

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 292**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005 E 05732737 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 1740615**

54 Título: **Anticuerpos anti-TGF-beta humanizados**

30 Prioridad:

**31.03.2004 US 558290 P**

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

**22.01.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)  
1 DNA WAY  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**ADAMS, CAMELLIA, W.;  
FERRARA, NAPOLEONE;  
FILVAROFF, ELLEN;  
MAO, WEIGUANG;  
PRESTA, LEONARD, G. y  
TEJADA, MAX, L.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 527 292 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-TGF-beta humanizados

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-TGF-beta humanizados y métodos para preparar los mismos y uso de los mismos en métodos para tratar trastornos relacionados con TGF-beta, como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos son útiles, por ejemplo, en purificaciones por inmunoafinidad, inmunoensayos, imágenes *in vivo*, ensayos con radioreceptores, y tratamientos en donde se desea antagonizar la actividad de TGF-beta, particularmente la actividad de TGF-beta1.

Antecedentes de la invención

10 El factor de transformación de crecimiento (TGF-beta) es una citoquina multifuncional citada originalmente por su capacidad para transformar fibroblastos normales en células capaces de crecimiento independiente del anclaje. Las TGF-betas, producidas primariamente por células hematopoyéticas y tumorales pueden regular, esto es, estimular o inhibir, el crecimiento y diferenciación de células a partir de una variedad de orígenes tisulares tanto normales como neoplásicos (Sporn et al., *Science*, 233: 532 (1986)) y estimular la formación y elaboración de diversos elementos estromales. Para una revisión general de la TGF-beta y sus acciones véase Sporn et al., *J. Cell Biol.*, 105: 1039-1045 (1987) y Sporn y Roberts, *Nature*, 332: 217-219 (1988).

20 Se conoce que están involucradas en muchos procesos celulares proliferativos y no proliferativos tales como proliferación y diferenciación celular, desarrollo de embriones, formación de matrices extracelulares, desarrollo óseo, curación de heridas, hematopoyesis y respuestas inmunes e inflamatorias. Pircher et al, *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 136: 30-37 (1986); Wakefield et al., *Growth Factors*, 1: 203-218 (1989); Roberts y Sporn, pp 419-472 in *Handbook of Experimental Pharmacology* eds M.B. Sporn & A.B. Roberts (Springer, Heidelberg, 1990); Massague et al., *Annual Rev. Cell Biol.*, 6: 597-646 (1990); Singer and Clark, *New Eng. J. Med.*, 341: 738-745 (1999). También la TGF-beta es utilizada en tratamiento y prevención de enfermedades en la mucosa intestinal. WO 2001/24813.

25 De interés particular desde un punto de vista inmunológico son las potentes actividades inmunosupresoras de TGF-beta, las cuales incluyen la muerte activada por linfoquina (LAK) e inhibición citotóxica de linfocitos T (CTL) (Ranges et al., *J. Exp. Med.*, 166: 991 (1987), Espevik et al., *J. Immunol.*, 140: 2312 (1988), Grimm et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 27: 53 (1988), Kasid et al., *J. Immunol.*, 141: 690 (1988), Mule et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 26: 95 (1988)), linfopoyesis deprimida de células B y expresión de cadena liviana kappa (Lee et al., *J. Exp. Med.*, 166: 1290 (1987)), regulación negativa de hematopoyesis (Hino et al., *Br. J. Haematol.*, 70: 143 (1988), Sing et al., *Blood*, 72: 1504 (1988)), subregulación de la expresión de HLA-DR en células tumorales (Czarniecki et al., *J. Immunol.*, 140: 4217 (1988), Zuber et al., *Eur. J. Immunol.*, 18: 1623 (1988)), e inhibición de la proliferación de linfocitos B activados por antígenos en respuesta al factor de crecimiento de células B (Petit-Koskas et al., *Eur. J. Immunol.*, 18: 111 (1988)). La observación de que muchos tumores humanos (deMartin et al., *EMBO J.*, 6: 3673 (1987), Kuppner et al., *Int. J. Cancer*, 42: 562 (1988)) y muchas líneas celulares tumorales (Derynck et al., *Cancer Res.*, 47: 707 (1987), Roberts et al., *Br. J. Cancer*, 57:594 (1988)) que producen TGF-beta sugiere un posible mecanismo para que estos tumores evadan la vigilancia inmunológica normal. Esta inmunomodulación negativa, acoplada con las observaciones de que ciertas líneas celulares transformadas han perdido la capacidad de responder a TGF-beta en una forma autocrina (Wakefield et al., *J. Cell Biol.*, 105: 965 (1987), McMahon et al., *Cancer Res.*, 46: 4665 (1986)), y de que la TGF-beta estimula la formación de estromas, y disminuye la vigilancia inmune del tumor, sugiere modelos atractivos para la desregulación y proliferación del neoplasma (Roberts et al., *Br. J. Cancer*, supra).

Además, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 824,297 y 5, 262,319 divulgan un método para inhibir envenenamiento citotóxico de células normales administrándoles una TGF-beta tal como TGF-beta3.

