

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 194**

51 Int. Cl.:
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06840328 .6**
96 Fecha de presentación: **20.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1966243**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Anticuerpos de unión a TGF-beta**

30 Prioridad:
23.12.2005 US 753956 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.04.2012

73 Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS IN 46285, US**

72 Inventor/es:
**JONES, Bryan Edward;
PANCOOK, James D. y
ROWLINSON, Scott William**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 379 194 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de unión a TGF-beta

Campo de la invención

5 La invención se refiere al tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones proliferativos celulares asociados con TGF- β . En particular, la invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno del mismo que neutralizan TGF- β 1, β 2, y β 3 humana, madura.

Antecedentes de la invención

10 La familia de la proteína TGF- β consiste en tres isoformas distintas (TGF- β 1, β 2, y β 3) cuyas vías activan y regulan múltiples respuestas del gen que influyen en estados de enfermedad tales como, por ejemplo, afecciones proliferativas celulares, inflamatorias y cardiovasculares. La expresión de la isoforma TGF- β en el cáncer es compleja y variable con diferentes combinaciones de isoformas TGF- β que tienen diferentes funciones en cánceres particulares. Por ejemplo, TGF- β 1 y TGF- β 3 cumplen un papel mayor en el cáncer ovárico y su progresión que el TGF- β 2; mientras que la expresión de TGF- β 1 y TGF- β 2 es mayor en tumores de condrosarcoma de grado superior que la de β 3. En el cáncer de mamas humano, TGF- β 1 y TGF- β 3 están altamente expresadas, con la expresión de β 3 que se correlaciona con la supervivencia global de los pacientes con metástasis de ganglios y la expresión positiva de TGF- β 3 tiene malos resultados pronósticos. Sin embargo en el cáncer de colon, TGF- β 1 y TGF- β 2 están más altamente expresadas que β 3 y están presentes en niveles circulantes mayores que en los individuos libres de cáncer. En el cáncer de glioma, TGF- β 2 es fundamental para migración celular. En consecuencia, existe la necesidad de modular la expresión de múltiples isoformas de TGF- β en las afecciones de proliferación tales como el cáncer.

15 El documento US 5,571.714 desvela el uso de anticuerpos anti-TGF para tratar neoplasias y cáncer metastático, en particular, desvela un anticuerpo murino denominado 1D11.16 (ATCC No. HB9849) que se dice que une tanto TGF- β 1 como TGF- β 2. Este documento afirma que el anticuerpo 1D11.16 une TGF- β 2 con una K_d de solo $3,4 \times 10^8$ L/mol ($K_d = 1/K_a$).

25 El documento WO 2005/097832 desvela anticuerpos anti-TGF-beta humanizados para el tratamiento del cáncer.

El tratamiento de los trastornos proliferativos celulares, tales como neoplasias y cánceres, se pueden mejorar con el uso de anticuerpos que neutralizan TGF- β 1, β 2, y β 3 madura humana con cinética y afinidad de unión mejores. La estabilidad física y química sustancial, farmacocinética adecuada, y buena solubilidad también son convenientes para un producto farmacéutico. En consecuencia, continúa insatisfecha la necesidad de anticuerpos que tengan características adecuadas para el tratamiento farmacéutico de los trastornos proliferativos celulares.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona composiciones de anticuerpo monoclonal que neutralizan las TGF- β 1, β 2, y β 3 maduras humanas con una K_d menor que 4 pM para la TGF- β 1 humana, madura, y una K_d menor que 8 pM para la TGF- β 2 humana, madura, y una K_d menor que 4 pM para la TGF- β 3 humana, madura. La invención también proporciona anticuerpos que tienen las siguientes combinaciones de secuencias de la región variable de la cadena liviana (LCVR) y de la cadena pesada (HCVR): SEQ ID NO: 27 y 51, 27 y 59, 27 y 60, 27 y 61, 27 y 62, 27 y 63, 27 y 64, 28 y 52, 29 y 51, 30 y 53, 31 y 54, 32 y 55, 33 y 56, 34 y 51, 34 y 57, 35 y 58, 36 y 51, 36 y 69, 36 y 75, 37 y 51, 38 y 51, 39 y 51, 40 y 51, 41 y 64, 41 y 67, 42 y 66, 43 y 68, 44 y 66, 45 y 51, 45 y 69, 46 y 70, 46 y 71, 47 y 71, 48 y 72, 49 y 73, 50 y 65, o 50 y 74. La invención también incluye fragmento de unión al antígeno de tales anticuerpos, así como anticuerpos y fragmentos que tienen regiones estructurales y contantes humanas o humanizadas. Los anticuerpos y fragmentos de la invención son útiles para tratar enfermedades, trastornos y afecciones proliferativos celulares.

40 De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β o fragmento de unión al antígeno del mismo, que neutraliza las TGF- β 1, β 2, y β 3 maduras humanas, que comprenden una región variable de la cadena pesada (HCVR) y una región variable de la cadena liviana (LCVR), en la que dicha HCVR y dicha LCVR consiste en:

- a) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 64 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:41; o
- 50 b) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 68 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 43; o
- c) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45; o
- d) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ IDNO: 70 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 46; o

e) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 74 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 50.

5 Preferentemente, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, comprende una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45.

Un anticuerpo monoclonal preferido de la presente invención comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 81 y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 80.

10 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, proporciona a anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención para usar como un medicamento.

15 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se usa en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular en un sujeto que lo necesita. Más preferentemente, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se usa en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular seleccionado de síndrome mielodisplásico (MDS)/trastorno mieloproliferativo (MPD), cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, mieloma múltiple, cáncer colorrectal, leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, y leucemia mielógena aguda.

20 Los anticuerpos de la presente invención neutralizan TGF- β 1 humana, madura, TGF- β 2 humana, madura, y TGF- β 3 humana, madura, y tienen una IC₅₀ menor que o igual a aproximadamente 100 pM para TGF- β 1 humana, madura, y una IC₅₀ menor que o igual a aproximadamente 400 pM para la TGF- β 2 humana, madura, y una IC₅₀ menor que o igual a aproximadamente 200 pM para TGF- β 3 humana, madura en un ensayo de neutralización celular HT-2 in vitro.

25 Los anticuerpos de la presente invención comprenden una región variable de la cadena pesada (HCVR) y una región variable de la cadena liviana (LCVR), en el que dicha HCVR comprende un péptido a CDRH1 con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 96 o SEQ ID NO: 100, un péptido a CDRH2 con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, o SEQ ID NO: 102, y un péptido a CDRH3 con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 98, y en el que dicha LCVR comprende un péptido a CDRL1 con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, o SEQ ID NO: 93, un péptido a CDRL2 con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 94, y un péptido a CDRL3 25 con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 90, o SEQ ID NO: 95.

Los anticuerpos de la presente invención además comprenden una región estructural humana.

35 La invención proporciona un procedimiento de tratar trastornos proliferativos celulares en un mamífero, preferentemente un primate, y más preferentemente un ser humano, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

40 La invención proporciona un procedimiento de tratar una enfermedad o afección en que la fibrogénesis y/o angiogénesis mediada por TGF- β 3 están implicadas en un mamífero, preferentemente un primate, y más preferentemente un ser humano, que incluye síndrome mielodisplásico (MDS)/trastorno mieloproliferativo (MPD), cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, mieloma múltiple, cáncer colorrectal, otras neoplasias hematológicas (leucemia de células pilosas, CML, AML, etc), que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo. Esto también puede comprender administrar al mamífero una cantidad efectiva de un agente terapéutico diferente de los anticuerpos anti-TGF- β , tales como un agente quimioterapéutico, agente anti-angiogénico, o quimioterapia citotóxica.

45 La presente invención proporciona un procedimiento de tratar un paciente con cáncer de mamas metastásico que sobreexpresa HER2, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención y un anticuerpo que bloquea la señalización a través del receptor HER-2, es decir, trastuzumab.

50 La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos proliferativos celulares en mamíferos. En forma adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adaptado para tratar trastornos proliferativos celulares que comprende un anticuerpo de la invención en combinación con uno o más excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables de estos. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección capaz de mejorar o evitar por la neutralización de actividades de TGF- β 3.

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección en que la fibrogénesis y/o angiogénesis mediado por TGF- β 3 están implicados en un mamífero, preferentemente un primate, y más preferentemente un ser humano, que incluye MDS/MPD, cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, mieloma múltiple, cáncer colorrectal, otras neoplasias hematológicas (leucemia de células pilosas, CML, AML, etc), que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo. Esto también puede comprender administrar al mamífero una cantidad efectiva de un agente terapéutico diferente de los anticuerpos anti-TGF- β , tales como un agente quimioterapéutico, antiangiogénico o citotóxico, o una citoquina. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adaptada para el tratamiento de las afecciones en que la neutralización o reducción de actividades TGF- β 3 debe ser beneficioso en un mamífero, que incluye MDS/MPD, cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, mieloma múltiple, cáncer colorrectal, otras neoplasias hematológicas (leucemia de células pilosas, CML, AML, etc), que comprende un anticuerpo de la invención en combinación con uno o más excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección capaz de mejorar o evitar por la neutralización o reducción de las actividades de TGF- β 3.

Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1A y B muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena livianas de los anticuerpos de la invención preferidas respectivamente. Los dominios CDR están en negrita.

Las FIG. 2A y B muestran el alineamiento de la secuencias de aminoácidos de los dominios de CDR de los anticuerpos preferidos de la presente invención. Las variaciones están en negrita y subrayado.

detienen, reducen o invierten por ejemplo, progresión o severidad que se inhibe incluyendo, pero sin limitación, una actividad o propiedad biológica, a enfermedad o a afección. La inhibición o neutralización es preferentemente al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o superior.

Con respecto a las capacidades de unión y neutralización de los anticuerpos de la invención, la TGF- β denominada a la presente es la forma biológicamente activa, humana, madura de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (SEQ ID NO: 1, 2, y 3). Ver también, por ejemplo, Núm de acceso NCBI: P01137, NP_003229, y NP_003230 que describe ADN y secuencias de aminoácidos de, respectivamente, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 humanas (que incluye sus dominios precursores y porciones maduras). Una TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3 humana homodimérica ligada a disulfuro madura contiene a dos 112 polipéptidos del residuo aminoácido y tiene una masa molecular predicha de aproximadamente 25 KDa. Los anticuerpos de la invención se unen y neutralizan tales isoformas de TGF- β 3 maduras pero no muestran la unión significativa de isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 latentes en afecciones similares.

Las mejoras de afinidad y unión cinéticas resuelven problemas de anticuerpo, por ejemplo, ayudando a aumentar los perfiles farmacocinéticos y de seguridad; reduciendo la dosificación, toxicidad y costo de la terapia; y mejorando la eficacia biológica. La constante de disociación (K_d) de un anticuerpo se puede hallar usando procedimientos de la técnica, por ejemplo, Kinexa® (ver, por ejemplo, Darling, et al., 2004 ASSAY and Drug Development Technologies 2:647-57) o BIAcore® AB (Upsala, Suecia), o adaptación de Karlsson et al., 1991 J. Immunol. Methods 145, 299-340. El término " k_{on} " de la presente se refiere a la constante de asociación u "on-rate", o tasa de reacción específica, hacia adelante, o reacción de formación del complejo anticuerpo:antígeno, $M^{-1}seg^{-1}$. El término " k_{off} " de la presente, se refiere a la constante de disociación u "off-rate", o tasa de reacción específica, para la disociación de un anticuerpo de un complejo anticuerpo:antígeno, (seg^{-1}). El término " K_d " de la presente, se refiere a la constante de disociación de un complejo anticuerpo: antígeno particular – calculado como $K_d = k_{off}/k_{on}$. K_a es la inversa de la K_d .

La K_d de un anticuerpo de la invención para la TGF- β 1 humana, madura está en el rango de aproximadamente 0,0001 pM a aproximadamente 5,0 pM. Más preferentemente, está en el rango de aproximadamente 0,001 pM a aproximadamente 3,0 pM. Con máxima preferencia, está en el rango de aproximadamente 0,01 pM a aproximadamente 0,5 pM. La K_d de un anticuerpo de la invención para la TGF- β 2 humana, madura está en el rango de aproximadamente 0,01 pM a aproximadamente 35 5,0 pM. Más preferentemente, en el rango de aproximadamente 0,05 pM a aproximadamente 2,0 pM, y con máxima preferencia, está en el rango de aproximadamente 0,1 pM a aproximadamente 1,5 pM. La K_d de un anticuerpo de la invención para la TGF- β 3 humana, madura está en el rango de aproximadamente 0,005 pM a aproximadamente 3 pM. Más preferentemente, está en el rango de aproximadamente 0,05 pM a aproximadamente 2,8 pM. Con máxima preferencia, está en el rango de aproximadamente 0,2 pM a aproximadamente 2 pM. Preferentemente los anticuerpos de la invención se caracterizan por una K_d de $4,0 \times 10^{-12} M$ o menos para la TGF- β 1 humana, madura, una K_d de $8,0 \times 10^{-12} M$ o menos para la TGF- β 2 humana, madura, y una K_d de $4,0 \times 10^{-12} M$ o menos para la TGF- β 3 humana, madura.

La K_d de un anticuerpo de la invención para la TGF- β 1 es al menos 2 veces mayor que la K_d de 1D11.16 para la TGF- β 1, más preferentemente es al menos 25 veces mayor, y con máxima preferencia es al menos 50 veces mayor. Para ser claro, la mayor afinidad puede significar un valor K_d menor. La K_d de un anticuerpo de la invención para la

TGF- β 2 es al menos 1,5 veces mayor que la K_d de 1D11.16 para la TGF- β 2, más preferentemente es al menos 10 veces mayor, y con máxima preferencia es al menos 20 veces mayor. La K_d de un anticuerpo de la invención para la TGF- β 3 es al menos 4 veces mayor que la K_d de 1D11.16 para la TGF- β 3, más preferentemente es al menos 6 veces mayor, y con máxima preferencia es al menos 10 veces mayor.

La K_d de una Fab de la invención para la TGF- β 1 humana, madura está en el rango de aproximadamente 0,009 pM a aproximadamente 75,0 pM, es más preferentemente en el rango de aproximadamente 0,018 pM a aproximadamente 50 pM, y está con máxima preferencia en el rango de aproximadamente 0,02 pM a aproximadamente 25 pM. La K_d de una Fab de la invención para la TGF- β 2 humana, madura está en el rango de aproximadamente 0,0045 pM a aproximadamente 60 pM, es más preferentemente en el rango de aproximadamente 0,002 pM a aproximadamente 45 pM, y está con máxima preferencia en el rango de aproximadamente 0,02 pM a aproximadamente 35 pM. La K_d de una Fab de la invención para la TGF- β 1 es al menos 30 veces mayor que la K_d de 1D11.16 para la TGF- β 1, más preferentemente es al menos 300 veces mayor, y con máxima preferencia es al menos 1500 veces mayor. La K_d de una Fab de la invención para la TGF- β 2 es al menos 10 veces mayor que la K_d de 1D11.16 para la TGF- β 2, más preferentemente es al menos 100 veces mayor, y con máxima preferencia es al menos 500 veces mayor.

Los anticuerpos de la invención exhiben para la TGF- β 1 humana, madura preferentemente en el rango de aproximadamente 110 a aproximadamente 1 (todos los valores para k_{off} son $\times 10^{-6} s^{-1}$), más preferentemente en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 6, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 15 a aproximadamente 4; para la TGF- β 2 humana, madura preferentemente en el rango de aproximadamente 240 a aproximadamente 1, más preferentemente en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 2, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 4; y para TGF- β 3 humana madura preferentemente en el rango de aproximadamente 90 a aproximadamente 1, más preferentemente en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 4, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 6. Los anticuerpos de la invención exhiben mejora k_{off} con respecto a 1D11.16 para la TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces, más preferentemente en el rango de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 25 veces, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 veces.

En otra realización, un anticuerpo de la invención tiene una k_{on} mayor que 5 para la TGF- β 1 humana, madura, mayor que 2,8 para la TGF- β 2 humana, madura, y mayor que 1,56 para la TGF- β 3 humana, madura (todos los valores para k_{on} son $\times 10^7 M^{-1} s^{-1}$). La K_{on} para la TGF- β 1 humana, madura está preferentemente en el rango de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 60, más preferentemente en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 45, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 30; para la TGF- β 2 humana, madura está preferentemente en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, más preferentemente en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 15; y para la TGF- β 3 humana, madura está preferentemente en el rango de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 20, más preferentemente en el rango de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 10, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 5. Los anticuerpos de la invención exhiben una mejora de k_{on} promedio respecto de 1D11.16 para las TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 preferentemente en el rango de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 40 veces, más preferentemente en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 veces, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención se une a TGF- β 1 respecto de TGF- β 2 y TGF- β 3.

Un anticuerpo se dice que para "neutralizar" su antígeno si la unión del anticuerpo al antígeno produce inhibición o reducción completa o parcial, de una función biológica del antígeno. La neutralización de una actividad biológica de la isoforma TGF- β 3 se evalúa por la medición de inhibición o reducción completa o parcial, de uno o más indicadores de actividad de TGF- β 3 in vitro o in vivo tales como, unión del receptor, un efecto inhibitorio del crecimiento celular; quimiotaxis, apoptosis, fosforilación de la proteína intracelular, o transducción de señales. Con máxima preferencia, se evalúa la capacidad para neutralizar actividad de TGF- β 3, como se describe en la presente, por un ensayo de proliferación celular HT-2 o por la medición de la inhibición de la fosforilación de Smad2.

Los anticuerpos de la invención neutralizan TGF- β 1 humana, madura, TGF- β 2 humana, madura, y TGF- β 3 humana, madura, y tienen una IC_{50} menor que o igual a aproximadamente 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM, 17,5 pM, 10 pM, 4 pM, o 3 pM para la TGF- β 1 humana, madura, una IC_{50} menor que o igual a aproximadamente 400 pM, 345 pM, 200 pM, 100 pM, 77,5 pM, 50 pM, 40 pM, o 23 pM para la TGF- β 2, y una IC_{50} menor que o igual a aproximadamente 200 pM, 115 pM, 105 pM, 75 pM, 50 pM, 45 pM, o 35 pM para la TGF- β 3 humana, madura en un ensayo de neutralización celular HT-2 in vitro.

