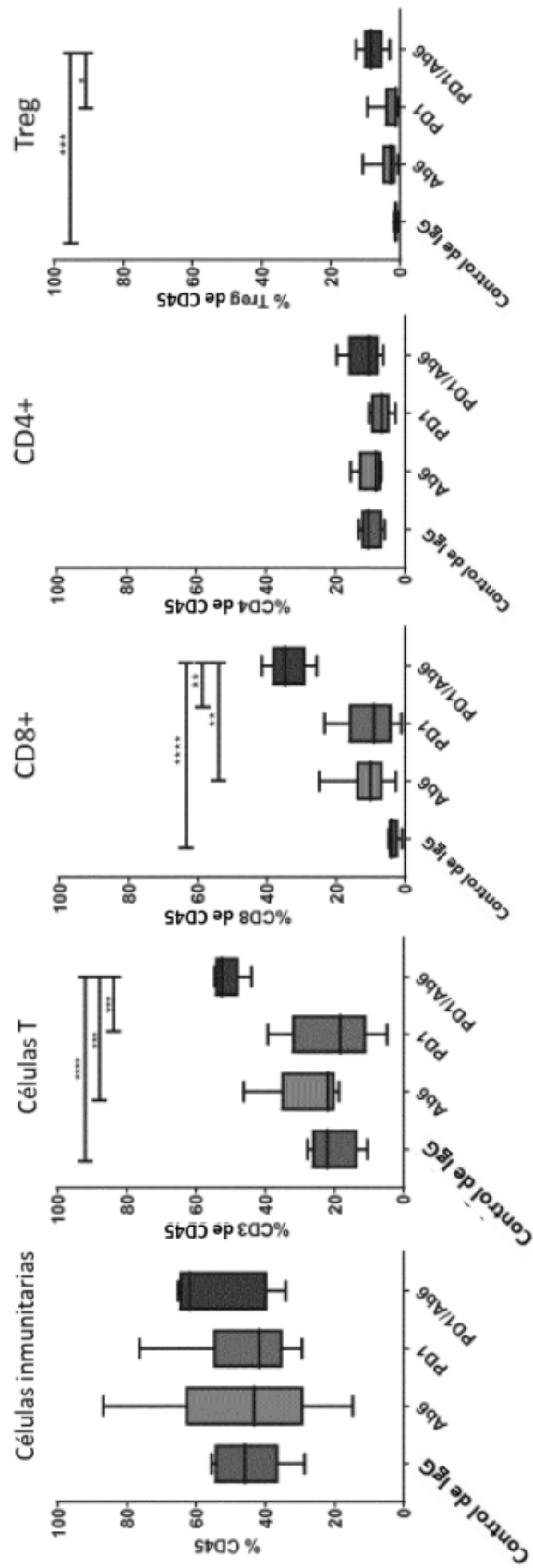
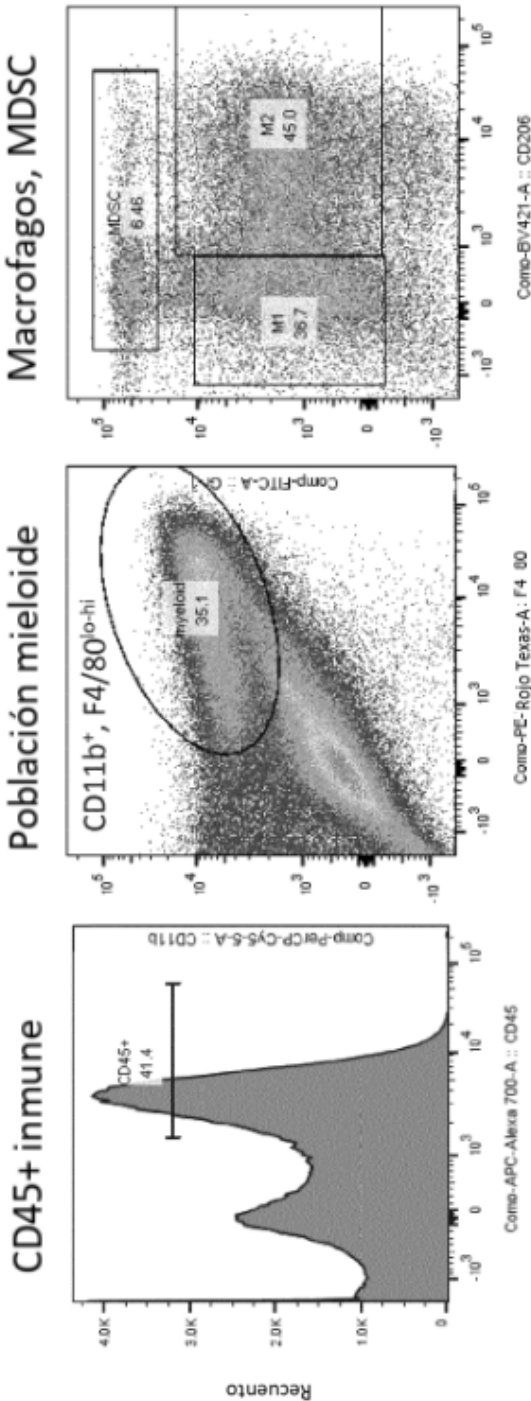


FIG. 34A

Estrategia de gating para elucidar subgrupos de mieloides en tumores MBT-2

Células -> discriminación de dobletes -> células vivas



M1 (anti-tumor) MΦ: CD11b+F4/80+/CD206-

M2 (pro-tumor) MΦ: CD11b+F4/80+/CD206+

MDSC: CD11b+F4/80-/GR-1+

Todos los portales obtenidos de controles FMO

FIG. 34B
Subgrupos de células T en tumores MBT-2

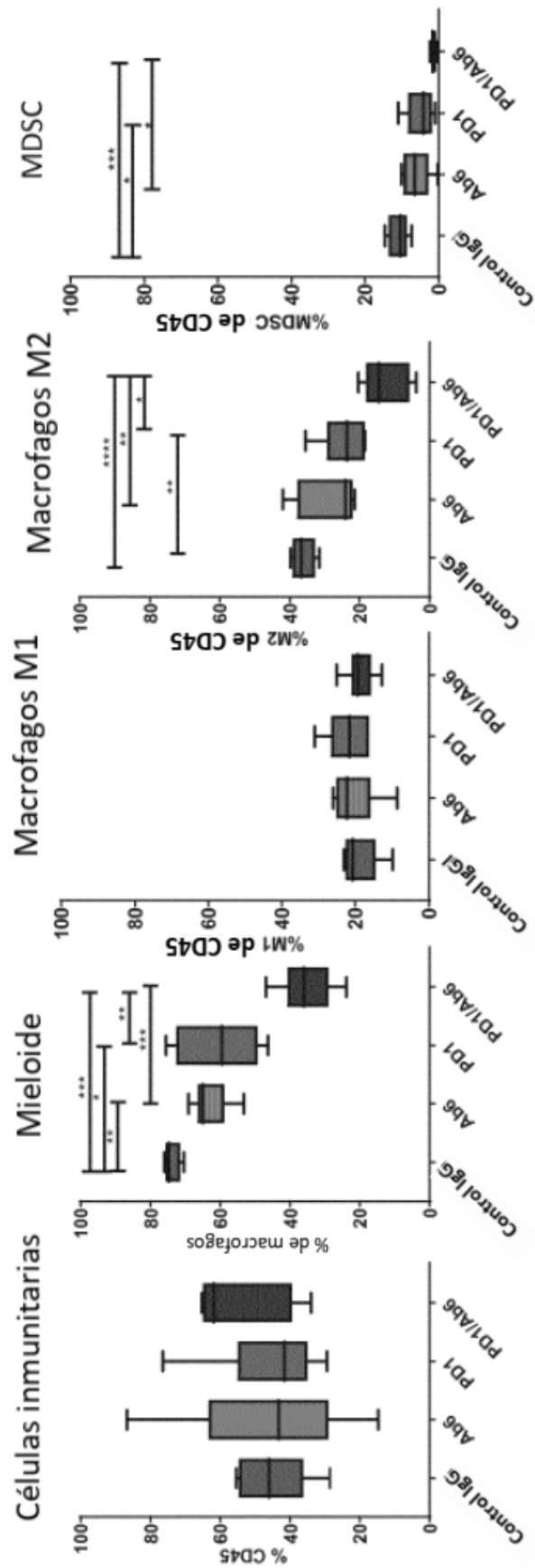


FIG. 34C
MBT-2 que infiltran M2 TAM expresan LRRC33 en la superficie

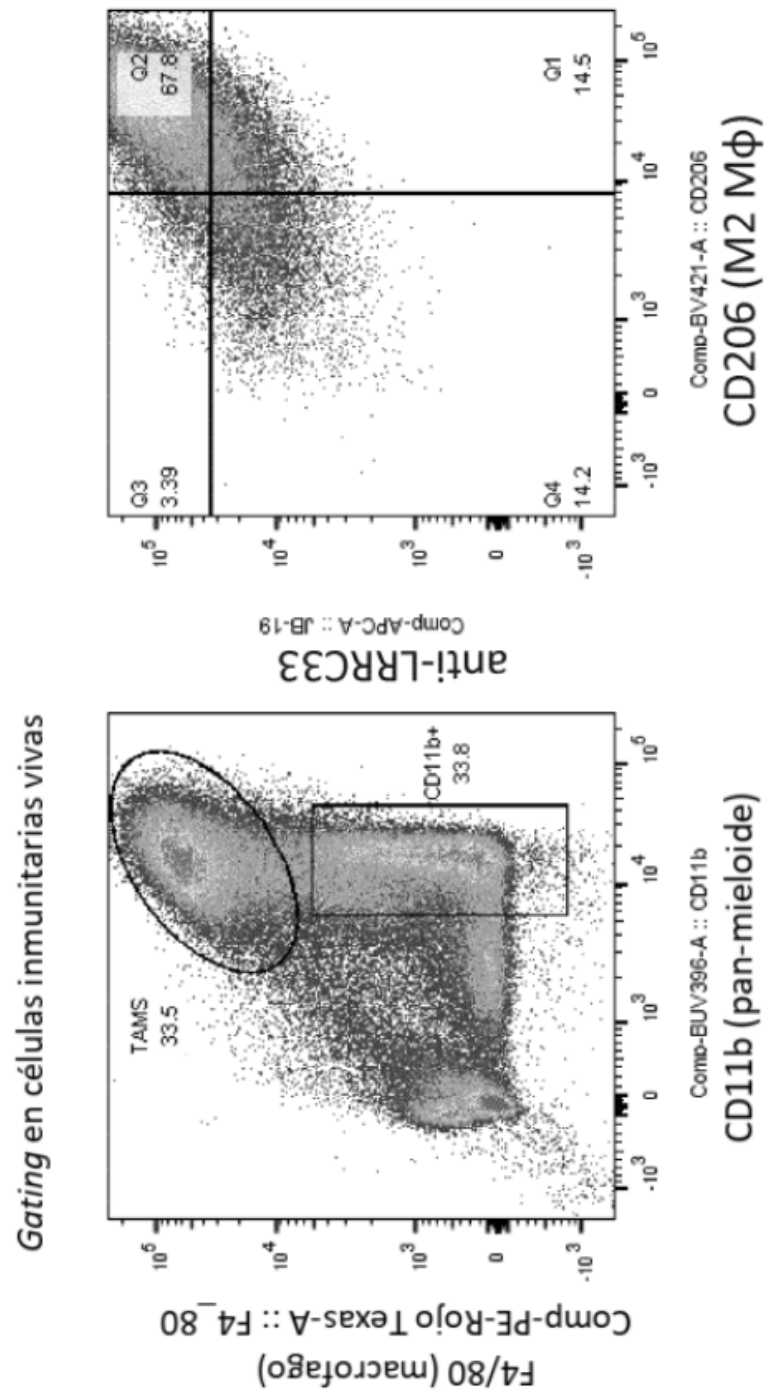
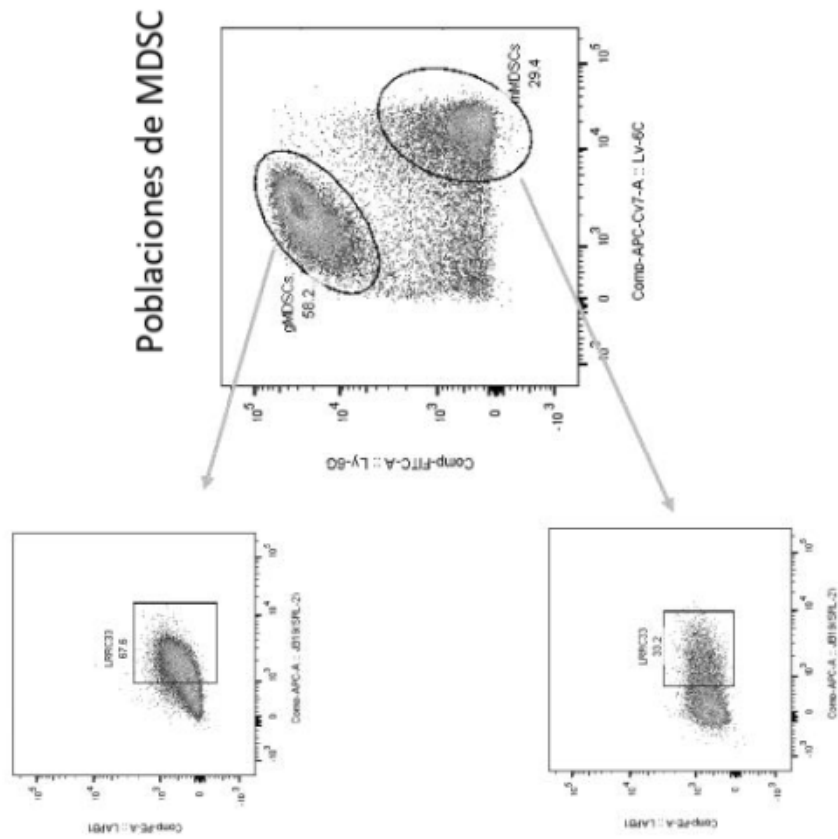