45 Hay al menos cinco formas de TGF-beta identificadas actualmente, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, y TGF-beta5. Se conocen métodos adecuados para purificar esta familia de TGF-betas a partir de diversas especies tales como humanos, ratón, mono verde, cerdo, bovinos, pollos y ranas, y de diversas fuentes corporales tales como hueso, plaquetas, o placenta, para producirla en cultivos celulares recombinantes, y para determinar su actividad. Véase, por ejemplo, Derynck et al., *Nature*, 316: 701-705 (1985); Publicación de Patente Europea Nos. 200,341 publicada el 10 de diciembre de 1986, y 169,016 publicada el 22 de enero de 1986, 268,561 publicada el 25 de mayo de 1988, y 267,463 publicada el 18 de mayo de 1988; Patente de los Estados Unidos No. 4,774,322; Cheifetz et al, *Cell*, 48: 409-415 (1987); Jakowlew et al., *Molecular Endocrin.*, 2: 747-755 (1988); Dijke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 85: 4715-4719 (1988); Derynck et al., *J. Biol. Chem.*, 261: 4377-4379 (1986); Sharples et al., *ADN*, 6:239-244 (1987); Derynck et al., *Nucl. Acids. Res.*, 15: 3188-3189 (1987); Derynck et al., *Nucl. Acids. Res.*, 15: 3187 (1987); Derynck et al., *EMBO J.*, 7: 3737-3743 (1988); Seyedin et al., *J. Biol. Chem.*, 261: 5693-5695 (1986); Madisen et al., *ADN*, 7: 1-8 (1988); y Hanks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 85: 79-82 (1988).

- La forma activada de TGF-beta1 es un homodímero formado por la dimerización de los 112 aminoácidos de terminal carboxi de un precursor de 390 aminoácidos (Derynck et al., Nature, supra). La TGF-beta2 tiene una forma precursora de 414 aminoácidos y también es procesada a homodímero a partir de los 112 aminoácidos de terminal carboxi que comparten aproximadamente 70% de homología con la forma activa de la TGF-beta1 (Marquardt et al., J. Biol. Chem., 262: 12127 (1987)). La TGF-beta2 ha sido purificada a partir de plaquetas de porcinos (Seyedin et al., J. Biol. Chem., 262: 1946-1949 (1987)) y células de glioblastoma humano (Wrann et al., EMBO J., 6:1633 (1987)), y la TGF-beta2 humana recombinante ha sido clonada (deMartin et al., supra). La TGF-beta1 recombinante ha sido clonada (Derynck et al., Nature, supra) y expresada en células de ovario de hámster chino (Gentry et al., Mol. Cell. Biol., 7: 3418-3427 (1987)). Véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4, 774,322; 4, 843,063; y 4, 848,063 con respecto a CIF-A y CIF-B, reconocidos ahora como TGF-beta1 y 2, respectivamente. Ellingsworth et al., J. Biol. Chem., 261: 12362-12367 (1986). Aunque hay 14 diferencias en aminoácidos en los primeros 36 residuos de aminoácidos de las 2 formas (TGF-beta1 y TGF-beta2) sus actividades biológicas son similares. Cheifetz et al., Cell, 48: 409-415 (1987); Seyedin et al., J. Biol. Chem., 262: supra.
- Las TGF-beta3, TGF-beta4 y TGF-beta5, las cuales son las formas más recientemente descubiertas de TGF-beta, fueron identificadas por selección de bibliotecas de ADNc. Ninguna de estas tres proteínas putativas ha sido aislada de fuentes naturales, aunque la inmunoprecipitación Northern demuestra la expresión de los correspondientes ARNm. La TGF-beta3 humana y porcina ha sido clonada y esta descrita como homodímeros y expresada en células de ovario de hámster chino (Derynck et al., EMBO J., 7: 3737-3743 (1988), ten Dijke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4715 (1988); Patente de los Estados Unidos No. 4, 886,747). Véase también la WO 1992/00318 con respecto a las proteínas TGF-beta3 y anticuerpos para las mismas. La TGF-beta1 difiere de la TGF-beta2 por 27 cambios principalmente conservadores y de la TGF-beta3 por 22 cambios principalmente conservadores. Estas diferencias han sido relacionadas con la estructura 3D. Schlunegger y Grutter, Nature, 358: 430-434 (1992).
- Las TGF-beta4 y TGF-beta5 fueron clonadas a partir de una biblioteca de ADNc de condrocitos de pollo (Jakowlew et al., Molec. Endocrinol., 2: 1186-1195 (1988)) y a partir de una biblioteca de ADNc de oocitos de rana, respectivamente. La biblioteca de ADNc de oocitos de rana puede ser seleccionada utilizando una sonda derivada de una o más secuencias de otro tipo de TGF-beta. El ARNm de TGF-beta4 es detectable en condrocitos de embrión de pollo, pero es bastante menos abundante que el ARNm de TGF-beta3 en embriones en desarrollo o en fibroblastos de embriones de pollo. El ARNm de TGF-beta5 es expresado en embriones de pollo más allá del estado de neurula y en células de renacuajo *Xenopus* (XTC).
- La producción recombinante de TGF-beta1, TGF-beta2 y TGF-beta3 está descrita en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 061,786; 5, 268,455 y 5, 801,231. Véase también la Patente de los Estados Unidos No. 5, 120,535 sobre una TGF-beta2 usada para tratar carcinoma con respuesta hormonal y para la producción de anticuerpos. El heterodímero de TGF-beta1 y TGF-beta2 denominado TGF-beta1.2, ha sido identificado y sus usos demostrados, como se divulga en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4, 931,548 y 5, 304,541, la última también divulgando un anticuerpo del mismo. La WO 1990/00900, presentada el 20 de julio de 1989, divulga el tratamiento de trastornos inflamatorios con TGF-beta1 y TGF-beta 2 homodiméricas, y del heterodímero TGF-beta1.2. La Patente de los Estados Unidos No. 5, 462,925 divulga un heterodímero de TGF-beta2 y TGF-beta3. La Patente de los Estados Unidos No. 5, 780,436 divulga imitadores peptídicos pequeños de TGF-beta.
- Niveles incrementados de actividad de TGF-beta están involucrados en un gran número de condiciones patológicas, incluyendo, pero no limitándose a las siguientes: (i) fibrosis, formación de cicatrices y adhesión durante la curación de heridas; (ii) enfermedades fibróticas de los pulmones, hígado y riñones; (iii) aterosclerosis y arterioesclerosis; (iv) ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de la próstata, tumores neuroendocrinos del sistema digestivo, cáncer de cervix, glioblastomas, y cáncer gástrico; (v) angipatía, vasculopatía, nefropatía; (vi) esclerosis sistémica; (vii) infecciones virales tales como hepatitis C y VIH; y (viii) trastornos inmunológicos e inflamatorios y deficiencias tales como artritis reumatoide. La modulación de respuestas inmunes e inflamatorias por TGF-betas incluyen: (i) inhibición de la proliferación de todos los subconjuntos de células T; (ii) efectos inhibidores sobre la proliferación y funcionamiento de linfocitos B; (iii) subregulación de la actividad de muerte celular natural y de la respuesta a células T; (iv) regulación de la producción de citoquina por células inmunes; (v) regulación de la función de los macrófagos; (vi) reclutamiento y activación de leucocitos.
- En cuanto tiene que ver con el cáncer específicamente, los miembros de la familia de TGF-beta son conocidos por tener un número de actividades biológicas relacionadas con la tumorigénesis (incluyendo angiogénesis) y metástasis. La TGF-beta inhibe la proliferación de muchos tipos de células incluyendo células endoteliales capilares y células de músculos lisos. La TGF-beta subregula la expresión de integrina (alfa1beta1, alfa2beta1 y alfavbeta3 involucrados en la migración celular endotelial). Las integrinas están involucradas en la migración de todas las células, incluyendo las metastásicas. La TGF-beta subregula la expresión de la matriz de metaloproteínas necesaria tanto angiogénesis como metástasis. La TGF-beta induce el inhibidor activador de plasminógeno el cual inhibe una cascada de proteínas necesarias para la angiogénesis y metástasis. La TGF-beta induce que las células normales inhiban las células transformadas. Véase, por ejemplo, Yingling et al., Nature Reviews, 3 (12): 1011-1022 (2004), la cual divulga que la desregulación de TGF-beta ha sido implicada en la patogénesis de una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer y fibrosis, y presenta razones para evaluar los inhibidores de señalización de TGF-beta como agentes terapéuticos contra el cáncer, biomarcadores/diagnósticos, las estructuras de inhibidores de