La mejora de la actividad de neutralización aumenta los perfiles de farmacocinética y seguridad; reduce la dosificación, toxicidad, y costo de terapia; y mejora la eficacia biológica. En una realización preferida, la IC_{50} de un anticuerpo de la invención en el ensayo de proliferación/neutralización celular HT-2 como se describe en la presente es menor que aproximadamente 20 pM para la TGF- β 1, menor que aproximadamente 325 pM para la TGF- β 2, y menor que aproximadamente 125 pM para la TGF- β 3. Contra la TGF- β 1, un anticuerpo de la invención preferentemente tiene una IC_{50} en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 pM, más

preferentemente en el rango de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30 pM, y con máxima preferencia en el rango de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 pM. Contra la TGF- β 2, un anticuerpo de la invención preferentemente tiene una IC₅₀ en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 pM, más preferentemente en el rango de aproximadamente 10 a aproximadamente 350 pM, y con máxima preferencia en el rango de aproximadamente 15 a aproximadamente 325 pM. Contra la TGF- β 3, un anticuerpo de la invención preferentemente tiene una IC₅₀ en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 pM, más preferentemente en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 pM, y con máxima preferencia en el rango de aproximadamente 10 a aproximadamente 125 pM.

En otra realización, anticuerpos de la invención exhiben en promedio una mejora de IC₅₀ respecto de 1D11.16 en un ensayo de proliferación celular HT-2 para la TGF- β 1 en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 veces, más preferentemente en el rango de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 veces, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 300 a aproximadamente 400 veces; para la TGF- β 2 en el rango de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 veces, más preferentemente en el rango de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 veces, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 200; y para la TGF- β 3 en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 veces, más preferentemente en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 veces, e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 25.

La concentración de un anticuerpo requerida para neutralizar una actividad TGF- β 3 es dependiente de varios parámetros, tales como, por ejemplo, concentración de citoquina, tipo celular, afecciones del crecimiento, y tipo de actividad estudiada. El carácter de neutralización de un anticuerpo de la invención se evalúa por la medición del grado de inhibición de la fosforilación de la proteína Smad2 en un ensayo del modelo de xenoinjerto del tumor U87MG humano, como se describió en la presente. En otra realización preferida, un anticuerpo de la invención tiene una TED₅₀ (dosis efectiva terapéutica) en tal ensayo en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg/kg, más preferentemente en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 mg/kg; e incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/kg.

Ciertos anticuerpos y fragmentos de la invención tienen CDR específicas: VHCDR1X₁X₂WMN [SEQ ID NO:10, donde X₁ es T o S; y X₂ es E, o Y]; VHCDR2 QIFPX₁X₂GSTNYX₃EM₄EG [SEQ ID NO:11, donde X₁ es A, o F; X₂ es S, T, o L; X₃ es N, G, S, D, o A; X₄ es F, o Y]; VHCDR3 GX₁GNALDAMDY [SEQ ID NO:12, donde X₁ es D, I, M, Y, L, V, Q, o F]; VLCDR1 RASESVDX₁X₂GNSFMH [SEQ ID NO:13, donde X₁ es S, Y, F, o L; X₂ es Y o W]; VLCDR2 X₁ASNLES [SEQ ID NO:14, donde X₁ es L, o Y]; y VLCDR3 X₁QX₂X₃EDPLT [SEQ ID NO: 15, donde X₁ es Q, T, o C; X₂ es N, o H; X₃ es N, I, M, D, T, o A].

También están comprendidos los anticuerpos creados con las CDR de tales fórmulas después de la manipulación genética de las CDR (en orientación apropiada) en las secuencias estructurales de anticuerpo humanas o humanizadas para producir composiciones de la invención que neutralizan TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 humanas, maduras. Se puede usar cualquier procedimiento para incorporar las CDR específicas dentro de las secuencias estructurales. Como se describe, las secuencias estructurales variables humanas o humanizadas pueden derivar de cualquier dominio variable humano de línea germinal o reordenado, o, por ejemplo, dominio variable sintético basado en las secuencias de consenso de dominios variables humanos conocidos. Las secuencias estructurales de dominios variables preferidas son las no afectan significativamente las propiedades biológicas de una realización de anticuerpo anti-TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 – es decir, la capacidad de unir con alta afinidad y neutralizar la TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 humana madura. Preferentemente, tales estructuras en forma adicional no estimulan reacciones inmunológicas significativas cuando se administran a un ser humano. Las secuencias estructurales pueden ser secuencias de secuencias de anticuerpos o de consenso humanas naturales de varios anticuerpos humanos.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias estructurales para la región variable de la cadena pesada de las realizaciones del anticuerpo de la invención incluyen el segmento VH DP-5 (Tomlinson, et al. 1992 J. Mol. Biol. 227:776-98) y el segmento J JH4, JH1 o JH5 (Ravetch, et al. 1981 Cell 27:583-91). El segmento Vk L1 (Cox, et al. 1994 Eur. J. Immunol. 24:827-36) y el segmento J Jk4 (Hieter, et al. 1982 J. Biol. Chem. 10:1516-22) son ejemplos no limitantes de las secuencias estructurales para la región variable de la cadena liviana.

En una realización preferida, la estructura FR1 de la HCVR comprende [SEQ ID NO: 16]; la estructura FR2 de la HCVR comprende [SEQ ID NO:17]; la estructura FR3 de la HCVR comprende [SEQ ID NO:18]; y la estructura FR4 de la HCVR comprende [SEQ ID NO:19]. En otra realización preferida, la estructura FR1 de la LCVR comprende [SEQ ID NO:20]; la estructura FR2 de la LCVR comprende [SEQ ID NO:21]; la estructura FR3 de la LCVR comprende [SEQ ID NO:22]; y la estructura FR4 de la LCVR comprende [SEQ ID NO:23]. En otra realización preferida, una estructura HCVR comprende [SEQ ID NO: 86] en la que X₁ es S, Y, F, o L; X₂ es Y o W; X₃ es A, o F; X₄ es S, T, o L; X₅ es N, G, S, D, o A; X₆ es F, o Y; y X₇ es D, I, M, Y, L, V, Q, o F. En otra realización preferida, una estructura LCVR comprende [SEQ ID NO: 87] en la que X₁ es T o S; X₂ es E, o Y; X₃ es L, o Y; X₄ es Q, T, o C; X₅ es N, o H; y X₆ es N, I, M, D, T, o A.

En otra realización preferida, las estructuras y regiones constantes pueden contener alteraciones, supresiones, adiciones, sustituciones, o cualquier combinación de estos en comparación con las secuencias humanas. Se prefieren las estructuras y regiones constantes en las se sustituyen, suprimen o añaden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10

aminoácidos en cualquier combinación. En otra realización, la estructura tiene 85-99% de identidad de secuencia con una estructura desvelada en la presente.

En una realización, una región constante preferida de la cadena pesada para usar con una composición de unión al anticuerpo de la invención es una región constante de IgG. En una realización más preferida, la región constante de IgG es una región constante de IgG1 o una región constante de IgG4 (aun más preferentemente son regiones constantes de la [SEQ ID NO: 24]; o [SEQ ID NO:25]). Una secuencia preferida de la región constante de la cadena liviana de la invención es la [SEQ ID NO: 26]. En otra realización preferida, las composiciones de unión al anticuerpo contiene la región constante de la cadena pesada de IgG1 o la región constante de la cadena pesada de IgG4 y la región constante de la cadena pesada Kappa.

También están abarcadas las secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención. Cuando se manipulan genéticamente los anticuerpos usando las CDR de la invención CDR, se puede determinar la identificación de residuos dentro de las estructuras de anticuerpo que probablemente influyan en secuencias dadoras yceptoras de unión al antígeno por el alineamiento de los moldes de secuencia derivados de los repertorios de anticuerpo. Los "residuos no variantes" (Kabat et al., 1991) y "residuos clave" (Chothia et al., 1989) se pueden identificar y las asignaciones de clase canónica de los bucles de unión al antígeno dador L1-L3, H1 y H2, respectivamente, se pueden determinar por la selección de una secuencia propuesta contra moldes de secuencia (ver, por ejemplo, Martin & Thornton, 1996 Mol. Biol. 263:800-15). Los residuos en la interfaz VH/VL (Chothia et al., 1985) y los residuos que se sabe que están estructuralmente conservados en el sitios centrales (Chothia et al., 1998) se comparan con los correspondientes residuos dadores y aceptores. Los residuos de la estructura dadora y aceptora no coincidentes en estos sitios se analizan sobre la base de la información de otros anticuerpos de estructura conocida (Berman, et al., 2000 Nucl. Acids Res. 28 (1):235-42). La selección de estructuras humanas como moldes para la humanización de regiones V no humanas puede definir decisiones posteriores respecto de los residuos por humanizar. Se puede emplear la elección de moldes homólogos de los anticuerpos con estructura cristalina conocida, de línea germinal, no línea germinal, o secuencias de consenso derivadas de las bases de datos disponibles (ver, por ejemplo, Routledge et al. (Routledge, et al., 1993 in Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man (Clark, M., ed) pp14-44, Academic Titles, Nottingham, UK; y B. Lo, 2004 Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press)). Otra manera de manipular genéticamente anticuerpos es elegir la secuencia de la línea germinal humana más cercana como la estructura para recibir las CDR dadoras (Tomlinson et al., 1992) por medio de una estrategia de mejor ajuste para buscar las secuencias de línea germinal en las bases de datos. El procedimiento de la estructura de la línea germinal es útil porque la secuencia de la línea germinal humana no presenta hipermutaciones somáticas, que son potencialmente inmunogénicas. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de los anticuerpos de la invención de una combinación de regiones estructurales y las CDR de la invención incrustadas en las estructura humana modificada se pueden manipular genéticamente mediante una estrategia de la línea germinal humana de consenso donde un subgrupo humano se usa como la estructura (ver, por ejemplo, Presta et al., 1993 J. Immunol 151:2623-32; Couto et al., 1994 Hybridoma, 13:215-9; Couto et al., 1995 Cancer Res. (Suppl.), 55, 5973s-7s; Werther et al., 1996 J. Immunol., 157:4986-95; O'Connor et al., 1998 Protein Engng 11:321-8).