FIG. 34D

MBT-2 que infiltran MDSC expresan LRRC33 en la superficie



Efecto de Ab6 y anti-PD1 en frecuencias de células T y células M2 relativas a células vivas totales en tumores MBT2

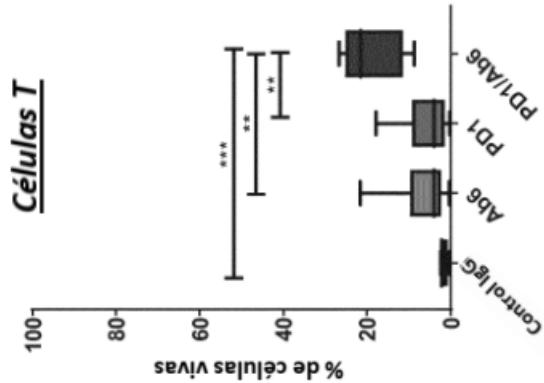


FIG. 35A

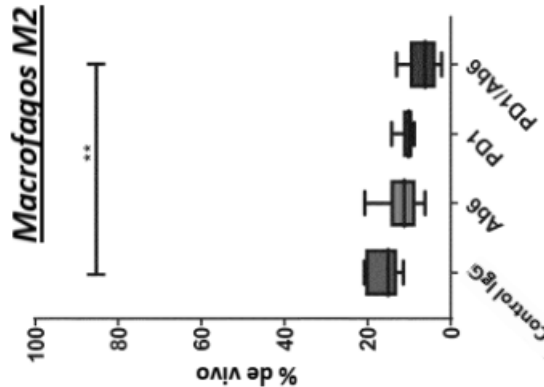


FIG. 35B

Efectos de Ab6 y anti-PD1 en relaciones CD8+/M2 en tumores MBT2

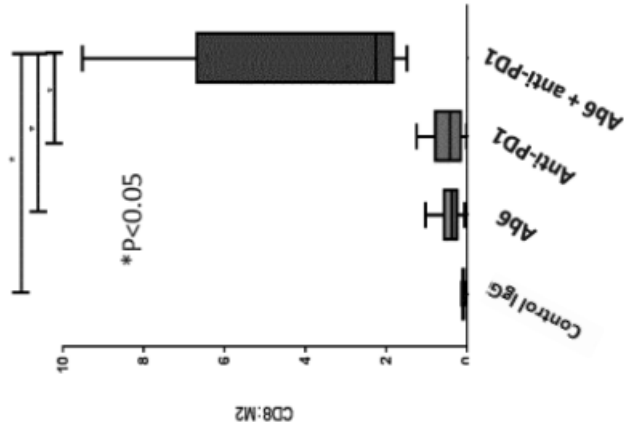
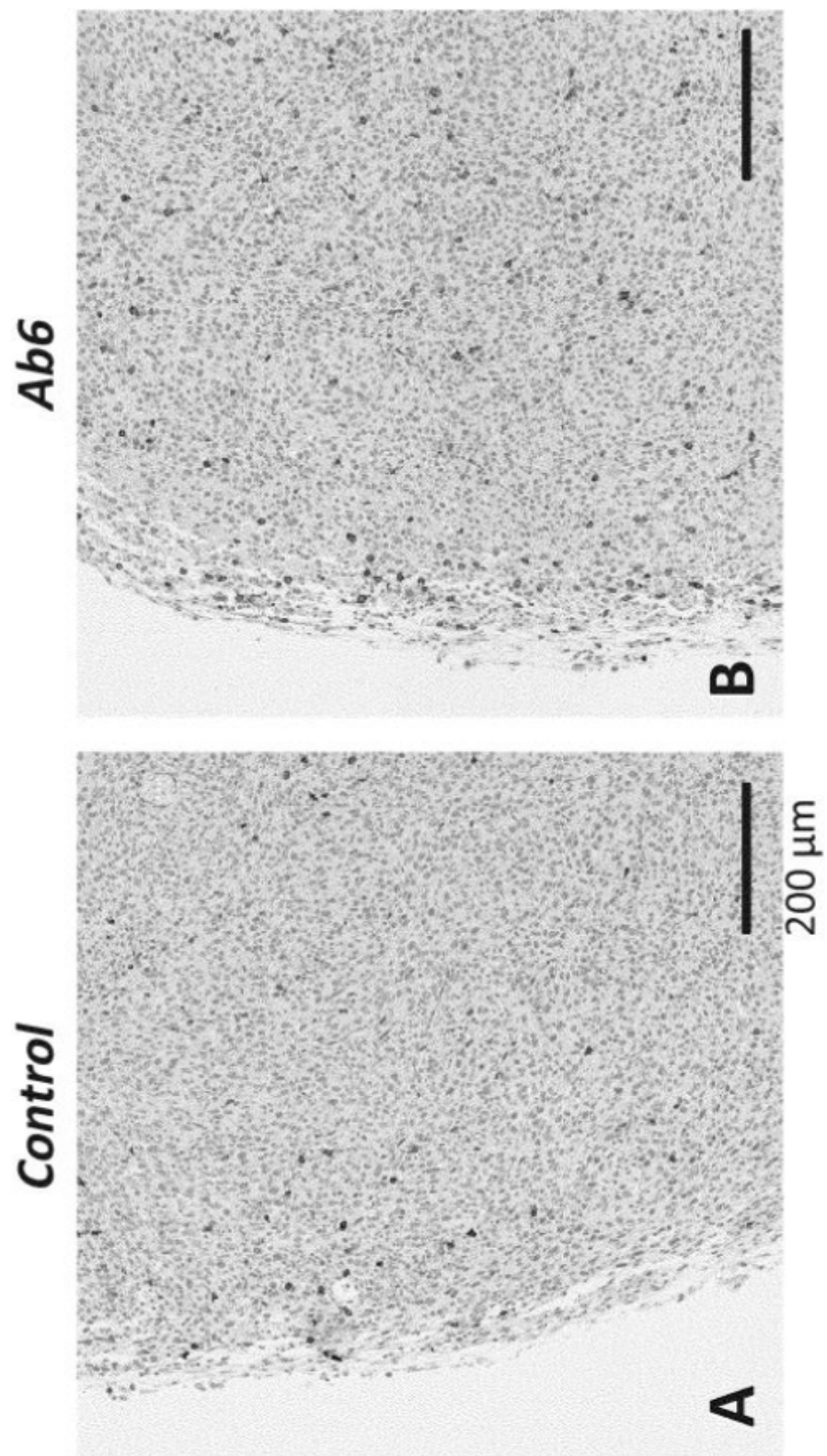


FIG. 35C

Análisis de citometría de flujo de tumores de MBT-2 en el día 10 después del tratamiento en inicio