moléculas pequeñas que están en desarrollo, y el modelo de descubrimiento de fármacos direccionados que está siendo aplicado a su desarrollo. La detección temprana del cáncer es muy importante (Ruth et al., *Nature Reviews Cancer*, 3: 243-252 (2003)), y la patogénesis de la metástasis del cáncer está siendo estudiada. Fidler, *Nature Reviews Cancer*, 3: 453-458 (2003).

5 La TGF-beta ha emergido como un modulador principal de la angiogénesis regulando la proliferación de células endoteliales, migración, metabolismo de la matriz extracelular (ECM), y la expresión de moléculas de adhesión. Es un potente inhibidor del crecimiento de células epiteliales mamarias normales y de un número de líneas celulares de cáncer de seno. La TGF-beta parece ejercer efectos pleiotrópicos en la oncogénesis de cánceres de seno en una forma contextual, esto es, suprime la tumorigénesis en una etapa temprana por inhibición directa de la angiogénesis y del crecimiento de las células tumorales. Sin embargo, la sobreproducción de TGF-beta por un tumor avanzado puede acelerar la progresión de la enfermedad a través de la estimulación indirecta de la angiogénesis y la supresión inmune. El antígeno CD105 de la membrana celular (endogлина) ciega la TGF-beta1 y TGF-beta3 y se expresa preferencialmente en células endoteliales vasculares angiogénicas. La reducción de los niveles de CD105 en HUVEC lleva a la inhibición de la angiogénesis *in vitro* y a la mortalidad celular masiva en la presencia de TGF-beta1. Ratones nulos en CD105 mueren *in utero* con vasculatura mejorada, indicando el papel de pivote de CD105 en el desarrollo vascular. Li et al., *Microsc. Res. Tech.*, 52: 437-449 (2001). La angiogénesis anormal pero el potencial hematopoyético intacto han sido observados en ratones deficientes en el receptor tipo I de TGF-beta. Larsson et al., *EMBO J.*, 20 (7): 1663-1673 (2001). Adicionalmente, la deficiencia en el receptor tipo II de TGF-beta dio como resultado defectos en hematopoyesis y vasculogénesis sac en yema. Oshima et al., *Developmental Biology*, 179 (1): 297-302 (1996). También, se observaron defectos en corazón e hígado y una sensibilidad disminuida al factor beta 2 de crecimiento con transformación en embriones deficientes en el receptor tipo III de TGF-beta. Stenvers et al., *Mol. Cell. Biol.*, 23 (12): 4371-4385 (2003). Adicionalmente, una perturbación direccionada del gen TGF-beta1 de ratón dio como resultado una enfermedad inflamatoria multifocal. Shull et al., *Nature*, 359 (6397): 693-699 (1992). La aparición temprana de la inflamación multifocal en el ratón nulo en TGF-beta1 se encontró mediada por linfocitos. Diebold et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 92 (26): 12215-12219 (1995).