Los fragmentos de anticuerpo (descritos), o parte de una secuencia o SEQ ID NO de la presente, también están comprendidos. Tales fragmentos de proteína y/o polipéptido puede ser "independientes" o comprender parte de un polipéptido o proteína más grande, del cual el fragmento forma una porción o región, por ejemplo, una región continua única de una SEQ ID NO: de la presente tal como, por ejemplo, conectado a una proteína de fusión. También están comprendidos los polinucleótidos que codifican tales fragmentos.

Los anticuerpos de la invención son manipulados genéticamente por un procedimiento conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis química; o recombinante, genética, o ingeniería molecular y no están restringidos por el procedimiento de creación. Normalmente, los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención incluyen una secuencia de polinucleótidos de control de expresión ligados operativamente a las secuencias codificadoras, que incluyen regiones promotoras asociadas naturales o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucarióticos en los vectores que transformar o transfectar células huésped eucarióticas, pero también se pueden usar secuencias control para huéspedes procarióticos. Una vez que el vector se incorpora en una célula huésped apropiada, se propaga en condiciones adecuadas para expresar las secuencias, y, según se desee, para la recolección y purificación de las cadenas livianas, cadenas pesadas, dímeros de cadena liviana/cadena, o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina. Las secuencias de ADN de la región constante humana se aíslan por procedimientos conocidos en la técnica a partir de una variedad de células humanas, pero preferentemente de células B inmortalizadas. Las células de la fuente adecuada para las secuencias de polinucleótidos y células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas se obtienen de fuentes conocidas en la técnica.

La invención abarca secuencias de polipéptidos funcionales con semejanza o identidad de secuencia sustancial a una secuencia de la presente (por ejemplo, al menos: 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una secuencia (o fragmento)) de la invención por medio de procedimientos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, optimización de coincidencias de residuos. Tales secuencias incluyen cualquiera con una característica funcional de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, unión y neutralización de TGF- β 1, β 2 y β 3 humana madura en un ensayo descrito en la presente). Tales realizaciones relacionadas funcionalmente

incluyen adiciones, sustituciones, y/o supresiones de residuos de aminoácidos de una secuencia de la invención en una CDR o una región constante. Las sustituciones y/o adiciones de aminoácidos se pueden basar en semejanza de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Asimismo, los aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos se pueden sustituir o añadir en la secuencia de polipéptidos. Todas estas variantes están en el alcance de los expertos en la técnica de biología molecular tomando en cuenta las enseñanzas que aquí especifican fórmulas únicas o secuencias de polipéptidos y las limitaciones funcionales de la invención.

Las realizaciones preferidas de la composición de la invención tienen una o más de las siguientes características: K_d menor que 2×10^{-13} M para la TGF- β 1, menor que 5×10^{-13} M para la TGF- β 2, menor que 8×10^{-13} M para la TGF- β 3; k_{off} menor que $8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ para la TGF- β 1, menor que $11 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ para la TGF- β 2, menor que $13 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ para la TGF- β 3; k_{on} mayor que $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la TGF- β 1, mayor que $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la TGF- β 2, y mayor que $1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la TGF- β 3; el aumento de la K_d de una composición de Fab para la TGF- β 1 con respecto a un 1D11.16 Fab para la TGF- β 1 de al menos 6000 veces; el aumento de la K_d de una composición de anticuerpo con respecto a 1D11.16 mayor que aproximadamente 34 veces para la TGF- β 1, mayor que aproximadamente 13 veces para la TGF- β 2, y mayor que aproximadamente 9 veces para la TGF- β 3; IC_{50} mayor que aproximadamente 300 veces más alto que un valor de IC_{50} de un 1D11.16 en un ensayo HT-2; un valor ED_{50} en el rango de aproximadamente 11 a aproximadamente 17 mg/kg en un modelo de xenoinjerto de tumor humano U87MG para la inhibición de la fosforilación de Smad2 de (como se describe en la presente); menor que 5,0% de agregación de una composición de la invención determinado por cromatografía de exclusión por tamaño después del almacenamiento durante 30 días a una concentración de 1 mg/ml, 40°C, en solución tampón estándar (tal como, por ejemplo, citrato (20 mM); fosfato (10 mM); o PBS (10 mM de fosfato, que contiene NaCl 150 mM)), y a pH (5,0, 6,5, o 7,4); menor que 1% de productos de degradación o sin formas ácidas –determinado por cromatografía de intercambio catiónico (CEX)- después del almacenamiento durante 30 días a 1 mg/ml, menor que 35°C, en solución tampón estándar (tal como, por ejemplo, citrato (20 mM); fosfato (10 mM); o PBS (10 mM de fosfato, que contiene NaCl 150 mM)), y a <pH7,0; y más de 80% de recuperación de proteína de una composición de la invención por medio de procedimientos conocidos en la técnica después del almacenamiento a una concentración de 2 mg/ml a 4°C durante dos semanas, y recuperación de diálisis a pH 6,0.

Las composiciones de la invención son útiles como agentes terapéuticos para modular, tratar, inhibir, mejorar, o evitar una enfermedad, trastorno, estado, síndrome, o afección asociados con uno o más de TGF- β 1, β 2 y β 3. Los anticuerpos se pueden administrar por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica y se pueden combinar con portadores, diluyentes, estabilizantes y excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales. Estas combinaciones se pueden colocar en formas de dosis tales como por liofilización en viales de dosificación sellados o con almacenamiento en preparaciones acuosas estabilizadas. Los portadores, diluyentes, estabilizantes y excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos o se describen en la técnica, por ejemplo, en el Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ.

En particular, los anticuerpos (o fragmentos) de la invención son útiles para tratar trastornos proliferativos celulares, que incluyen cualquier enfermedad, síndrome, trastorno, afección, o estado que afecta cualquier célula, tejido, cualquier sitio o cualquier combinación de órganos, tejidos o partes del cuerpo que se caracteriza por una proliferación anormal local única o múltiple de células, grupos de células, o tejidos, sea benigno o maligno. Como se define en la presente, un trastorno proliferativo celular abarca, por ejemplo, neoplasias hematológicas (tales como, por ejemplo, MDS o MPD, tales como, por ejemplo, con compromiso de megacariocitos (ver, por ejemplo, Sakamaki, et al., 1999 Blood 94(6):1961-70)), leucemia de células pilosas y otras neoplasias hematológicas, tales como, por ejemplo, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), etc.); cáncer pulmonar de células no pequeñas; cáncer de mamas; cáncer de próstata (que incluye refractario a hormonas); cáncer ovárico; cáncer hepatocelular; cáncer pancreático; mieloma múltiple; cáncer colorrectal; un neoplasma de colon, abdomen, hueso, mamas, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, sistema endocrino (por ejemplo, una glándula adrenal, una glándula paratiroides, la hipófisis, los testículos, el ovario, el timo, o la tiroides), ojo, cabeza, cuello, sistema nervioso (central o periférico), el sistema linfático, pelvis, piel, bazo, tórax, y sistema urogenital. En forma adicional, un anticuerpo de la invención es útil para la enfermedad del músculo esquelético - tal como, por ejemplo, tratamiento de debilitamiento muscular (por ejemplo, caquexia); promoción del crecimiento muscular (por ejemplo, después de enfermedad, trauma, reconstrucción, reemplazo).

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida y fluorouracilo; antimetabolitos, tales como fluorouracilo y gemcitabina; antibióticos, tales como adriamicina; y agentes antimicóticos, tales como vincristina y vinorelbina.

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea o interfiere, en algún grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El agente anti-angiogénico puede ser, por ejemplo, una pequeña molécula o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento involucrado en la promoción de angiogénesis.

El término "quimioterapia citotóxica" como se usa en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o causa la destrucción de células, que incluye isótopos radiactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} ,

Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluye fragmentos y/o sus variantes.

- 5 Un polinucleótido está "ligado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia. Un péptido está "ligado operativamente" a otro péptido cuando los polinucleótidos que los codifican están ligados operativamente, preferentemente ellos están en el mismo marco de lectura abierta.