FIGs. 36A & 36B

Efectos de Ab6 y anti-PD1 en células T CD8⁺ en tumores MBT2



FIGs. 36C & 36D

Efectos de Ab6 y anti-PD1 en células T CD8⁺ en tumores MBT2

*Anti-PD-1 +
Ab6 (10 mkg)*

Anti-PD-1

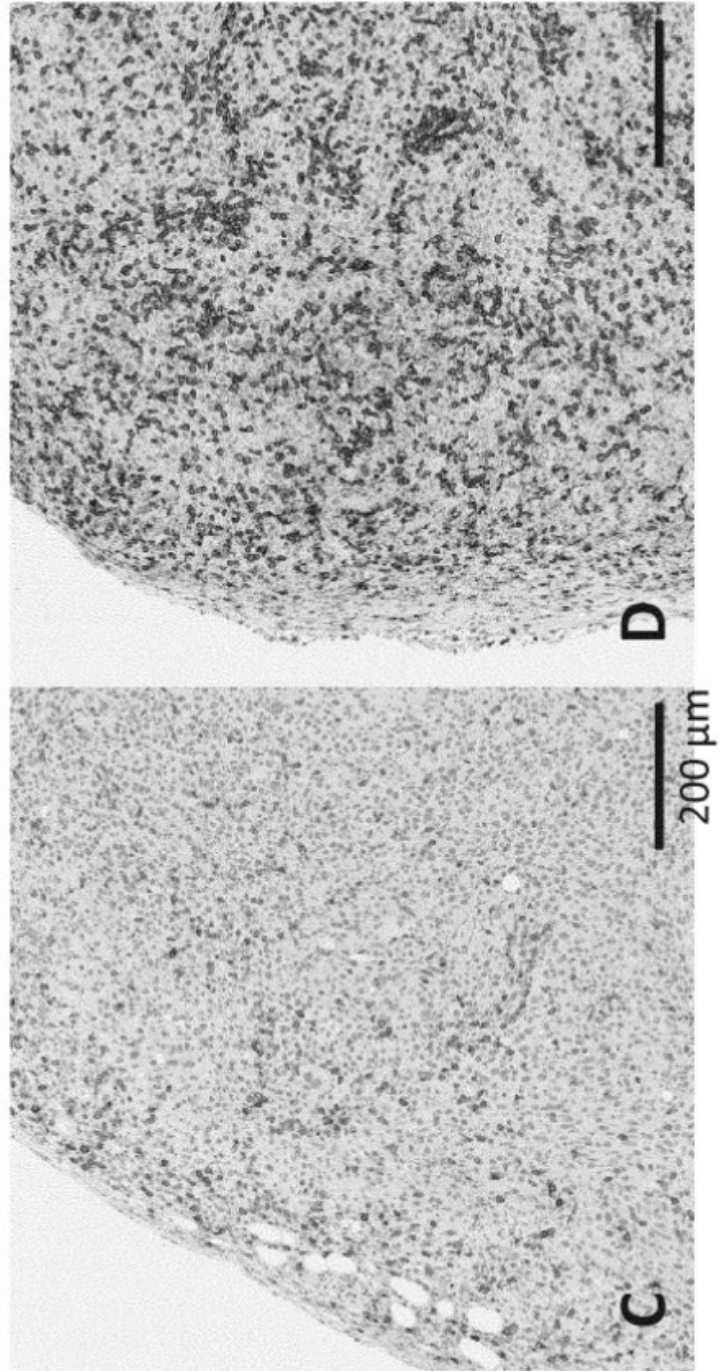


FIG. 36E
Efectos de Ab6 y anti-PD1 en células T CD8⁺ en tumores MBT2

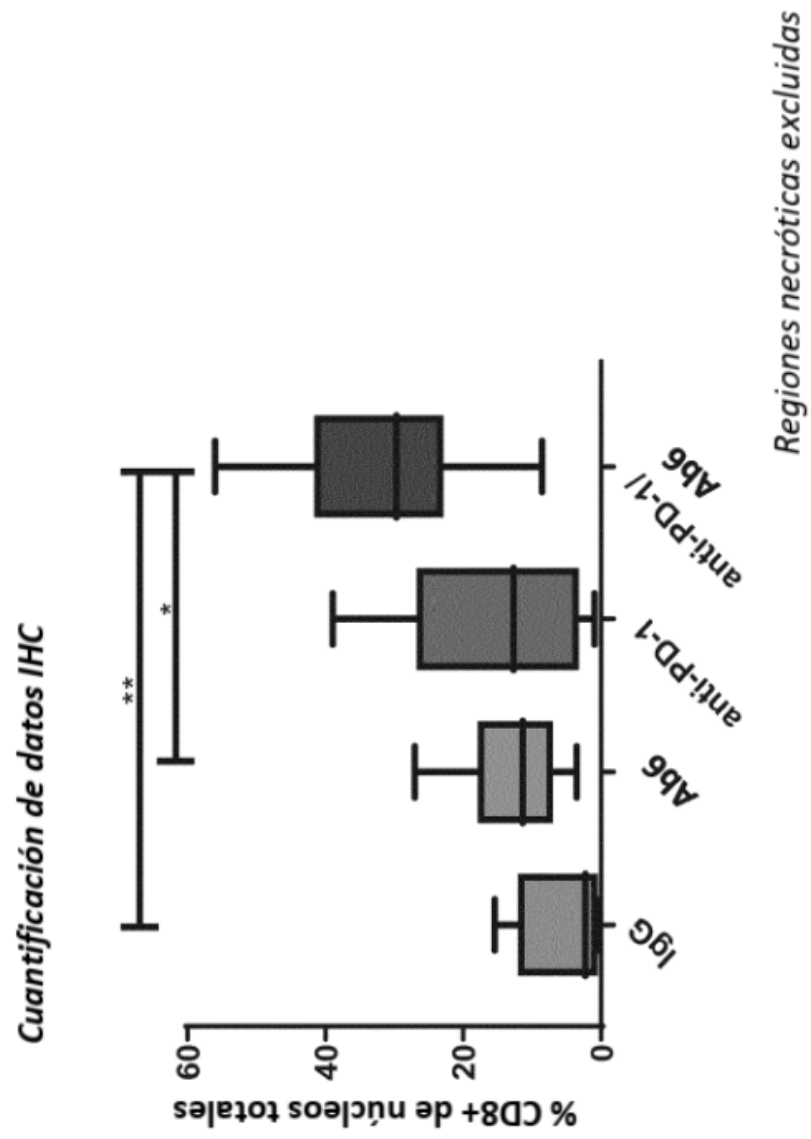


FIG. 36F

Análisis inmunohistoquímico: Efectos de Ab6 y anti-PD1
en tumores de MBT2

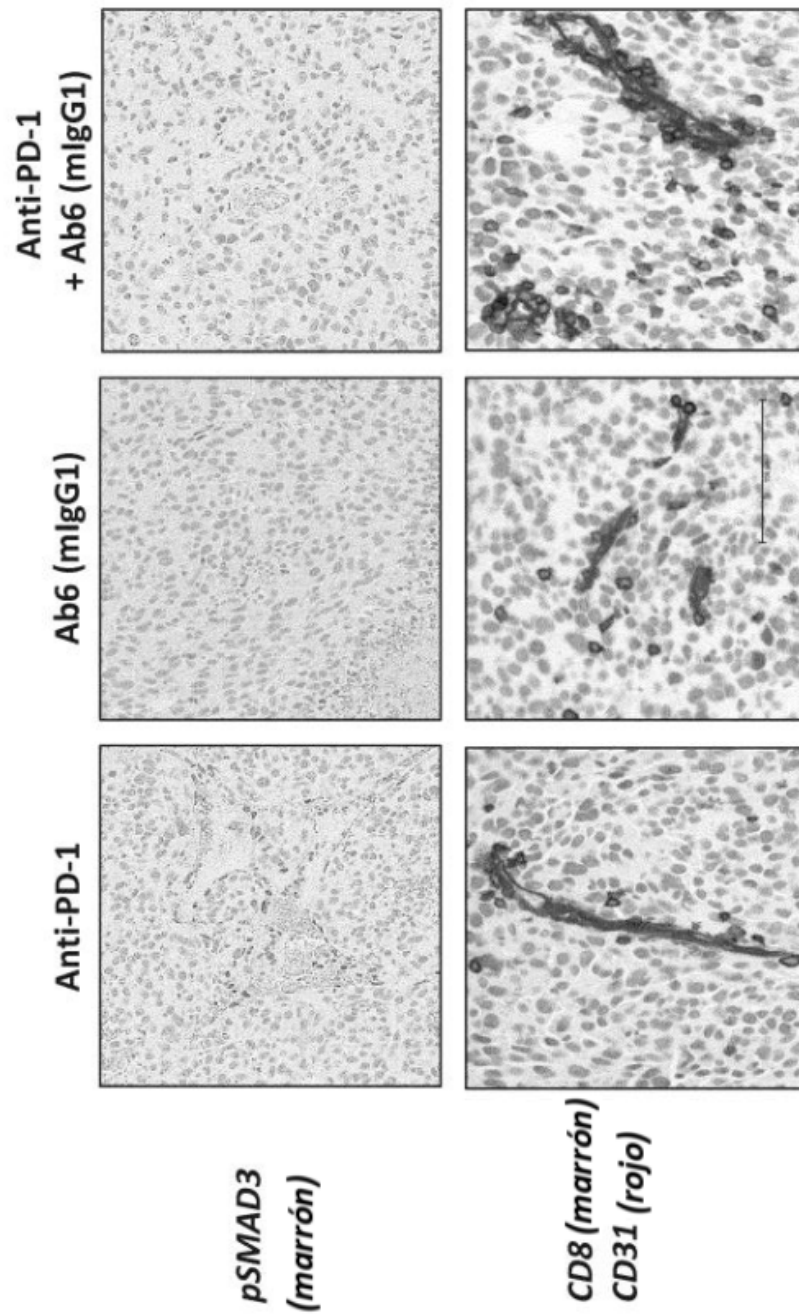
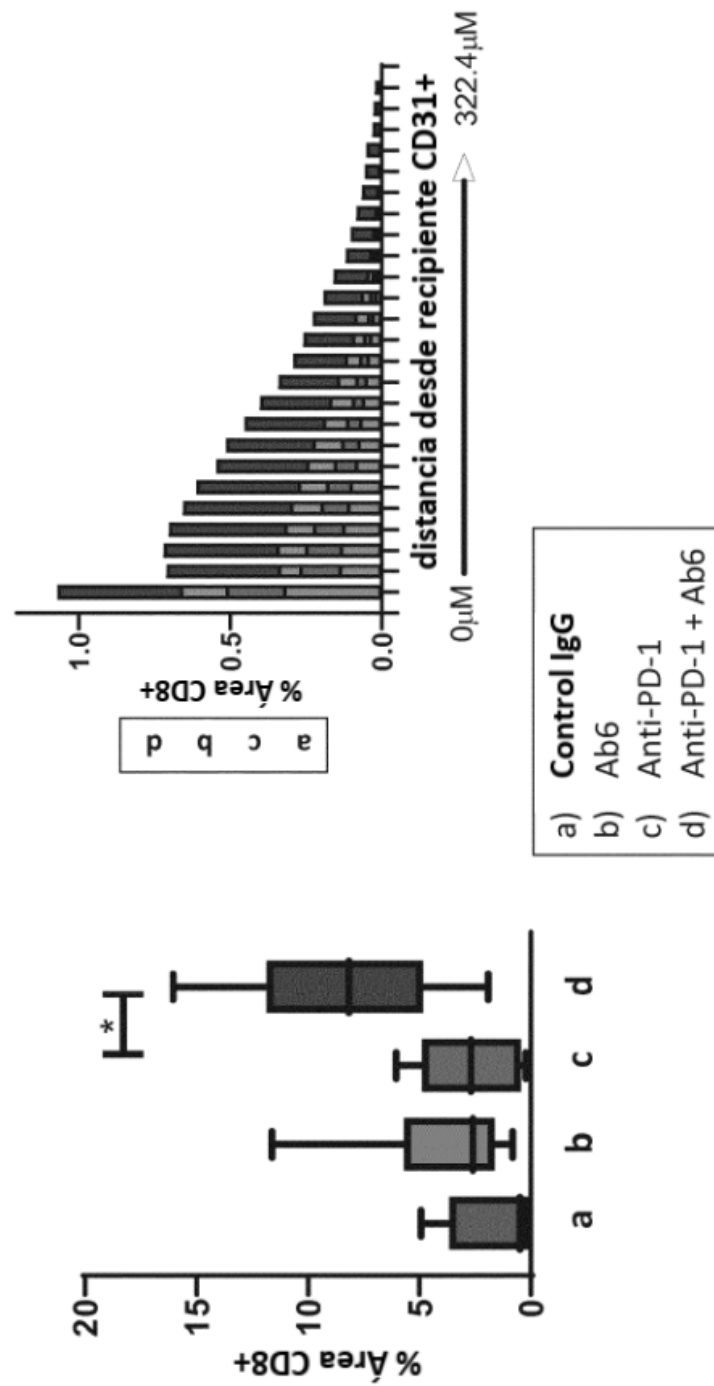
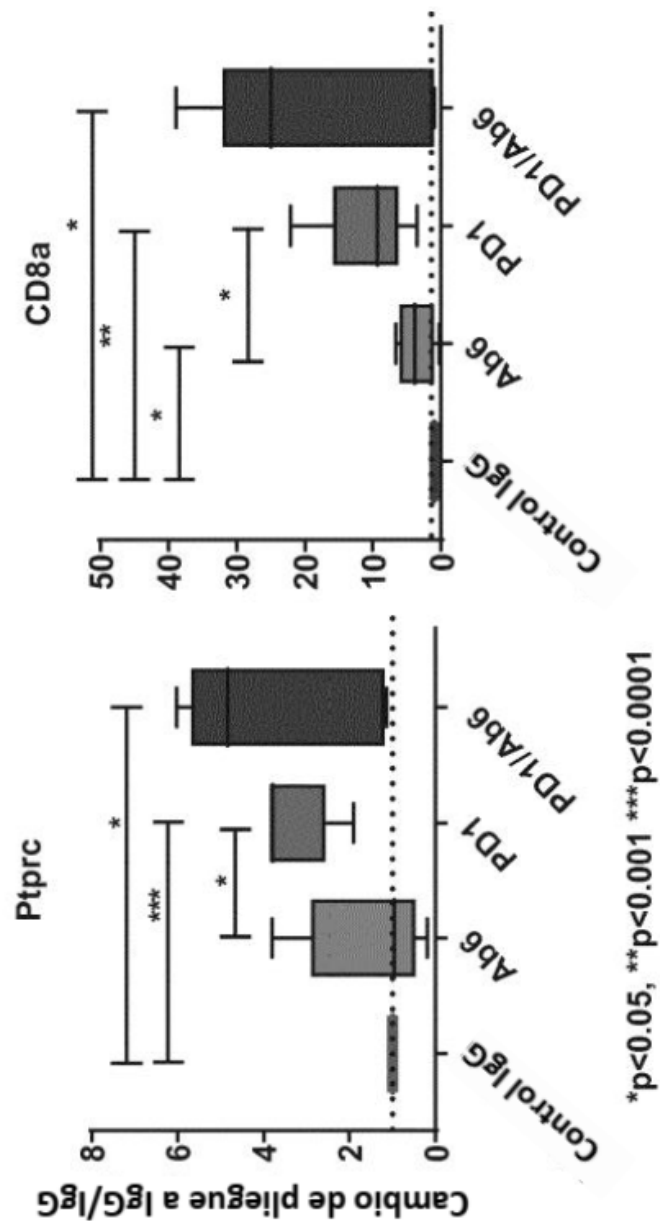