La función no proliferativa más importante de las TGF-betas es el potenciamiento de la formación de matrices extracelulares. Aunque esto se logra primariamente a través de la transcripción incrementada tanto de colágeno como de fibronectina, la inhibición de las proteasas de la degradación de la matriz también contribuyen a su estabilidad. La degradación de la matriz extracelular es inhibida por el descenso en la secreción de las proteasas mismas y el incremento simultáneo en los niveles de inhibidores de proteasa.

La WO 1984/001106 describe la TGF-beta1 y su uso para la promoción de proliferación celular y reparación de tejidos, curación de heridas y tratamiento de traumas. La Patente de los Estados Unidos No. 4,806.523 divulga que tanto la TGF-beta1 como la TGF-beta2 poseen actividad antiinflamatoria y son inhibidores de la proliferación de células T estimulada por mitógenos y de la activación de células B. También reporta que la TGF-beta está localizada en centros de hematopoyesis y linfopoyesis y que la TGF-beta puede, por lo tanto, ser útil para el tratamiento de indicaciones asociadas con el mal funcionamiento o disfunción de la hematopoyesis o linfopoyesis.

La TGF-beta2 ha demostrado ser la isoforma predominante de TGF-beta en la retina neural, pigmento retinal corioide del epitelio y vítreo del ojo humano (Pfeffer et al., *Exp. Eye Res.*, 59: 323-333 (1994)) y se ha encontrado en el humor acuoso en humanos en especímenes de ojos que sufren extracción de cataratas con implantación de lentes intraoculares. Jampel et al., *Current Eye Research*, 9: 963-969 (1990). Las células epiteliales de pigmento retinal humano no transformadas secretan predominantemente TGF-beta2. Kvant, *Ophthalmic Res.*, 26: 361-367 (1994).

Otras enfermedades que tienen potencial para el tratamiento con anticuerpos contra TGF-beta incluyen el síndrome de distensión respiratoria en adultos, cirrosis del hígado, infarto postmiocardio, restenosis postangioplastia, cicatrices queloides y escleroderma. El nivel incrementado de expresión de TGF-beta2 en la osteoporosis (Erlenbacher et al. *J. Cell Biol.*, 132: 195-210 (1996)) significa que esta es una enfermedad potencialmente tratable por anticuerpos dirigidos contra TGF-beta2.

Debido al involucramiento de la TGF-beta en un gran número de condiciones patológicas serias, hay un interés considerable en desarrollar inhibidores de TGF-beta. Muchas de las propuestas de inhibidores de TGF-beta han involucrado anticuerpos.

50 Es una tarea exigente aislar un fragmento de anticuerpo específico para TGF-beta de las mismas especies. Los animales normalmente no producen anticuerpos para autoantígenos, un fenómeno llamado tolerancia (Nossal, *Science*, 245: 147-153 (1989)). En general, la vacuna con un autoantígeno no da como resultado la producción de anticuerpos circulantes. Por lo tanto es difícil elevar los anticuerpos humanos a autoantígenos humanos. Hay también, además, problemas éticos en vacunar humanos. En relación con la elevación de anticuerpos no humanos específicos para TGF-beta, hay un cierto número de problemas. La TGF-beta es una molécula inmunosupresora y adicionalmente hay una fuerte conservación de secuencia entre moléculas de TGF-beta humanas y de ratón. La TGF-beta de ratón y humano difiere solamente en un residuo de aminoácido, un cambio de alanina (humano) a serina (ratón) en un residuo sepultado. Derynck et al., *J. Biol. Chem.*, 261: 4377-4379 (1986). La TGF-beta2 de ratón y humano difiere solamente en tres residuos; residuo 59 (ratón T, humano S); residuo 60 (ratón K, humano R); y

residuo 94 (ratón N; humano K). Esto hace difícil lograr anticuerpos en ratones contra TGF-beta humano. Adicionalmente, cualquier anticuerpo elevado puede ser dirigido solamente contra un conjunto restringido de epítomos.

5 Se han producido anticuerpos monoclonales contra TGF-beta inmunizando pollos e inmortalizando células B, utilizados, por ejemplo para diagnóstico y tratamiento pasivo de enfermedades como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6.143,559.

10 Los anticuerpo policlonales que se enlazan a TGF-beta humano y TGF-beta2 humano contra epítomos tanto de neutralización como no neutralización han sido conseguidos en conejos (Danielpour et al., *Growth Factors*, 2: 61-71 (1989); Roberts et al. *Growth Factors*, 3: 277-286 (1990)), pollos (R&D Systems, Minneapolis) y pavos (Danielpour et al., *J. Cell Physiol.*, 138: 79-86 (1989); Danielpour y Sporn, *J. Cell Biochem.*, 13B: 84 (1989).