- 10 El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado incluyendo, pero sin limitación, plásmidos y vectores virales. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen mientras otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están ligados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente como "vectores de expresión recombinante" (o solo "vectores de expresión") y ejemplos de vectores son bien conocidos en la técnica.

- 15 Como se usan en la presente, las expresiones "célula" "célula huésped," "línea celular" y "cultivo celular" se usan en forma indistinta e incluyen una célula individual o cultivo celular que es receptor de cualquier polinucleótido aislado de la invención o cualquier vector recombinante que comprende una secuencia que codifica una HCVR, LCVR o anticuerpo monoclonal de la invención. Las células huésped incluyen una progenie de una célula huésped única, y la progenie puede no ser necesariamente idéntica (en la morfología o complemento de ADN total) a la célula progenitora original debido a la mutación y/o cambio natural, accidental, o deliberado. Una célula huésped incluye células transformadas, transducidas o infectadas in vivo o in vitro con uno o más vectores recombinantes o un polinucleótido que expresa un anticuerpo monoclonal de la invención o a cadena liviana o cadena pesada de este. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la invención (esté o no incorporado en el cromosoma huésped) también se puede denominar como una "célula huésped recombinante". Las células huésped preferidas para usar en la invención son células CHO (por ejemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0 y células COS (ATCC por ejemplo, CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Las células huésped adicionales para usar en la invención incluyen células de planta, células de levaduras, otras células de mamífero y células procarióticas.

Expresión y purificación de anticuerpos

- 30 Para expresar un anticuerpo de la invención, un ADN que codifica una cadena liviana y/o pesada de longitud parcial o completa se inserta en un vector de expresión de modo que el gen está ligado operativamente a las secuencias control de transcripción y traducción. El vector de expresión y las secuencias control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena liviana del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por procedimientos estándares. En forma adicional, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena liviana y/o pesada del anticuerpo anti-TGF- β de una célula huésped. El gen de la cadena liviana y/o pesada del anticuerpo anti-TGF- β monoclonal se puede clonar en el vector de modo que el péptido señal esté ligado operativamente en marco al extremo amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo.

- Además del gen de la cadena pesada y/o liviana del anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la invención porta secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia regulatoria" se considera que incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación), según sea necesario, que controlan la transcripción o traducción del gen de la cadena del anticuerpo. El diseño del vector de expresión, que incluye la selección de las secuencias regulatorias puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped por transformar, el nivel de expresión deseado de la proteína. Las secuencias regulatorias para la expresión de la célula huésped incluye elementos virales que dirigen altos niveles de expresión en las células mamíferas, tales como promotores y/o potenciadores derivados del citomegalovirus (CMV), virus simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío mayo del adenovirus (AdMLP)) y virus de polio.

- Además de los genes de la cadena pesada y/o liviana y secuencia regulatorias del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y uno o más genes del marcador seleccionable. El gen del marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en el vector que se ha introducido. Por ejemplo, normalmente el gen del marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, hidromicina; o metotrexato, en una célula huésped en que se ha introducido el vector. Los genes del marcador seleccionable preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped menos DHFR con selección/amplificación con metotrexato), el neo gen (para la selección G418), y glutamina sintetasa (GS) en una línea celular negativa GS (tal como NS0) para la selección/amplificación.

Para la expresión de las cadenas liviana y/o pesada, el vector de expresión que codifica las cadena pesada y/o liviana se introduce en una célula huésped por técnicas estándares por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección DEAE-dextrano, transducción, infección y similares. Si bien es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procarióticas o eucarióticas, se prefieren las células eucarióticas, y con máxima preferencia las células huésped de mamífero, debido a que tales células, es más probable que se ensamblen y secreten un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (que incluyen células DHFR-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20, 1980, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol. 159 : 601-21, 1982, y células GS-CHO, que se describen en Enosawa, et al., Cell Transplantation 6: 537-540, 1997, usadas con un marcador seleccionable de glutamina sintetasa (GS)), las células de mieloma NS0, células COS y células SP2/0. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes del anticuerpo se introducen en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen por el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar de la célula huésped y/o el medio de cultivo mediante procedimientos de purificación estándares.

Las células huésped también se pueden usar para producir porciones, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ejemplo, moléculas de fragmentos Fab o scFv por técnicas que son convencionales. El profesional experto entenderá que las variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser conveniente transfectar una célula huésped con ADN que codifica la cadena liviana o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. La tecnología del ADN recombinante también se puede usar para extraer algo o todo el ADN que codifica una o ambas cadenas liviana y pesadas que no es necesaria para la unión a TGF- β . Las moléculas expresadas de tales moléculas de ADN truncadas están también abarcadas por los anticuerpos de la invención.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena liviana del anticuerpo se introduce en las células GS-CHO por electroporación. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y liviana del anticuerpo están ligados operativamente a los elementos regulatorios potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similar tales como un elemento regulatorio potenciador CMV/promotor AdMLP o un elemento regulatorio potenciador SV40/ promotor AdMLP) para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con e vector por medio de selección/ amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular estándar se usan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Los anticuerpos, o porciones de unión con el antígeno, de la invención se pueden expresar en un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor, et al., Nucleic Acids Res. 20:6287-95, 1992).

Una vez expresado, los anticuerpos intactos, sus dímeros, cadenas pesada y liviana individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, que incluye precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad, fase inversa, interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90%, 92%, 94% o 96% de homogeneidad, y de máxima preferencia 98 a 99% o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, en forma parcial o a homogeneidad, según se desee, los péptidos posteriormente se pueden usar en forma terapéutica o profiláctica, como se realiza en la presente.

Composición

Un anticuerpo de la invención se puede incorporar en las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Los compuestos de la invención se pueden administrar solos o en combinación con un portador, diluyente y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis únicas o múltiples. Las composiciones para la administración se diseñan para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado, y los diluyente, portador y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares se usan, según sea apropiado. Dichas composiciones se diseñan de acuerdo con técnicas convencionales como por ejemplo, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19va Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación que son generalmente conocidas por los profesionales.

Una composición que comprende un anticuerpo de la invención se puede administrar a un sujeto que exhibe patologías o trastornos que se describen en la presente por medio de técnicas de administración estándares que

incluyen administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o en supositorio.

La vía de administración de un anticuerpo de la invención puede ser parenteral. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. El término parenteral como se usa en la presente incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal, o intraperitoneal. Se prefiere la administración sistémica periférica intravenosa o intraperitoneal o subcutánea.

La composición normalmente debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento en el recipiente provisto, que incluye por ejemplo, un vial sellado o jeringa. En consecuencia, las composiciones se puede filtrar en forma estéril después de preparar la formulación, o u obtenida de otro modo en forma microbiológicamente aceptable. Una composición típica para la infusión intravenosa puede tener un volumen de hasta 250-1000 ml de fluido, tal solución de Ringer estéril, solución salina fisiológica, solución de dextrosa y solución de Hank y una dosis terapéuticamente efectiva, (por ejemplo, 1 a 100 mg/ml, o más) de concentración de anticuerpo. La dosis puede variar de acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosis para cualquier sujeto dependen de muchos factores, que incluye el tamaño del paciente, área de superficie del cuerpo, edad, el compuesto particular por administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran en forma concurrente. Una dosis típica puede ser, por ejemplo, en el rango de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis inferiores o superiores a este ejemplo de intervalo, especialmente en consideración de los factores mencionados anteriormente. El régimen de dosis parenteral diario puede ser aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 10 µg/kg a 3 mg/kg peso corporal por día. El progreso se puede controlar por la evaluación periódica. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, de acuerdo con la afección, el tratamiento se repite hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles y no se excluyen de la presente. La dosis deseada se puede administrar por una administración en bolo única, por administraciones en bolo múltiples, o administración por infusión continua del anticuerpo, de acuerdo con el patrón de decaimiento farmacocinético que el profesional desea obtener.

Estas cantidades sugeridas de anticuerpo están sujetas en gran parte al criterio terapéutico. El factor clave para seleccionar una dosis y esquema apropiados es el resultado obtenido. Los factores en consideración este contexto incluyen el trastorno particular tratado, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, el esquema de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos.

Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un portador estéril adecuado antes de usar. La liofilización y reconstitución puede llevar a variados grados de pérdida de actividad del anticuerpo. Las dosis se pueden tener que ajustar para compensar. En general, se prefiere el pH entre 6 y 8.

Artículos de manufactura.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos o afecciones descritas antes. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de la invención que es efectiva para tratar el trastorno o afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es un anticuerpo anti-TGF-β de la invención. La etiqueta sobre o asociada con el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de manufactura además puede comprender un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales convenientes desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para el uso.

Ejemplo 1: Producción y purificación del anticuerpo

Para la expresión simultánea de la cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos de la invención, ambos genes que codifican la cadena pesada y cadena liviana se clonan para formar un vector de gen doble con cada gen bajo el control de un promotor hCMV-MIE separado. Las secuencias codificadoras correctas se confirman por secuenciación de ADN de las secuencias codificadoras de la cadena liviana y pesada.