FIG. 36G
Efectos de Ab6 y anti-PD-1 en distribución intratumoral de
células CD8+ en tumores MBT2



FIGs. 37A & 37B

Marcadores de expresión de gen de respuesta inmunitaria en tumores MBT2



FIGs. 37C & 37D

Marcadores de expresión de gen de respuesta inmunitaria en tumores MBT2

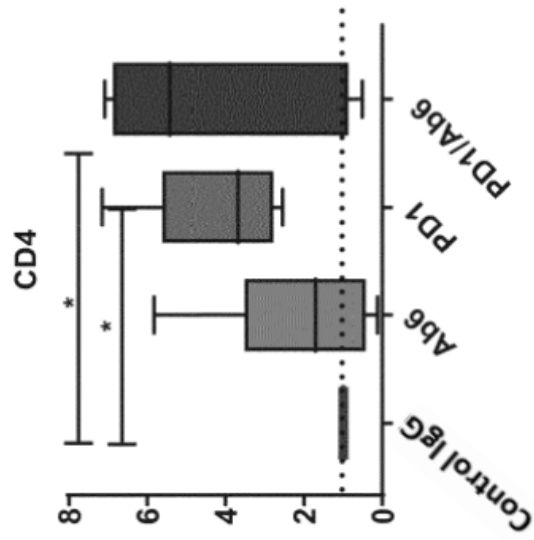


FIG. 37C

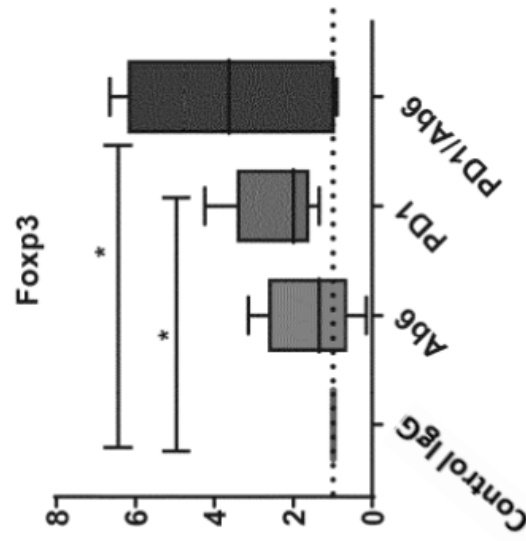


FIG. 37D

FIGs. 38A, 38B & 38C
Marcadores de expresión de gen de función efectora en tumores MBT2

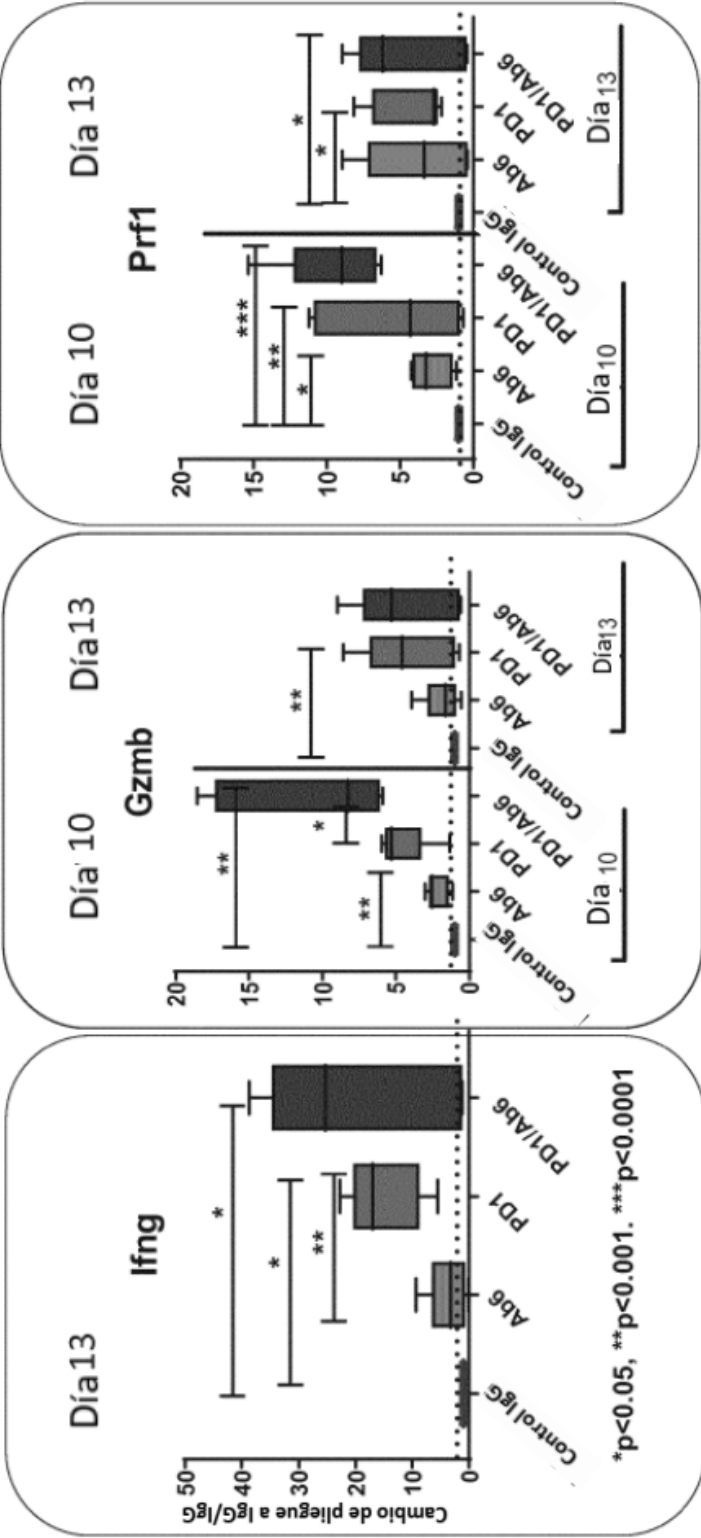


FIG. 39A

FIG. 39B

FIG. 39C

FIG. 38D
Análisis de qPCR de genes marcadores en tumores MBT2 en día 10

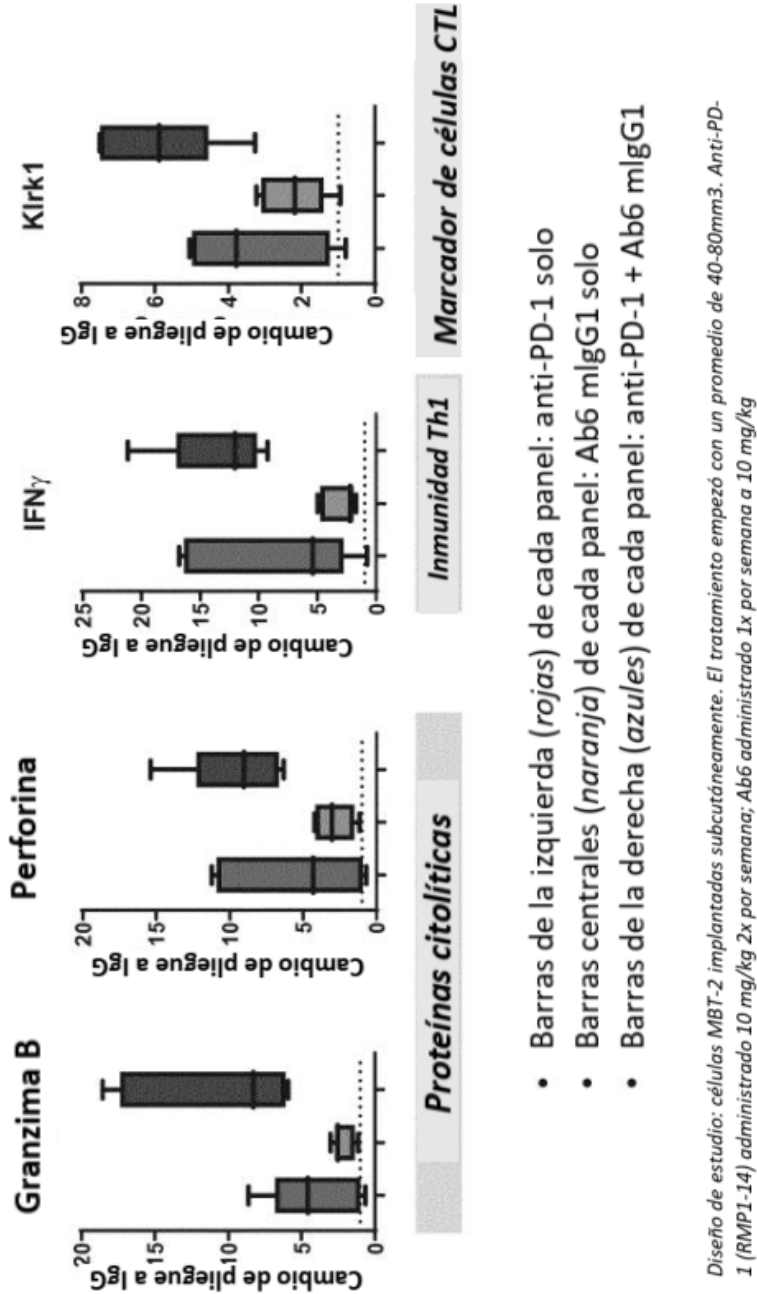


FIG. 39A

Ab6 se une a complejos grandes de TGFβ1 latentes con afinidades picomolares como se ha medido por MSD-SET