15 Los péptidos que representan secuencias parciales o completas de TGF-beta también han sido utilizados como inmunógenos para elevar antisueros policlonales neutralizantes en conejos. Ellingsworth et al., *Cell. IMMunol.*, 114:41 (1988); Border et al. *Nature*, 346: 371-374 (1990); Flanders, *Biochemistry* 27: 739-746 (1988); Flanders et al., *Growth Factors*, 3: 45-52 (1990); Flanders et al., *Development*, 113: 183-191 (1991). Además, ha habido reportes limitados de aislamiento de anticuerpos monoclonales de ratón contra TGF-beta. Después de la inmunización con TGF-beta2 bovino (idéntico a la TGF-beta2 humana), se aislaron tres anticuerpos monoclonales no neutralizantes que son específicos para TGF-beta2 y un anticuerpo neutralizante que es específico para TGF-beta1 y TGF-beta2. Dasch et al., *J. Immunol.*, 142: 1536-1541 (1989). En otro reporte, después de la inmunización con TGF-beta1, se aislaron anticuerpos neutralizantes que fueron bien sea específicos para TGF-beta1 o que tuvieron reacción cruzada con TGF-beta1, TGF-beta2 y TGF-beta3. Lucas et. al., *J. Immunol.*, 145: 1415-1422 (1990). Antisueros policlonales para TGF-beta de humano y porcino (Keski-Oja et al., *Cancer Res.*, 47: 6451-6458 (1987) y TGF-beta2 porcino (Rosa et al., *Science*, 239: 783-785 (1988)) han demostrado neutralizar la actividad biológica de TGF-beta1 y TGF-beta2, respectivamente. El suero anti-TGF-beta de conejo está descrito en Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4167-4171 (1986). Además, se han establecido RIA contra TGF-beta1 utilizando antisuero de conejo para cuantificar la proteína liberada durante la agregación de plaquetas. Assoian y Sporn, *J. Cell Biol.*, 102: 12178-1223 (1986).

25 Un anticuerpo monoclonal de ratón neutralizante que enlaza las isoformas tanto TGF-beta2 y TGF-beta3 está disponible comercialmente de Genzyme Diagnostics. Un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra TGF-beta1 humana está disponible de R&D Systems. El anticuerpo solamente neutraliza débilmente la TGF-beta1 en un ensayo de neutralización. Los anticuerpos monoclonales de ratón neutralizantes también han sido generados a partir de ratones inmunizados con péptidos de TGF-beta1 humanos que comprenden posiciones de aminoácidos 48 a 60 (anticuerpo reactivo con TGF-beta1, TGF-beta2 y TGF-beta3) y posiciones de aminoácidos 86 a 101 (anticuerpo específico para TGF-beta1). Hofer y Anderer, *Cancer Immunol. Immunother.*, 41: 302-308 (1995).

30 La tecnología de anticuerpos fago (WO 1992/01047; WO 1993/19172; WO 1992/20791; WO 1993/06213; y WO 1993/11236) ofrece la capacidad de aislar directamente anticuerpos humanos contra TGF-beta humano. Ha sido descrito el aislamiento de anti-autoanticuerpos de repertorios de segmentos de anticuerpos desplegados en el fago. Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Nissim et al, *EMBO J.* 13: 692-698 (1994); Griffiths et al 13: 3245-3260 (1994); Barbas et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10003-10007 (1993/11236). Además, Tempest et al., *Immunotechnology*, 2: 306 (1996) describe anticuerpos humanos específicos para TGF-beta humana derivados de bibliotecas de despliegue de fagos.

35 La WO 1997/13844 divulga el aislamiento de anticuerpos humanos específicos para TGF-beta1 humana y anticuerpos humanos específicos para TGB-beta2 humana. Describe anticuerpo con el dominio 31G9 VH y variantes del dominio, más específicamente, el anticuerpo CS37 que comprende el dominio 31G9 VH junto con el CS37 VL y variantes de este dominio, incluyendo anticuerpos que: (i) compiten en ELISA con CS37 para el enlazamiento a TGF-beta1, (ii) enlazante TGF-beta1 preferencialmente con respecto a TGF-beta3, y (iii) neutralizante TGF-beta1.

40 La Patente de los Estados Unidos No. 6, 492,497 (también publicada como US 2003/064069 A1) está basada en la identificación de anticuerpos que están relacionados con CS37, pero tiene propiedades ventajosas inesperadas con respecto al enlazamiento y neutralización de TGF-beta1. Estos no se enlazan a, ni neutralizan, TGF-beta2 o TGF-beta3. El epítomo para estos anticuerpos yace en la región C-terminal de TGF-beta1 (residuos 83 - 112) e incluye el bucle consistente de los residuos 92 - 98 de TGF-beta1, también conocido como dedo 2, una región que ha sido identificada como interactuante con el receptor de TGF-beta.

45 Un anticuerpo monoclonal contra TGF-beta1 humana que es altamente específica y puede ser utilizada para diagnóstico de tumores y para cromatografía de afinidades esta divulgada en la JP 95068278 B2 publicada el 26 de julio de 1995.

50 El uso de TGF-beta y sus antagonistas para modular la presión sanguínea, y para tratar hipertensión e hipotensión, respectivamente, está divulgada en WO 1991/19513.