El plásmido de expresión para la expresión simultánea de la cadena liviana y cadena pesada de un anticuerpo de la invención se linealiza por la enzima de corte único Sal I, se precipita con acetato de sodio y etanol, se lava con 70% de etanol enfriado en hielo y se seca al aire en un gabinete de bioseguridad estéril. El pellet de ADN posteriormente se redisuelve con el medio de transfección y se usa para transfectar las células CHO. La transfección se realiza por

electroporación de la mezcla de célula-ADN por medio del GenePulsar (BioRad, Hercules, CA) ajustado a 300 V y 1120 uFd. Los clones de expresión de un anticuerpo de la invención posteriormente se generan por dilución limitante y se expanden adicionalmente para la producción y purificación del anticuerpo. Los anticuerpos de la invención se purifican de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad, fase inversa, interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares.

Ejemplo 2: ELISA

El ELISA se ejecuta usando placas de microtitulación revestidas Costar 3366 (durante la noche a 4°C con 0,4 ug/ml de TGF-β1, TGF-β2 o TGF-β3. La placa posteriormente se lava (2X) antes de añadir (100 µl) solución de bloqueo (10 mg/ml BSA en solución tampón de lavado) por pocillos. Las diluciones de Fab se incuban en pocillos revestidos (1,5 hora, 22°C). Después del lavado, se añade conjugado de kappa anti-humana-fosfatasa alcalina y se incuba (1 hora, 22°C). Se añade un sustrato colorimétrico después del lavado intensivo y se mide la absorbancia (A560).

En otro ejemplo, las composiciones de unión se analizan en un ensayo ELISA competitivo. Normalmente, se realiza un ensayo en fase de solución en que un compuesto que puede competir con un antígeno por la unión a un anticuerpo, tal como un anticuerpo, se combina primero con el anticuerpo en fase de solución, después el grado de unión al anticuerpo con el antígeno se mide posteriormente. **Materiales:** Tampón de revestimiento de carbonato (50 mM de carbonato de sodio, pH 9,6). Antígenos: TGF-β1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF, 239 ug/ml), TGF-β2 (RDI, Cat #RDI-1035, 50 ug/ml), y TGF-β3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 ug/ml) diluidos a 0,4 ug/ml en tampón de revestimiento. Tampón de lavado (0,02 M de Tris pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,1% de Tween 20 y solución de bloqueo de 10 mg/ml BSA (Sigma A- 4503) disuelto en tampón de lavado). Las proteínas usadas como controles positivos son TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 de ratón antihumanas (R&D Systems, cat# ID11), TGF-β2 de ratón antihumana (R&D Systems, cat# BAF302) y TGF-β3 de ratón antihumana (R&D Systems, cat# BAF243), que se diluyen a 1 ug/ml en buffer de bloqueo. El conjugado del anticuerpo de detección es el conjugado de kappa anti-ratón-peroxidasa (Southern Biotech, cat# 1050-05), a una concentración de trabajo de 1:2000 en solución de bloqueo. El sustrato de reacción de color es comprimidos de O-fenilendiamina (OPD) (Sigma cat# P-6912) disueltos en tampón de sustrato: 0,1 M de Na₂HPO₄, pH a 5,0 con 0,05 M de ácido cítrico. La solución de trabajo OPD (es decir, el volumen para una placa de 196 pocillos) se obtiene fresco antes de cada desarrollo de la placa por la disolución de un comprimido OPD de 1x5 mg en 12,5 ml de tampón de sustrato, posteriormente en 5 ul de 30% de H₂O₂. **Protocolo:** Una placa de 96 pocillos única se reviste con antígeno (TGF-β1, TGF-β2 o TGF-β3 a 0,4 ug/ml y se dispensan 50 µl por pocillo), se sella con cinta y se almacena (16-20 h, 4°C). La placa se lava (2X) en tampón de lavado antes de añadir la solución de bloqueo (100 ul por pocillo de 10 mg/ml de BSA en tampón de lavado). Después de la incubación (-1 hr, 22°C), la placa se lava (2X) con tampón de lavado, posteriormente se añaden 100 ul de cada muestra (diluida en tampón) o control (diluido en PBS) y se incuba (1,5 h, 22°C). Después de la incubación, la placa se lava (6X) con tampón de lavado posteriormente se añade conjugado de kappa anti-ratón-peroxidasa (diluida a 1:2000 en solución de bloqueo) o SA-HRP (diluido a 1: 10,000 en solución de bloqueo) (100 ul/pocillo). Las muestras de ensayo se dejan incubar (1 h, 22°C) antes de añadir 100 µl de OPD sustrato/pocillo. Después del desarrollo de color (-10 min), la placa de 96 pocillos se mide a una absorbancia de 490nm.

Ejemplo 3: Constantes cinéticas para los Fab

Un instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.) mide la cinética de unión. En breves palabras, el antígeno acoplado covalentemente a las perlas azlactona y la unión de una Fab libre de la invención a las perlas se detecta con el instrumento. Para medir la K_d, los tubos individuales que contienen 20 pM de Fab (200 pM para el anticuerpo) con antígeno diluido en forma seriada decreciente (0-250 nM), se incuba (1-6d-25°C en PBS que contiene 1% de BSA, 0,02% de azida y 0,01% de Tween 20). Después de la incubación, se determina el Fab libre en cada muestra equilibrada en KinExA 3000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de K_d se determinan mediante el programa de computación KinExA 3000. Para medir k_{on}, las Fab individuales a 2 nM se mezclan con 0-240 nM de antígeno por medio del procedimiento de inyección de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se detecta Fab no unido. Los datos resultantes se usan para calcular la K_{on} con el programa de computación KinExA 3000. La K_{off} se calcula por medio de la fórmula K_d = K_{off}/K_{on}. Los datos de afinidad obtenidos en las condiciones de KinExA 40© para las realizaciones de unión a TGF-Beta1 se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Fab	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹) (x 10 6)	k _{off} (seg ⁻¹) calc. (x 10-6)	K _d (pM)
Fab 3.A	21,0	310	15
Fab 4,17	22,0	6,0	0,28
Fab 12,4	34,0	52	1,55
Fab 12,7	3,7	0,34	0,09
Fab 12,8	26,0	5,5	0,22

De modo similar, los datos de Fab para la afinidad de unión de TGF-β2 en las condiciones KinExA© mostraron una K_d <35 pM.

Ejemplo 4: Contantes cinéticas para los anticuerpos

Se conocen procedimientos alternativos de medición de constantes cinéticas, por ejemplo: afinidad de un anticuerpo de la invención para la TGF- β 1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF), TGF- β 2 (RDI, Cat #RDI-1035), y TGF- β 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF) se mide por BIAcore® 2000. Las mediciones de afinidad de unión para los anticuerpos monoclonales de longitud completa de la invención se determinan por medio del uso de Biacore. Excepto cuando se indica, todos los reactivos y materiales se adquieren en BIAcore® AB (Upsala, Suecia). Todas las mediciones se realizan a temperatura ambiente. Las muestras se disuelven en tampón HBS-EP (150 mM de cloruro de sodio, 3 mM de EDTA, 0,01% (p/v) de tensioactivo P-20, y 10 mM de HEPES, pH 7,4). La proteína recombinante A se inmoviliza en las cuatro celdas de flujo de un chip sensor CM4 a un nivel de 400-450 unidades de respuesta (RU) por medio de un kit de acoplamiento de aminos. La unión se evalúa por medio de múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se realiza a un caudal de flujo de 50 μ l/min que consisten en las etapas: inyección de 12 μ l de anticuerpo a razón de 0,5 μ g/ml, inyección de 250 μ l de TGF- β 1 (a partir de 5 nM y por medio diluciones seriadas dos veces a 0,13 nM por cada ciclo, con dos inyecciones para cada concentración) seguido por un retardo breve (5 min) o largo (120 min) para la disociación, y regeneración usando dos inyecciones de 50 μ l de 10 mM de clorhidrato de glicina, pH 1,5. Las tasas de asociación y disociación por ciclo se obtienen por el ajuste de los datos del biosensor a partir de un modelo de asociación simple mediante ClampXP (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. de Utah) para extraer las constantes de la tasa de K_{on} y K_{off} ; la constante de unión en equilibrio K_d se calcula de $K_d = k_{off}/k_{on}$.