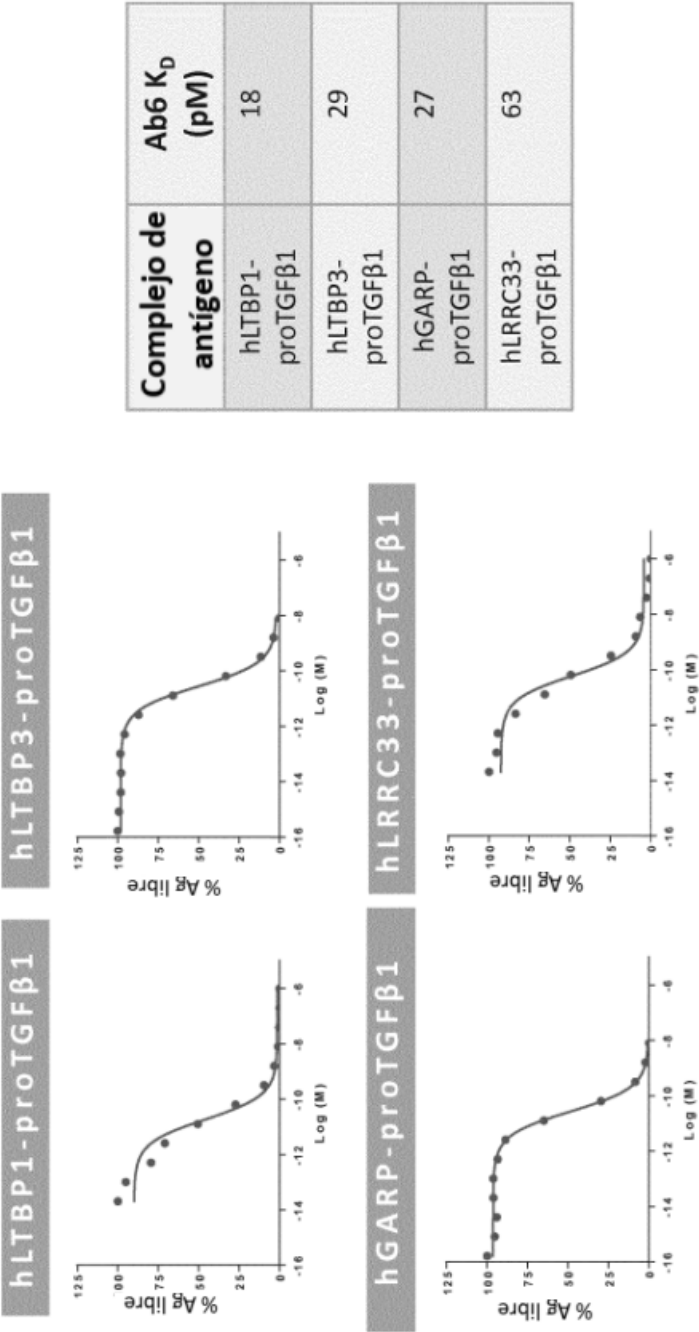
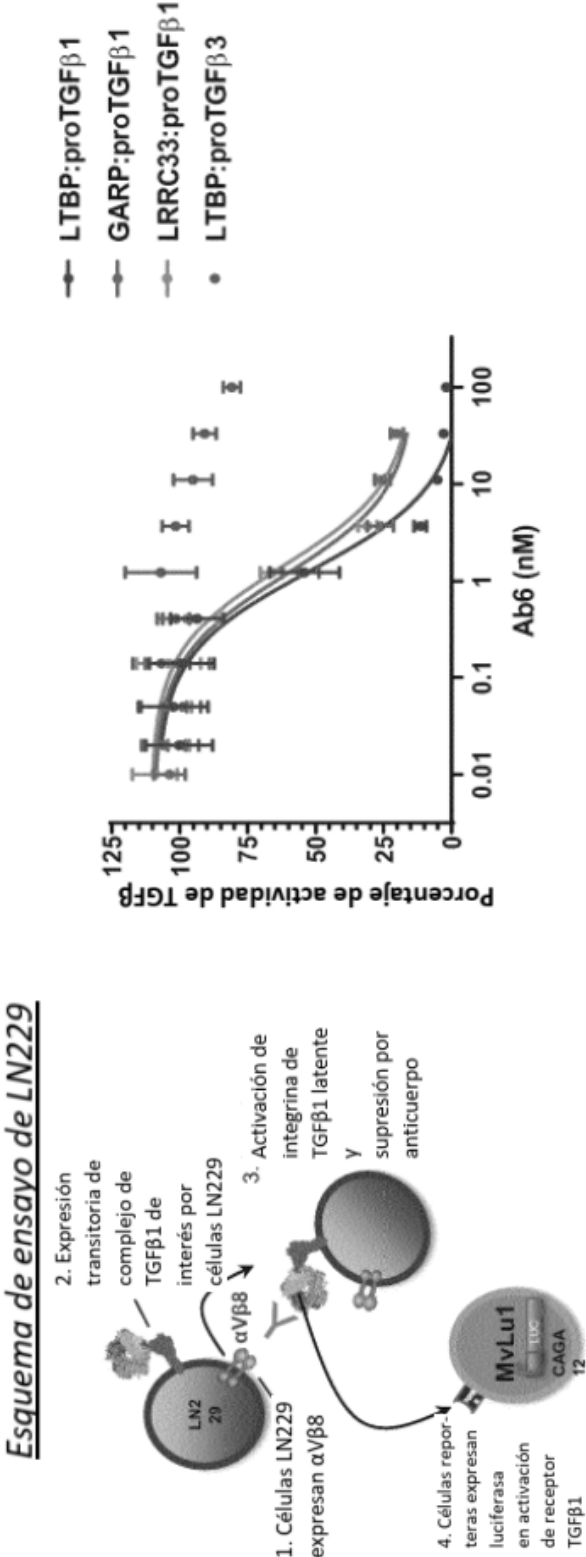
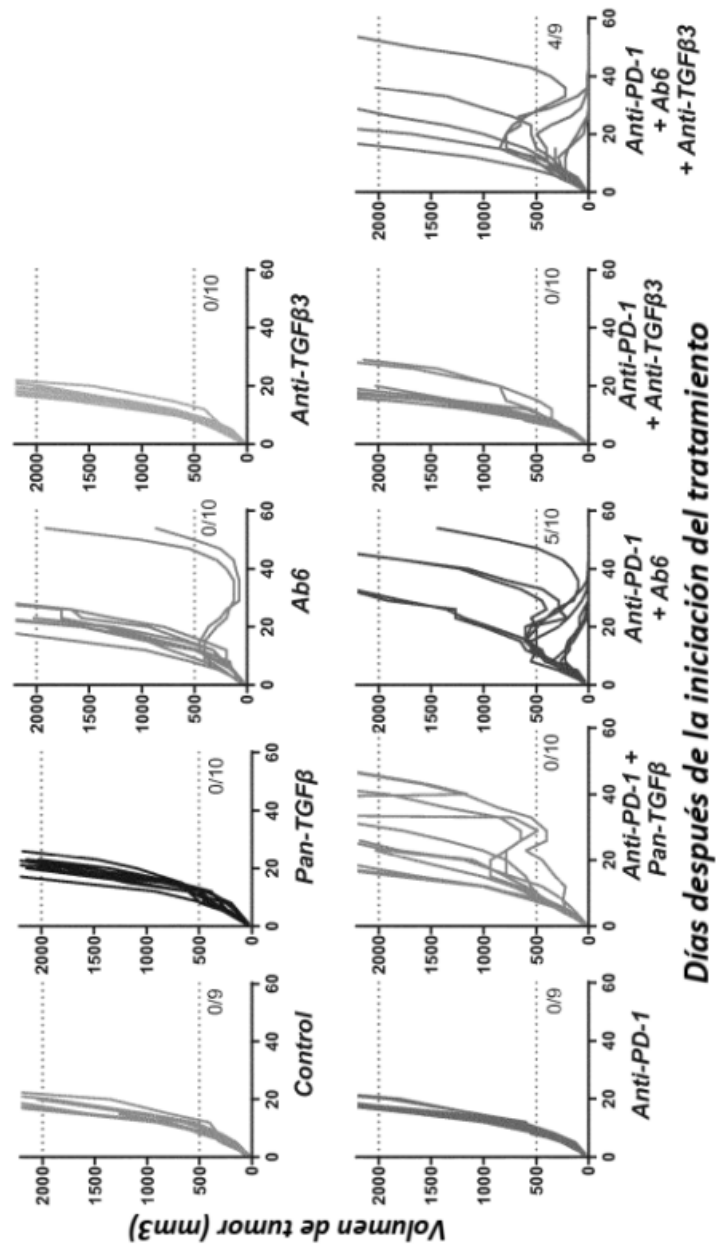


FIG. 39B
Potencia inhibidora de Ab6 en ensayo LN229



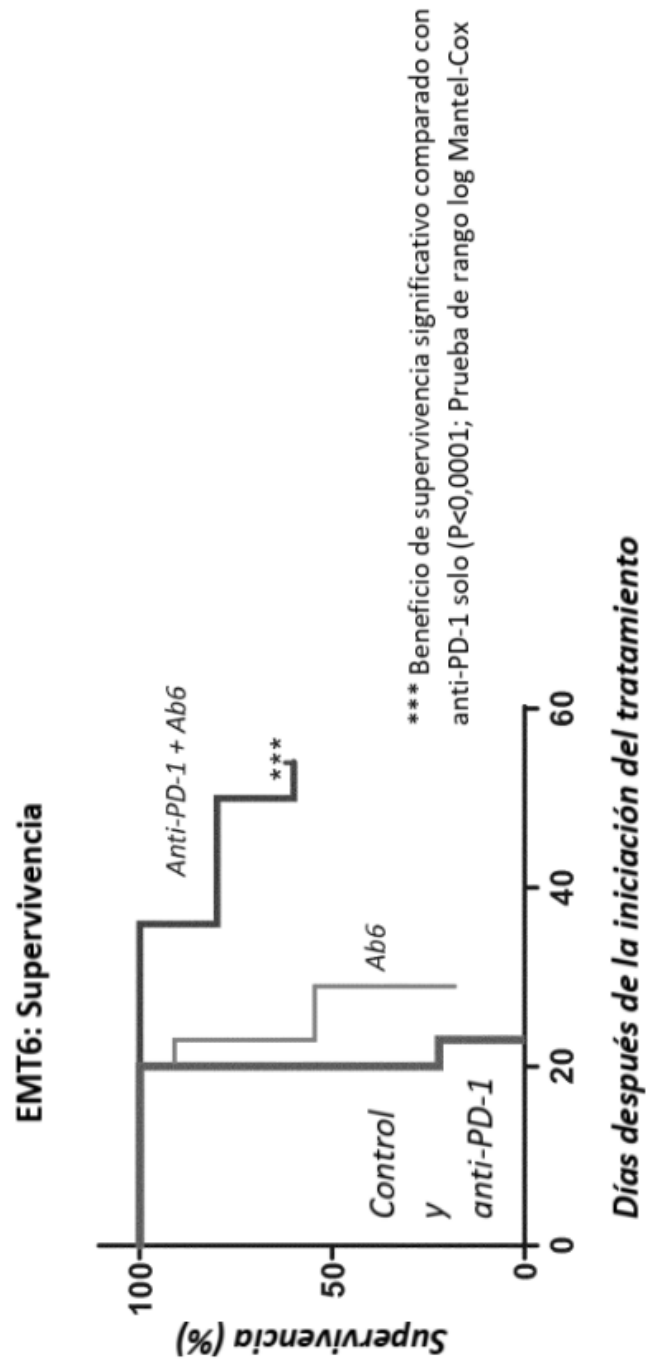
Ab6 inhibe la activación de todos los complejos grandes de TGF β 1 latentes pero no TGF β 3 latentes