- La WO 1991/15223 divulga un factor de supresión de explosión respiratoria purificado que puede ser incubado con anticuerpo anti-TGF-beta de pavo que enlaza específicamente a TGF-beta1. El anticuerpo neutralizo completamente la actividad de TGF-beta1 en macrófagos activados, pero no tuvo efectos sobre la actividad del factor de supresión de explosión respiratoria en los macrófagos.
- 5 La supresión de la actividad de TGF-beta y la acumulación en matriz extracelular en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades fibróticas tales como glomerulonefritis por contacto con el supresor de la actividad productora de ECM, tal como el anticuerpo anti-TGF-beta, está divulgado en WO 1991/04748 y WO 1993/10808. Se divulgan también los anticuerpos contra un péptido lineal de TGF-beta y células que producen los anticuerpos.
- 10 La Patente de los Estados Unidos No. 5, 888,705 divulga un método para inducir la proliferación de células pancreáticas adultas humanas o la diferenciación de las mismas poniendo en contacto cultivos primarios de tales células con el factor de crecimiento de hepatocitos solos o en combinación con anticuerpos anti-TGF-beta.
- La WO 2001/66140 divulga el uso de antagonistas de TGF-beta tales como anticuerpos para tratar o evitar la pérdida de función renal.
- 15 La WO 2000/40227 divulga métodos para tratar condiciones asociadas con la acumulación de matriz extracelular en exceso utilizando agentes que inhiben la TGF-beta tales como anticuerpos.
- Los anticuerpos para TGF-beta son divulgados como mejoradores de la apoptosis tubular en la obstrucción unilateral de la uretra, en Miyajima et al., *Kidney International*, 58: 2301-2313 (2000).
- 20 La prevención a largo plazo de la insuficiencia renal, expresión excesiva del gen de matriz, y expansión de matriz mesangial glomerular por tratamiento con anticuerpo anti-TGF-beta monoclonal en ratones db/db diabéticos está divulgada en Ziyadeh et al., *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 97 (14): 8015-8020 (2000).
- 25 La producción de un tratamiento favorable con anticuerpos anti-TGF-beta neutralizantes en enfermedad renal diabética experimental está divulgada en Han y Ziyadeh, *Peritoneal dialysis International*, 19 Suppl 2: S234-237 (1999). La TGF-beta fue encontrada como un mediador clave en hiperglicemia y en enfermedad diabética de riñón. Sharma y Ziyadeh, *Diabetes*, 44 (10) p 1139-46 (1995). El uso de TGB-beta en nefropatías diabéticas está divulgado en Border et al., *Diabetes Metab. Rev.*, 12/4: 309-339 (1996).
- La Patente de los Estados Unidos No. 5, 662,904 describe una composición para el uso en el tratamiento de heridas para inhibir la formación de tejidos cicatrizados. Un ejemplo de tal composición tiene un anticuerpo neutralizador del factor de crecimiento, tales como los anticuerpos para TGF-beta1, TGF-beta2 y PDGF.
- 30 La Patente de los Estados Unidos No. 5,972,335 divulga composiciones que comprenden al menos dos anticuerpos para uso en la promoción de la curación de heridas de trastornos fibróticos, en donde el primer anticuerpo es específico para un epítipo individual sobre TGF-beta1 y el segundo anticuerpo es específico para un epítipo individual en TGF-beta2.
- La Patente de los Estados Unidos No. 5, 958,411 divulga métodos para tratar una patología de CNS administrando anticuerpos anti-TGF-beta neutralizantes.
- 35 La Patente de los Estados Unidos No. 5, 616,561 describe un método para tratar daños en tejidos causados por radiación utilizando un antagonista de TGF-beta tal como anticuerpos.
- La Patente de los Estados Unidos No. 6, 500,920 divulga un péptido de 10 - 25 aminoácidos que comprende los aminoácidos 49 - 58 de una TGF-beta2, en donde el péptido es capaz de inhibir el enlazamiento específico de una TGF-beta a un receptor de TGF-beta en una célula.
- 40 La Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2002/0176858 y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,693,607; 6,419,928; 6,090,383; 5,783,185; 5,772,998; y 5,571,714, así como la EP 489,062; 557,418 y 669,833, así como las WO 1992/08480; 1994/09815 y 1994/18991 divulgan anticuerpos monoclonales para TGF-beta, incluyendo los que neutralizan la actividad de TGF-beta1 y TGF-beta2, y su uso en aplicaciones terapéuticas para tratar indicaciones en donde hay una sobreproducción de TGF-beta (por ejemplo lesión aguda del hígado, fibrosis pulmonar intersticial, cirrosis del hígado, fibrosis hepática crónica y trastornos fibróticos de la piel tales como escleroderma) para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades malignas (por ejemplo, sarcomas y melanomas) y cánceres metastásico.
- 45
- 50 Nuevos anticuerpos para el tratamiento de trastornos asociados con TGF-beta3, por ejemplo osteoporosis, sida, cáncer, etc., están divulgados en WO 1992/00330 y la Patente de los Estados Unidos No. 5, 262,319. Tales anticuerpos se enlazan a TGF-beta3 humana y no exhiben reactividad cruzada con TGF-beta1 y beta2.

La Patente de los Estados Unidos No. 6, 509,318 divulga una familia de péptidos pequeños que se ha encontrado como inhibidora de la actividad de TGF-beta para usos tales como inhibición de tejidos de cicatrización durante la curación de heridas.

5 El uso de un compuesto (por ejemplo un anticuerpo) que pueda inhibir la actividad biológica de TGF-beta sobre neuronas predeterioradas para el tratamiento de trastornos cerebrales, por ejemplo isquemia cerebral, está divulgado en la WO 2000/13705.

10 Un anticuerpo monoclonal que reconoce todas las tres isoformas de TGF-beta que puede inhibir la actividad biológica de TGF-beta sobre neuronas predeterioradas, útil para el tratamiento de trastornos cerebrales, está divulgado en WO 2000/54804. Tal anticuerpo fue utilizado para neutralizar TGF-beta endógena durante el principal periodo de muerte celular ontogénica de ganglios ciliares (CG) y ganglios de raíz dorsal (DRG) así como motoneuronas espinales en embriones de pollo.

El diagnóstico y predicción de la probabilidad de desarrollo de un cáncer de seno sensible a tamoxifen o resistente a tamoxifen utilizando un anticuerpo específico a factores o receptores angiogénicos, tales como un anticuerpo específico para TGF-beta3, está divulgado en WO 2000/34788.