Los anticuerpos monoclonales de longitud completa de la invención se construyeron por el ligamiento operativo de las Fab a una región Fc de una IgG₄ por medio de una técnica estándar: mAb 3 A que comprende LC de SEQ ID NO:76 & HC de SEQ ID NO: 77; mAb 4,17 LC de SEQ ID NO:84 & HC de SEQ ID NO: 85; mAb 12,4 LC de SEQ ID NO:78 & HC de SEQ ID NO: 79; mAb 12,7 LC SEQ 15 ID NO: 80 & HC SEQ ID NO:81; y mAb 12,8 LC SEQ ID NO:82 & HC SEQ ID NO: 83. Cuando los mAb se miden por medio del ensayo descrito antes, los resultados son los que se indican en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

Valores promedio				
Mabs	Isoforma	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
Mab 12,4	TGF-b1	> 4 E+07	6,71E-06	<2,0 E-13
	TGF-b2	2,42E+07	6,00E-06	2,65E-13
	TGF-b3	1,76E+07	15,3E-06	8,51E-13
Mab 12,7	TGF-b1	> 5E+07	7,93E-06	<2,0 E-13
	TGF-b2	2,80E+07	11,1E-06	4,73E-13
	TGF-b3	1,56E+07	12,8E-06	8,20E-13
Mab 12,8	TGF-b1	>5 E+07	7,92E-06	<2,0 E-13
	TGF-b2	2,29E+07	1,22E-05	1,00E-12
	TGF-b3	1,85E+07	1,12E-05	5,40E-13
Mab 3.A	TGF-b1	>5 E+07	1,07E-04	<2,0 E-12
	TGF-b2	>5 E+07	2,18E-04	<4 E-12
	TGF-b3	2,90E+07	2,38E-05	9,26E-13
Mab 4,17	TGF-b1	>5 E+07	9,71E-06	<2,0 E-13
	TGF-b2	2,37E+07	9,86E-06	5,29E-13
	TGF-b3	2,17E+07	2,84E-05	1,53E-12

Ejemplo 5: Especificidad

Se usa BIAcore para evaluar la especificidad de los anticuerpos para las entidades, tales como, por ejemplo, la forma latente de TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3. Todas las mediciones se realizan a temperatura ambiente. Las muestras se disuelven en tampón HBS-EP (150 mM de cloruro de sodio, 3 mM de EDTA, 0,01% (p/v) de tensioactivo P-20, y 10 mM de HEPES, pH 7,4). La proteína A recombinante se inmoviliza en las cuatro celdas de flujo de un chip sensor CM4 a un nivel de 400-450 unidades de respuesta (RU) por medio de un kit de acoplamiento de aminos. La unión se evalúa por medio de múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se realiza a un caudal de flujo de 100 μ l/min que consisten en las etapas: inyección de 15 μ l de una composición de unión al anticuerpo a razón de 1 μ g/ml, inyección de 250 μ l de 5 nM de TGF- β 1, 5 nM de TGF- β 2, 0,5 nM de TGF- β 3 seguido por un retardo corto (5 min) para la disociación, y regeneración por medio de 50 μ l de 10 mM de clorhidrato de glicina, pH 1,5. Se determina la cantidad de señal después de capturar el anticuerpo, o sea el ligando, por medio del programa de computación control del instrumento. Como la señal es proporcional a la masa de proteína capturada, la estequiometría del ligando capturado se puede calcular fácilmente. En tales condiciones, los datos para los anticuerpos de la invención no muestran la unión específica significativa de las isoformas de TGF latentes.

Ejemplo 6: Ensayo de neutralización celular HT-2

Para analizar la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la bioactividad de TGF- β , se puede adaptar el ensayo

de proliferación celular HT-2 de Tsang, et al., (1995 Cytokine 7:389-97). El ensayo HT-2 evalúa las características de neutralización de un anticuerpo sobre la bioactividad de TGF- β por la inhibición y/o disminución significativa de la proliferación celular de la línea celular HT2 dependiente de IL4. En breves palabras, las células HT-2 proliferan en una manera dependiente de la dosis por IL-4 pero experimentan apoptosis por TGF- β . La inhibición de la proliferación por TGF- β se bloquea por la adición de un anticuerpo anti-TGF- β 3. Las células HT-2 humanas proliferan en respuesta a IL-4 pero TGF- β 1, β 2, o β 3 inhiben la proliferación inducida por IL-4. En consecuencia, un anticuerpo se neutraliza si impide el efecto inhibitorio normal de TGF- β sobre las células HT-2 inducidos por IL-4. Por consiguiente, la proliferación celular inducida por IL-4 debe proceder sin restricciones si se añade cantidad suficiente de una composición de unión específica de TGF- β 1, β 2, y β 3 a una mezcla de células HT-2 que contiene una cantidad inhibitoria de proliferación celular de TGF- β 1, β 2, o β 3. La capacidad de neutralizar la respuesta a la dosis se hace usando el ensayo de HT-2 en presencia de particulares isoformas de TGF- β 3 y la señal de proliferación IL-4.

El grado de proliferación celular se determina usando un ensayo de proliferación celular comercial (por ejemplo, Ensayo de proliferación celular en solución CellTiter 96® AQueous One de Promega). Las células HT-2 se mantienen en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, penilina/estreptomina (100 U/ml y 100 μ g/ml respectivamente), 50 uM de beta-mercaptoetanol y 10 ng/ml sw hIL-2 (R&D Systems). Las células se centrifugan a 1000 RPM en una centrífuga Jouvan CR422 y se resuspenden en PBS. Después del lavado(2X) con PBS, las células se resuspenden finalmente ($0,15 \times 10^6$ células/ml en medio de ensayo (RPMI 1640 libre de rojo fenol suplementado con 2% de FBS, penicilina/ estreptomina (100 U/ml y 100 μ g/ml respectivamente) y 50 uM de beta-mercaptoetanol). A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añaden 50 μ l de células en medio de ensayo. Concentraciones variadas de anticuerpo de la invención se preincuban con TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3 recombinante (300 pg/ml en medio de ensayo). Después de una preincubación de 30 minutos, se añaden 50 μ l de mezcla de TGF- β /anticuerpo a las células HT-2, seguido inmediatamente por 50 μ l de medio de ensayo que contiene 6,0 de ng/ml IL-4 murina (2,0 ng/ml final). Después de la incubación con el medio de ensayo (20-48 horas, 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂), se añaden 35 μ l de solución acuosa CellTiter 96 (Promega Corp). Después de la incubación adicional (2-3 horas, como anteriormente), el ensayo se cuantifica por el análisis de una placa lectora ELISA a 490 nm mediante el ensayo colorimétrico CellTiter 96® (la cantidad de producto de formazano medida por la cantidad de absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas). En comparación con 1D11,16; ATCC-HB9849, los anticuerpos de la invención exhiben mejor neutralización de muerte celular inducida por TGF- β 1, β 2, y β 3 y potencia de la neutralización (por ejemplo, IC₅₀ < 0,1 mg/ml o <125 pM) como se muestra en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

		mAb 3,A		mAb 4,17		mAb 12,4		mAb 12,7	
	Media ng/ml	Media ng/ml	SEM	Media ng/ml	SEM	Media ng/ml	SEM	Media ng/ml	SEM
TGF- β 1	214,84	2,62	0,96	0,42	0,08	0,44	0,16	0,59	0,16
TGF- β 2	574,40	51,43	11,63	3,65	0,84	6,14	1,37	3,34	0,89
TGF- β 3	99,98	16,91	5,61	15,79	3,68	5,22	0,87	6,78	0,41

Ejemplo 7: Ensayo de neutralización por xenoinjerto

En la unión de los receptores TGF- β R1 y TGF- β R2, los ligandos de TGF- β 3 activan una cascada de señalización, en que las proteínas Smad-2 se fosforilan para producir efectos biológicos corriente abajo tales como, por ejemplo, en cáncer. La inhibición y/o disminución significativa de la fosforilación de Smad2 evidencia la neutralización de las actividades biológicas TGF- β 3 por medio de la activación de transcripción (ver, por ejemplo, Li, et al., 2005 World J J Surg 29(3):306-11). Para evaluar la eficacia de neutralización in vivo de un anticuerpo, se obtienen niveles de Fosfo-Smad2 en un modelo de xenoinjerto y/o en múltiples órganos o tejidos después de la exposición a un anticuerpo de la invención para proporcionar evidencia de su eficacia de neutralización en las afecciones proliferativas celulares tales como, por ejemplo, cáncer. La prueba de eficacia in vivo se evalúa por la medición del grado de inhibición fosfo-Smad2 usando un modelo de xenoinjerto humano U87MG altamente vascularizado (ver, por ejemplo, Plowman, et al., 1997 "Human tumor xenograft models" en Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval; Teicher B (ed) pp 101-25. Humana Press: Totowa NJ). Los ratones desnudos atímicos nu/nu hembra (Charles River, ~22-24 g) se someten a cuarentena y se mantienen (7 días ad libitum de alimento y agua) antes de la manipulación experimental. La prueba comienza por inyecciones en el flanco (s.c.) de células de glioblastoma U87MG humanas confluentes ($\sim 5 \times 10^6$ /por animal en 0,2 ml de medio de cultivo mezclado con Matrigel (BD Biosciences, 1: 1 v/v)) para promover el crecimiento tumoral. Los xenoinjertos se controlan posteriormente hasta que el volumen del tumor alcanza $\sim 300 \text{ mm}^3$, posteriormente los animales se dividen aleatoriamente en grupos de tratamiento (10/grupo) en los que se inicia la dosificación. La terapia de implantación pos-tumor comienza cuando el mAb 12.7 se administra (i.p.) en concentraciones variadas (por ejemplo, 1, 10, 100 μ g/ animal) en un vehículo de solución salina dos veces por semana (q4d) para una duración de dosificación de dos semanas. Los controles de solución salina y IgG4 humana (100 μ g) se dosifican en paralelo. Los animales se sacrifican, 48 horas después de la última dosis, las muestras de tumor y pulmón se recolectan y congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras posteriormente se muelen y lisan para el análisis de fosforilación