FIG. 40A
Efectos de anti-PD-1/Ab6/anti-TGFβ3 en el modelo de cáncer de mama EMT6



Diseño de estudio: células EMT6 implantadas subcutáneamente. El tratamiento empezó con un promedio de 30-60mm³. Anti-PD-1 administrado 10 mg/kg 2x por semana; Pan-TGFβ ID11 administrado 5 mg/kg 2x por semana; anti-TGFβ3 administrado 30 mg/kg 1x por semana; Ab6 (mIgG1) administrado 10 mg/kg 1x por semana

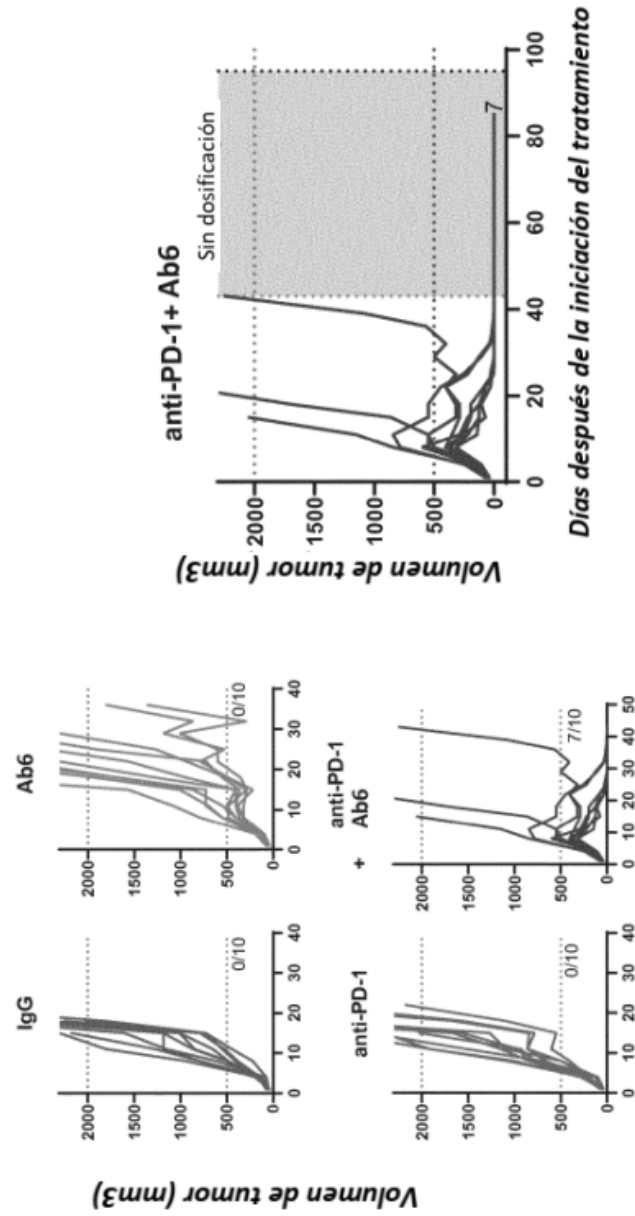
FIG. 40B
Efectos de anti-PD-1/Ab6 en el modelo de cáncer de mama EMT6
(Estudio 1)



Diseño de estudio: células EMT6 implantadas subcutáneamente. El tratamiento empezó con tumores con un promedio de 30-60mm³. Anti-PD-1 administrado 10 mg/kg 2x por semana; Ab6 (mIgG1) administrado 10 mg/kg 1x por semana.

FIG. 40C

Combinación anti-PD-1/Ab6 en el modelo de cáncer de mama EMT6 induce control de tumor duradero (Estudio 2)

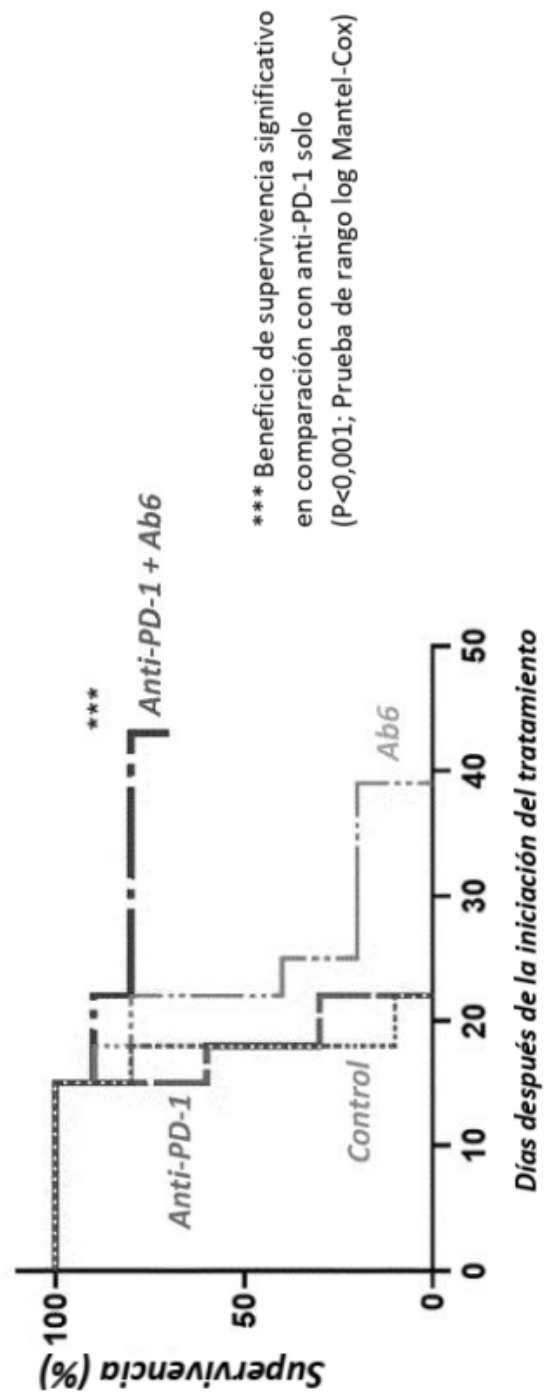


Días después de la iniciación del tratamiento

Diseño de estudio: células EMT6 implantadas subcutáneamente. El tratamiento empezó con tumores con un promedio de 30-60mm³. Anti-PD-1 administrado 10 mg/kg 2x por semana; Ab6 (mIgG1) administrado 10 mg/kg 1x por semana.

FIG. 40D

Efectos de anti-PD-1/Ab6 en el modelo de cáncer de mama EMT6
(Estudio 2)



Diseño de estudio: células EMT6 implantadas subcutáneamente. El tratamiento empezó con tumores con un promedio de 30-60mm³. Anti-PD-1 administrado 10 mg/kg 2x por semana; Ab6 (mIgG1) administrado 10 mg/kg 1x por semana.