15 La EP 945464 B1 divulga miembros de enlazamiento específicos para TGF-beta humana, esto es, miembros de enlazamiento específicos que comprenden dominios de enlazamiento anticuerpo-antígeno humanos para TGF-beta humana que enlazan específicamente las isoformas TGF-beta2 y TGF-beta1, o ambas, comparadas preferencialmente con TGF-beta3. Los miembros de enlazamiento específico pueden ser aislados y utilizados en el tratamiento de enfermedades particularmente enfermedades fibróticas y también enfermedades inmunes/inflamatorias.

20 Los anticuerpos contra TGF-beta han demostrado ser efectivos en el tratamiento de glomerulonefritis (Border et al., Diabetes Metab. Rev., supra); cicatrización neural (Logan et al., Eur. J. Neurosci., 6: 355-363 (1994); WO 1993/19783); cicatrización dérmica (Shah et al., Lancet, 339: 213-214 (1992); Shah et al., J. Cell Science, 107: 1137-1157 (1994); Shah et al., J. Cell Science, 985-1002 (1995); WO1992/17206); fibrosis pulmonar (Giri et al., Thorax, 48: 959-966 (1993)); lesión arterial (Wolf et al., J. Clin. Invest., 93: 1172-1178 (1994)); y artritis reumatoide (Wahl et al., J. Exp. Medicine, 177: 225-230 (1993)). Se ha sugerido que la TGF-beta3 actúa de manera antagonica con TGF-beta 1 y TGF-beta2 en cicatrización dérmica (Shah et al., 1995 supra).

25 Arteaga et al., J. Clin. Invest., 92: 2569-2576 (1993) divulga que los anticuerpos anti TGF-beta inhiben la tumorigenicidad de células de cáncer de seno e incrementan la actividad de células asesinas naturales de bazo de ratón.

30 Los agentes antifibróticos para curación de heridas y tratamiento de trastornos fibróticos, incluyendo anti-TGF-beta están descritos en WO 1993/19769.

Las secuencias específicas de la anti-TGF-beta2 están descritas en EP 853,661 B1.

35 Otras aplicaciones en donde los anticuerpos contra TGF-beta han demostrado ser prometedores en cuanto a eficacia terapéutica incluyen el uso de anticuerpos contra TGF-beta para el tratamiento de enfermedades oculares que involucran fibrosis ocular, incluyendo retinopatía proliferativa (Pena et al., Invest. Ophthalmology. Vis. Sci., 35: 2804-2808 (1994)), prevención de cataratas (WO 1995/13827), desprendimiento de retina, y cirugía de drenaje postglaucoma (Khaw et al., Eye, 8: 188-195 (1994)). Connor et al., J. Clin. Invest., 83: 1661-1666 (1989) demostraron que niveles mucho más altos de TGF-beta2 estaban presentes en aspirados vítreos de pacientes con fibrosis intraocular asociada con retinopatía proliferativa en comparación con pacientes con desprendimiento de retina no complicado sin fibrosis ocular y que la actividad biológica de esta TGF-beta2 podría ser neutralizada con anticuerpos dirigidos contra TGF-beta2.

40 El uso de anticuerpos contra TGF-beta para el tratamiento de enfermedades ha sido el objetivo de solicitudes de patente para enfermedades fibróticas (WO 1991/O4748); enfermedades por deficiencia de macrófagos (WO 1993/14782); infecciones patógenicas de macrófagos (WO 1993/17708; Patente de los Estados Unidos No. 5, 730,976); y trastornos vasculares (WO 1993/21945).

Una composición de células madre tratada con anticuerpo de TGF-beta capaz de sobrevivir durante 14 días *in vitro* o *ex vivo*, y una repoblación del sistema hematopoyético *in vivo* rápida están descritos en WO 2000/43499.

50 Scrip 2580 p 14, 04 de octubre de 2000 reportó que la Cambridge Antibody Technology (CAT) y Genzyme estuvieron trabajando juntos para desarrollar anticuerpos monoclonales humanos contra TGF-beta. Las CAT tuvo dos anticuerpos TGF-beta completamente humano, CAT-152 y CAT-192, y Genzyme tuvo uno de 11, un anticuerpo monoclonal panespecifico de ratón que neutraliza TGF-beta1, TGF-beta2 y TGF-beta3 y está siendo evaluado como una terapia potencial para escleroderma difusa. La CAT estaba a punto de desarrollar un análogo humano de uno de 11 usando su tecnología de despliegue de fagos. Varias otras indicaciones clínicas para tratamiento anti TGF-beta,

incluyendo indicaciones oftálmicas, cicatrización postquirúrgica, fibrosis de órganos principales, tales como los pulmones, riñones e hígado, y ciertos cánceres, también serán considerados así como el tratamiento de tumores cerebrales malignos inhibiendo el crecimiento de TGF-beta2. El CAT-152 (anti-TGF-beta2) está en ensayos Fase II para prevenir la cicatrización postoperatoria en pacientes que sufren cirugía para glaucoma, y el CAT-192 (anti-TGF-beta1) ha completado los ensayos de Fase I. Véase también "Trends in Antibody Research: The Monoclonal Elite" by Tim Searle, Bioventure-View 1510 p14, october 1, 2000.

Un método para cuantificar TGF-beta utilizando anticuerpo anti-TGF-beta está divulgado en WO 1995/19987. Un nuevo ensayo para determinar TGF-beta activo en una muestra utilizando células eucariotas que contienen un vector de expresión con respuesta a TGF-beta está descrito en WO 2000/00641. Este ensayo incluye uno para la determinación de niveles de isoformas de TGF-beta en una muestra, en donde las criosecciones son preincubadas con anticuerpos que neutralizan las isoformas anti-TGF-beta. Los inmunoensayos con TGF-beta utilizando anticuerpos TGF-beta están descritos, por ejemplo, en JP 2126157 y JP 92041307 B publicados el 7 de julio de 1992.