de Smad2 por ELISA por medio del uso de anticuerpos contra Smad2 fosforilado o total. La sangre también se recolecta en tubos tratados con EDTA por medio de punción cardíaca. Las muestras de sangre se centrifugan para obtener muestras de plasma (800 rpm, 4°C, 30 min; posteriormente 3000 rpm, 4°C, 10 min), que se almacenan (-80°C) hasta el análisis. Se realiza la comparación estadística de la fosforilación de Smad2 por medio de JMP5.1 (SAS Institute). También se usa un ensayo ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett con un control. Los niveles de fosfo-Smad2 se analizan para evaluar la inhibición específica inducida por el tratamiento con las composiciones de la invención. El nivel de fosfo-Smad2 se normaliza a un Smad total (o proteína total) para minimizar la variación introducida por el tamaño del tejido y la manipulación de la muestra. Los datos del presente modelo de xenoinjerto U87MG muestran una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de Smad2, en consecuencia se demuestra la eficacia de la neutralización in vivo para modular los efectos de TGF- β sobre la proliferación celular. Los datos muestran que una dosis de 10 μ g disminuye la fosforilación de Smad2 en 60% ($p=0,012$), con 72% de inhibición obtenible con dosis de 100 μ g ($p<0,0001$). Además, se observa un 75% de disminución de la fosforilación de Smad2 en tejido pulmonar a una dosis de 100 μ g de una composición de la invención ($p<0,001$). También existe una disminución dependiente de la dosis en los niveles de fosfo-Smad2 (con respecto a los niveles Smad totales (tSmad)) y disminución de los niveles de Fosfo-Smad2 en tejido pulmonar (a la dosis de 100 μ g). Se obtienen datos similares cuando los niveles de fosfo-Smad se normalizan a los niveles de Smad totales o la raíz cuadrado de los niveles de Smad totales (tSmad), de este modo, también indica que el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se correlaciona con la administración de dosis crecientes de una composición de unión de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 La SEQ ID NO: 1 es la cadena madura humana de las secuencias de aminoácidos de TGF- β 1.
 La SEQ ID NO: 2 es la cadena madura humana de las secuencias de aminoácidos de TGF- β 2.
 La SEQ ID NO: 3 es la cadena madura humana de las secuencias de aminoácidos de TGF- β 3.
 La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos de VHCDR1 de un anticuerpo de la invención.
 La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de aminoácidos de VHCDR2 de un anticuerpo de la invención.
- 25 La SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos de VHCDR3 de un anticuerpo de la invención.
 La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos de VLCDR1 de un anticuerpo de la invención.
 La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de aminoácidos de VLCDR2 de un anticuerpo de la invención.
 La SEQ ID NO: 9 es una secuencia de aminoácidos de VLCDR3 de un anticuerpo de la invención.
 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de VHCDR1 de los anticuerpos de la invención.
- 30 La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de VHCDR2 de los anticuerpos de la invención.
 La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de VHCDR23 de los anticuerpos de la invención.
 La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de VLCDR1 os de los anticuerpos de la invención.
 La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de VLCDR2 de los anticuerpos de la invención.
 La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de VLCDR3 de los anticuerpos de la invención.
- 35 La SEQ ID NO: 16 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR1 de HCVR humana.
 La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR2 de HCVR humana.
 La SEQ ID NO: 18 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR3 de HCVR humana.
 La SEQ ID NO: 19 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR4 de HCVR humana.
 La SEQ ID NO: 20 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR1 de LCVR humana.
- 40 La SEQ ID NO: 21 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR2 de LCVR humana.
 La SEQ ID NO: 22 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR3 de LCVR humana.
 SEQ ID NO: 23 es una secuencia de aminoácidos de la estructura FR4 de LCVR humana.
 La SEQ ID NO: 24 es una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada humana.
 La SEQ ID NO: 25 es otra secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada humana.

La SEQ ID NO: 26 es una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena liviana humana.

Las SEQ ID NO: 27-50 son secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana (LCVR) humanizada para anticuerpos particulares de la presente invención.

5 Las SEQ ID NO: 51-75 son secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (HCVR) humanizada para anticuerpos particulares de la presente invención.

Las SEQ ID NO: 76-85 son secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y liviana (HC & LC) humanizadas para los anticuerpo particulares de la presente invención.

Las SEQ ID NO: 86-87 son secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y liviana (HC & LC) humanizadas para los anticuerpo particulares de la presente invención,

10 Las SEQ ID NO: 88,102 son las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada y liviana para los anticuerpos preferidos de la presente invención.

Las SEQ ID NO: 103-112 son las secuencias de ADN que codifican las LCVR y HCVR preferidas de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β o fragmento de unión del mismo, que neutraliza TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 maduro humano, que comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) y una región variable de la cadena liviana (LCVR), en el que dicha HCVR y dicha LCVR consiste en:
 - 5 a) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 64 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:41; o
 - b) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 68 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 43; o
 - 10 c) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45; o
 - d) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ IDNO: 70 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 46; o
 - e) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 74 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID No: 50.
- 15 2. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69 y una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 45.
3. Un fragmento de unión al antígeno monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que el fragmento es un fragmento Fab.
- 20 4. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 81 y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 80.
5. Una composición farmacéutica, que comprende dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.
7. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular de un sujeto que lo necesita.
- 30 8. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular seleccionado de síndrome mielodisplásico (MDS)/trastorno mieloproliferativo (MPD), cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, mieloma múltiple, cáncer colorrectal, leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, y leucemia mielógena aguda.

35

FIG. 1

A. Cadena liviana

3A (SEQ ID NO: 41)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDWFGNSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQNIEDPLTFGGGTKVEIK

12.4 (SEQ ID NO: 43)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDWFGNSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQNIEDPLTFGGGTKVEIK

12.7 (SEQ ID NO: 45)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDYFGNSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQNIEDPLTFGGGTKVEIK

12.8 (SEQ ID NO: 46)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDWYFGNSFMHWYQQKPGKAPKLLIYASNLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQNAEDPLTFGGGTKVEIK

4.17 (SEQ ID NO: 50)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDWFGNSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSG
DFTLTISLQPEDFATYYCQQNAEDPLTFGGGTKVEIK

B. Cadena pesada

3A (SEQ ID NO: 64)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIFPASGSTNYGEMFEGRVTMTT
DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGIGNYALDAMDYWGQGTLLTVSS

12.4 (SEQ ID NO: 68)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIFPALGSTNYGEMFEGRVTMTT
TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGIGNYALDAMDYWGQGTLLTVSS

12.7 (SEQ ID NO: 69)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSEWMNWVRQAPGQGLEWMGQIFPALGSTNYNEMFEGRVTMTT
DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGIGNYALDAMDYWGQGTLLTVSS

12.8 (SEQ ID NO: 70)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIFPALGSTNYNEMFEGRVTMTT
DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGIGNYALDAMDYWGQGTLLTVSS

4.17 (SEQ ID NO: 74)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIFPFGSTNYNEMFEGRVTMTT
DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGIGNYALDAMDYWGQGTLLTVSS

FIG. 2**A. CDR de la cadena liviana**

Nombre	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3A	RASESVDFWGN S FMH (SEQ ID NO: 88)	LASNLES (SEQ ID NO: 89)	QQNIEDPLT (SEQ ID NO: 90)
12.4	RASESVDFWGN S FMH (SEQ ID NO: 91)	LASNLES (SEQ ID NO: 89)	QQNIEDPLT (SEQ ID NO: 90)
12.7	RASESVDFYGN S FMH (SEQ ID NO: 92)	LASNLES (SEQ ID NO: 89)	QQNIEDPLT (SEQ ID NO: 90)
12.8	RASESVDFWYGN S FMH (SEQ ID NO: 93)	YASNLES (SEQ ID NO: 94)	QQNAEDPLT (SEQ ID NO: 95)
4.17	RASESVDFWGN S FMH (SEQ ID NO: 88)	LASNLES (SEQ ID NO: 89)	QQNAEDPLT (SEQ ID NO: 95)

B. CDR de la cadena pesada

Nombre	CDRH1	CDRH2	CDRH3
3A	SYWMN (SEQ ID NO: 96)	QIFPASGSTNYGEMFEG (SEQ ID NO: 97)	GIGNYALDAMDY (SEQ ID NO: 98)
12.4	SYWMN (SEQ ID NO: 96)	QIFPALGSTNYGEMFEG (SEQ ID NO: 99)	GIGNYALDAMDY (SEQ ID NO: 98)
12.7	SEWMN (SEQ ID NO: 100)	QIFPALGSTNYNEMYEG (SEQ ID NO: 101)	GIGNYALDAMDY (SEQ ID NO: 98)
12.8	SYWMN (SEQ ID NO: 96)	QIFPALGSTNYNEMFEG (SEQ ID NO: 101)	GIGNYALDAMDY (SEQ ID NO: 98)
4.17	SYWMN (SEQ ID NO: 96)	QIFPFSGSTNYNEMFEG (SEQ ID NO: 102)	GIGNYALDAMDY (SEQ ID NO: 98)

Fig. 3

12.7- Cadena liviana

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDFYGNSEFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNIEDPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC (SEQ ID NO: 80)

12.7- Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSEWMNWVRQAPGQGLEWMGQIFPALGSTNYNEMYEGRVMTT
 DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGIGNYALDAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDHKPSNTKVD
 KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 81)