FIG. 41
Expresión de isoformas TGFβ en tumores EMT6

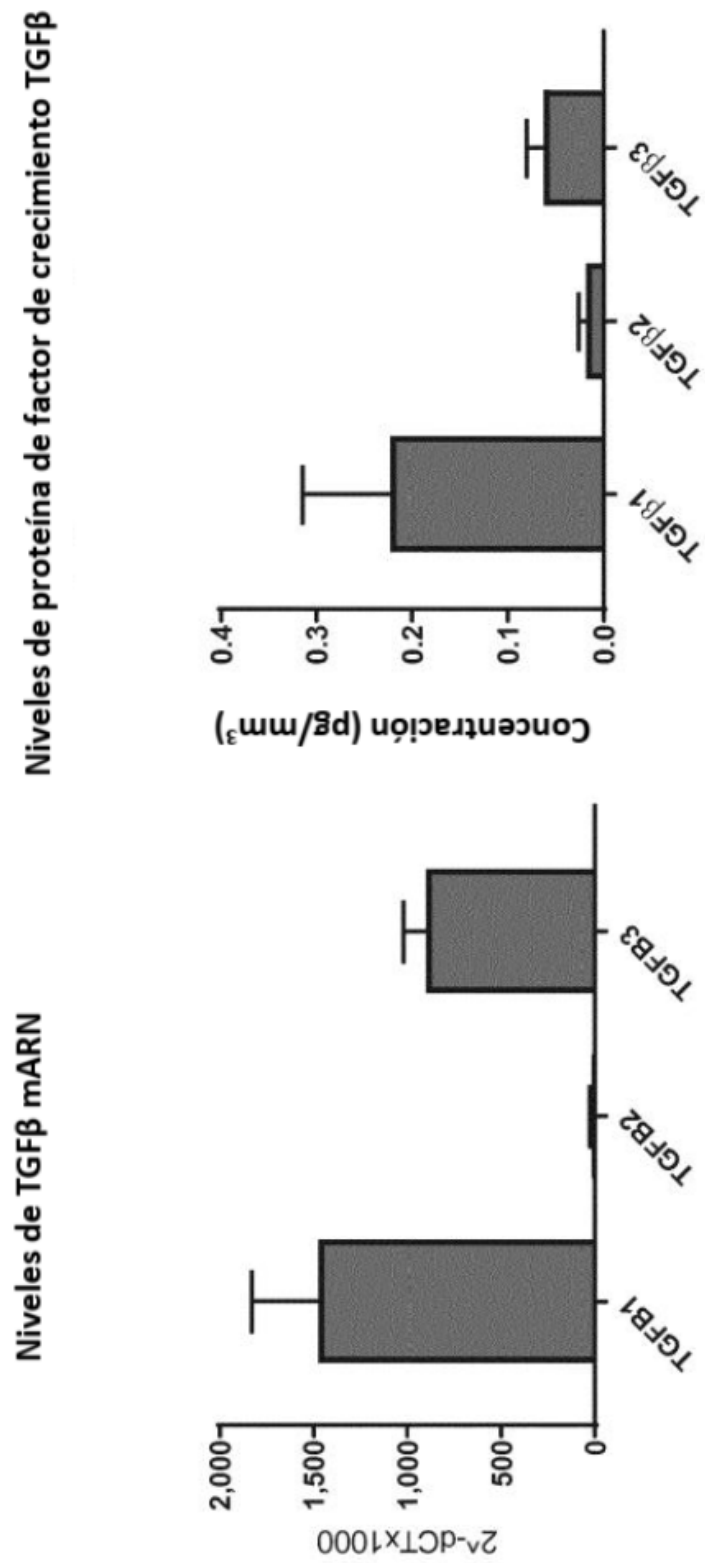


FIG. 42A

Efecto antifibrótico de Ab6 en el modelo MPL^{W515L} de mielofibrosis

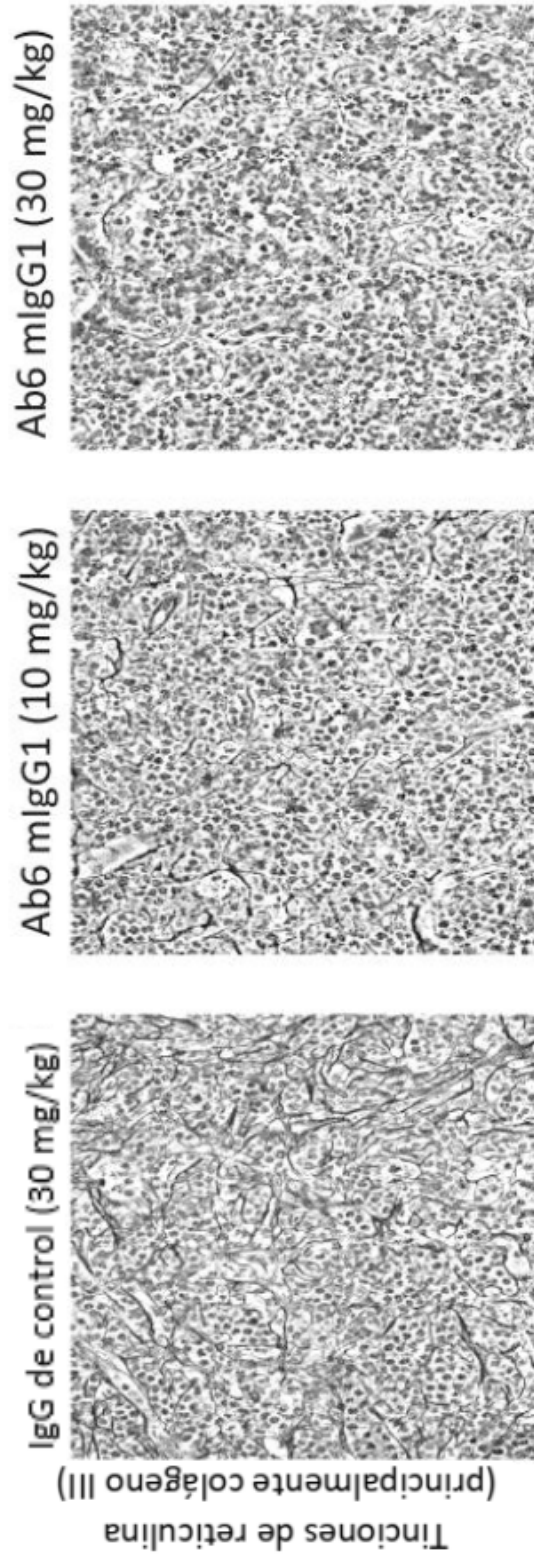


FIG. 42B

Efecto antifibrótico de Ab6 en el modelo MPL^{W515L} de mielofibrosis por puntuación de histopatología de médula ósea

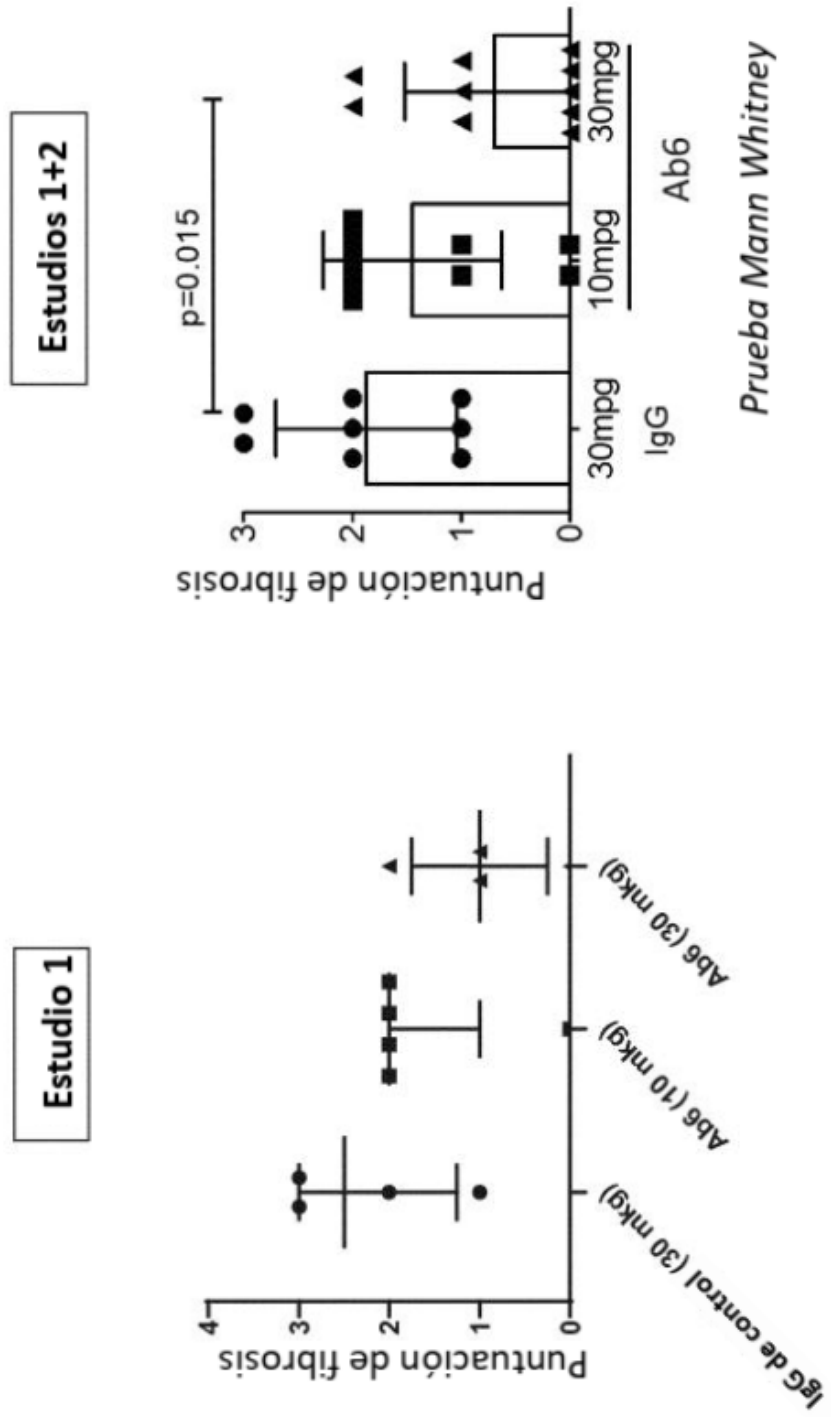


FIG. 42C
Efectos de Ab6 en parámetros hematológicos en el modelo
MPL^{W515L} de mielofibrosis

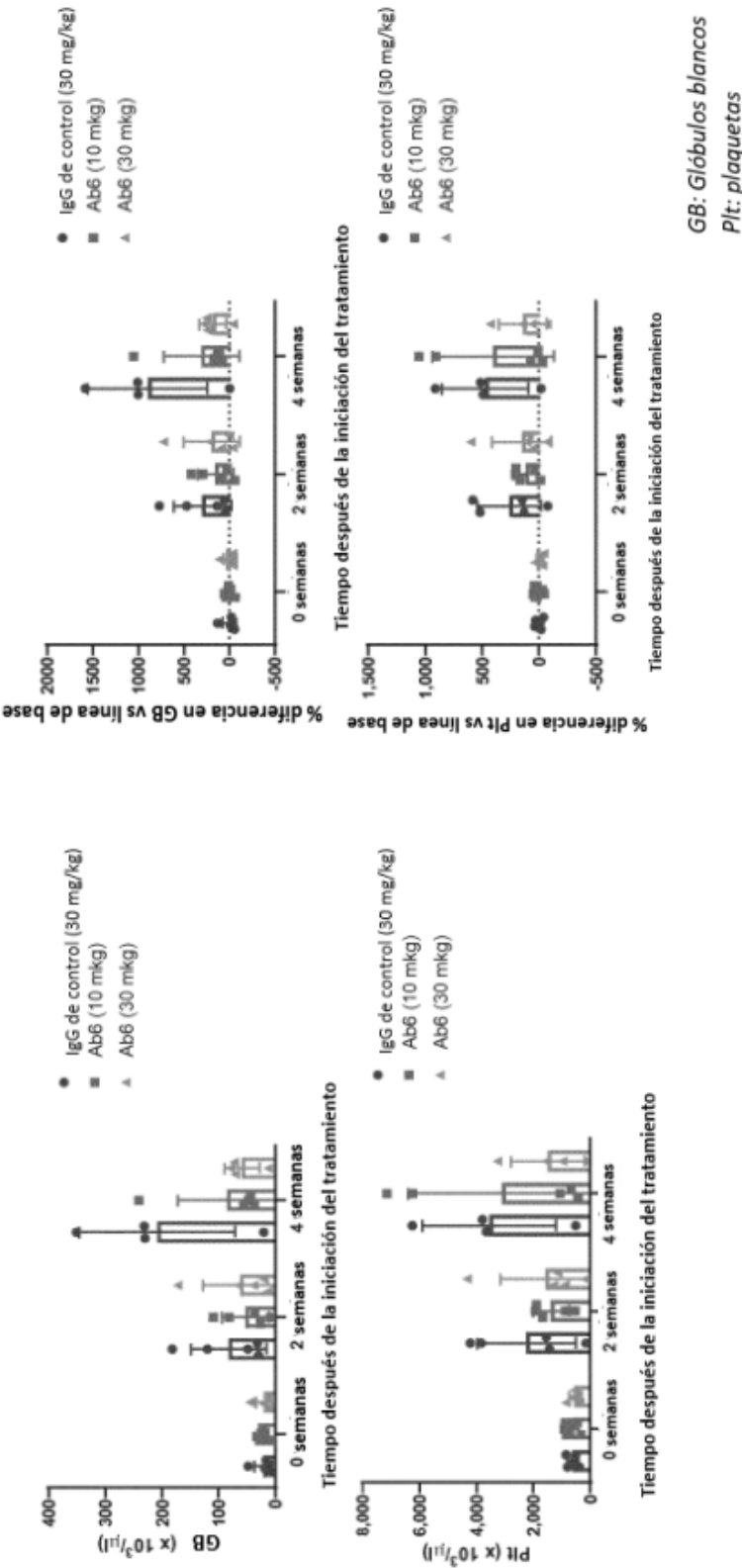


FIG. 42D
Efectos de Ab6 en parámetros hematológicos en el modelo
MPL^{W515L} de mielofibrosis

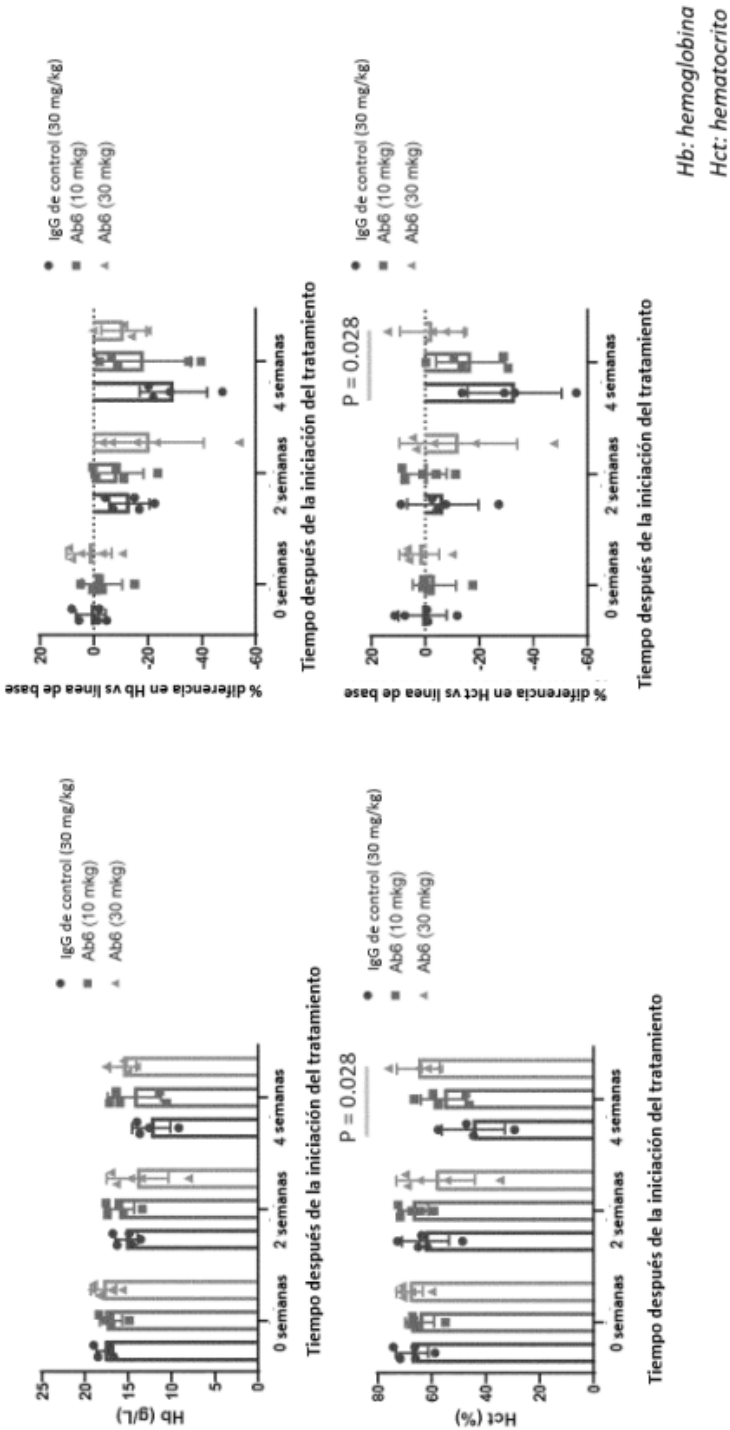


FIG. 43A

Correlación entre la expresión de isoformas TGFβ y conjunto génico IPRES (GSVA)

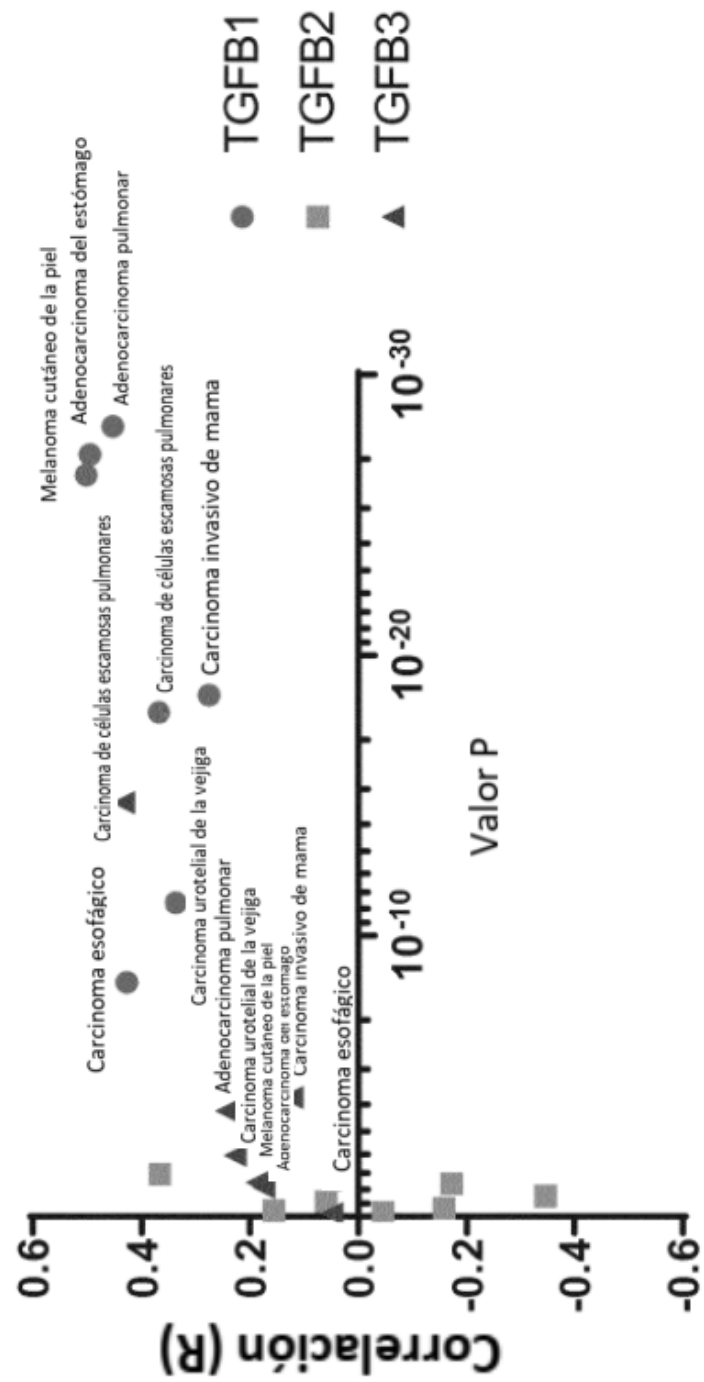


FIG. 43B

Correlación entre la expresión de isoformas $TGF\beta$ y conjunto génico Plasari (GSVA)

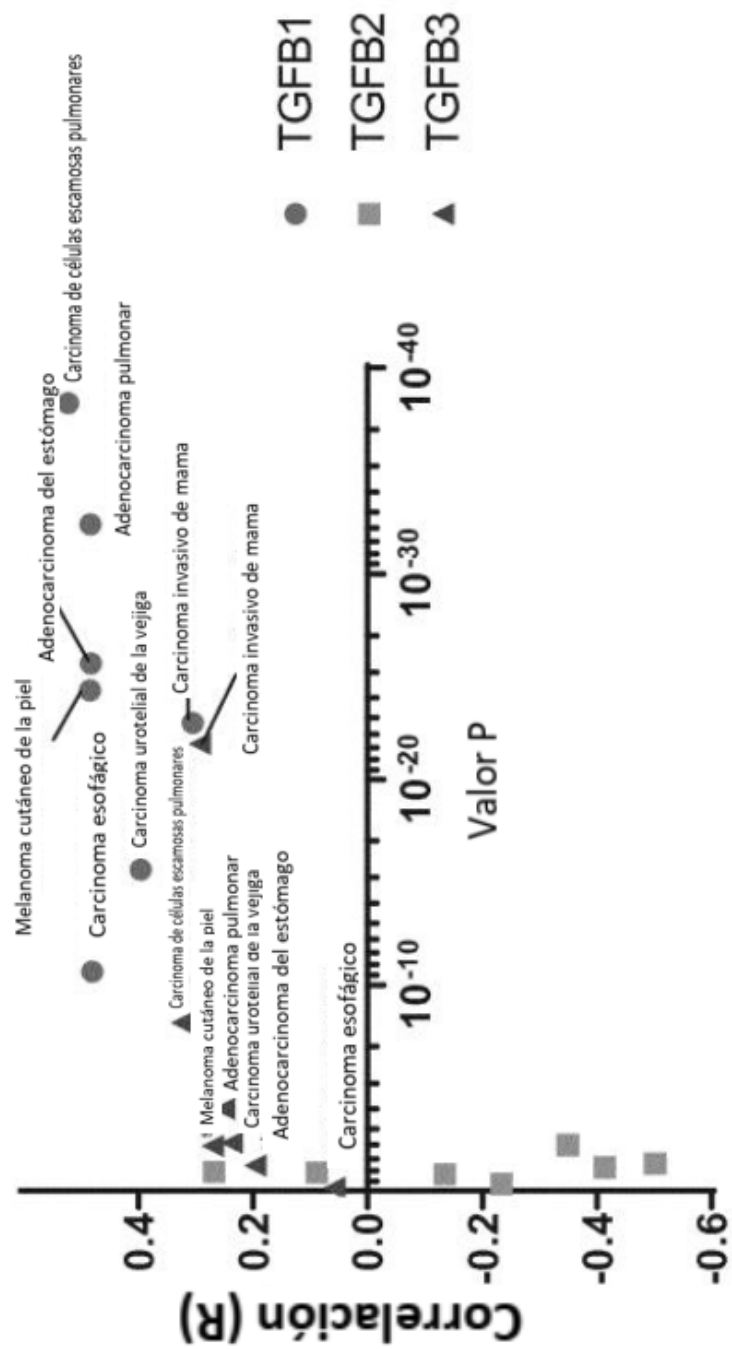
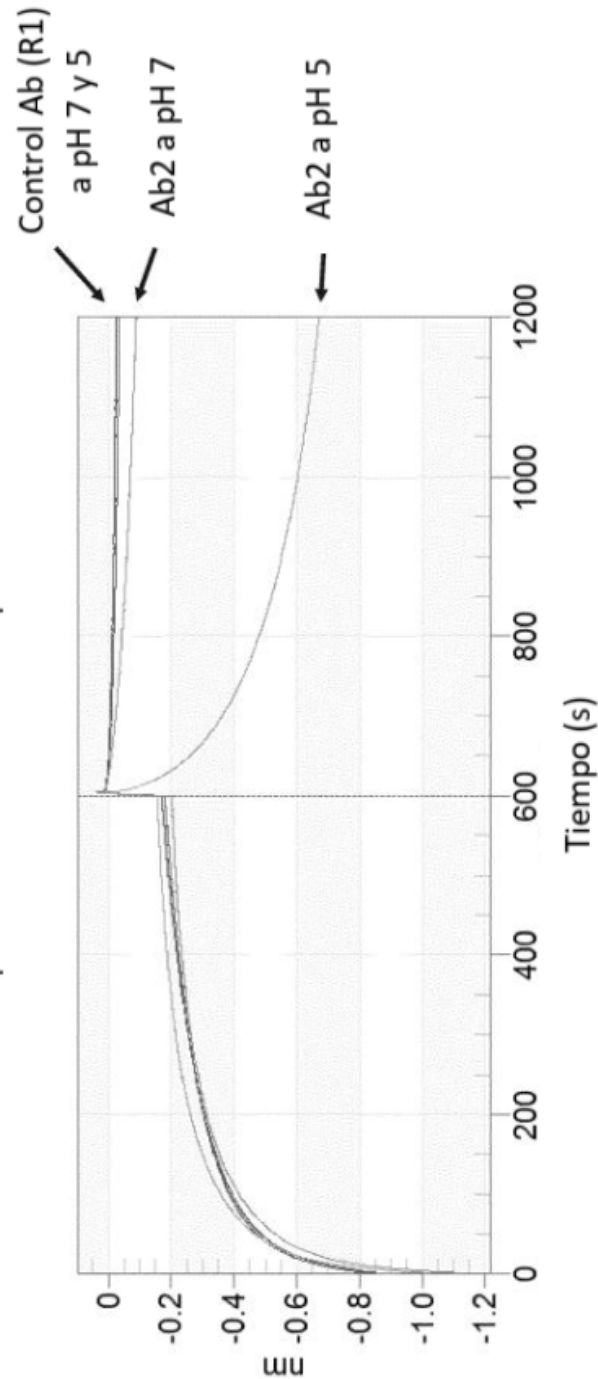


FIG. 44

El efecto de pH en la unión de Ab2 a proTGFb1 C4S



	<u>Ab2</u>	<u>Control Ab</u>
$\frac{K_{dis\ pH\ 5}}{K_{dis\ pH\ 7}}$	$\frac{5.61e-3}{2.78e-3} = 2.02$	$\frac{3.69e-3}{4.38e-3} = 0.84$