Darland y D'Amore, J.Clin. Invest., 103: 157-158 (1999) divulgan que el desarrollo de vasos procede de una etapa de dependencia del factor de crecimiento en donde la pérdida de un factor de supervivencia lleva a la apoptosis. La estabilización de los vasos está marcada por inversión con células murales, activación local de TGF-beta y producción de membrana basal. Plantea varias preguntas con respecto a cuál es el papel de los factores de crecimiento en la vascularización en adultos, incluyendo VEGF y TGF-beta. Benjamin et al., J. Clin. Invest., 103: 159-165 (1999) divulga la ablación selectiva de vasos sanguíneos inmaduros en tumores humanos establecidos después del retiro de VEGF.

Los métodos para hacer anticuerpos quiméricos y humanizados están descritos en, y otras referencias en esta área incluyen, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,235,883 sobre anticuerpos monoclonales completamente humanos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano; la EP 184187 sobre un anticuerpo quimérico ratón-humano; la EP 844306 sobre un método para hacer anticuerpos de manera recombinante utilizando tecnología de fagos; la Patente de los Estados Unidos No. 5,859,205 sobre la preparación de anticuerpos injertados en CDR, preferiblemente anticuerpos humanizados, que tienen donantes no humanos y marcos aceptadores humanos, EP 120,694; EP 125,023; EP 171,496; EP 173,494; EP 239,400; WO 1989/07452; WO 1990/07861; y WO 1986/01533 sobre técnicas de humanización; la Solicitud de los Estados Unidos No. 2003/0039649 sobre anticuerpos superhumanizados; la Solicitud de los Estados Unidos No. 200370039645 sobre anticuerpos humanizados con especificidad por TNF-alfa humana; la EP 239,400 sobre anticuerpos recombinantes y su producción; la WO 1991/09967 sobre anticuerpos humanizados; la WO 1992/01047 sobre producción de anticuerpos; la WO 1992/22653 sobre métodos para hacer anticuerpos humanizados; la WO 1993/11161 sobre proteínas de enlazamiento de antígenos multivalentes; la WO 1994/13804 sobre proteínas de enlazamiento de antígenos multivalentes; la WO 2000/66631 sobre miembros de enlazamiento específicos para TGF-beta; y Henry "Special Delivery: Alternative methods for delivering drugs improve performance, convenience, and patient compliance." C&EN, p. 49-65 (2000). Véanse también las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,140,471 y 5,969,108 y 5,872,215 y 5,871,907 y 5,858,657 y 5,837,242 y 5,733,743; EP 1,024,191; EP 774,511; WO 1997/13844; EP 656,941 y 605,522 y WO 1994/13804; EP 589,877; EP 585,287; WO 1993/19172; EP 540,586; WO 1993/06213; WO 1992/20791; WO 1992/01787; y WO 1992/01047. Adicionalmente, la WO 2004/065417 divulga diversas alteraciones a anticuerpos y fragmentos de enlazamiento a antígenos para mejorar el rendimiento. Véase también la US 20050049403.

Hay necesidad de controlar las moléculas de TGF-beta para evitar sus efectos nocivos en enfermedades tales como las citadas anteriormente. También hay necesidad de proveer anticuerpos monoclonales de alta afinidad que se enlacen a TGF-beta específicamente y neutralicen la actividad de TGF-beta de tal manera que actúen como antagonistas de TGF-beta. La pérdida aparente de regulación de TGF-beta por células neoplásicas acoplada con la supresión de la función inmune y la formación de estromas inducida por TGF-beta hace que la intervención potencial con antagonistas de TGF-beta una opción atractiva para la terapia contra el cáncer. Además, los anticuerpos de TGF-beta son útiles en ensayos de diagnóstico y purificación por inmunoafinidad.

#### Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención provee un anticuerpo humanizado que enlaza una TGF-beta que comprende un dominio pesado variable ( $V_H$ ) que comprende residuos de región hipervariable no humanos incorporados en un dominio  $V_H$  humano, comprendiendo dicho dominio variable una sustitución de región marco (FR) en SEQ ID NO: 6 en una posición seleccionada del grupo consistente de 48, 49, 68, 70, 72, 74 y 79 utilizando el sistema de numeración definido en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo incluye un anticuerpo intacto IgG1 o un fragmento de anticuerpo tal como un Fab.

Preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones FR en las posiciones 49, 68 y 72 en donde más preferiblemente en la posición 49 la alanina se cambia a una glicina, en la posición 68 la fenilalanina es cambiada por una alanina, y en la posición 72 la arginina es cambiada por una alanina.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones FR en las posiciones 48, 49 y 72, en donde más preferiblemente en la posición 48 la valina es cambiada por isoleucina, en la posición 49 la alanina es cambiada por una glicina, y en la posición 72 la arginina es cambiada por una alanina.

5 También preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones FR en las posiciones 49, 70 y 72, en donde más preferiblemente en la posición 49 la alanina es cambiada por una glicina, en la posición 70 la isoleucina es cambiada por una leucina, y en la posición 72 la arginina es cambiada por una alanina. En otro aspecto, una sustitución FR adicional es en la posición 74 más preferiblemente en donde en la posición 74 la asparagina es cambiada por una lisina.

10 En aún otra realización preferida, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones FR en las posiciones 49, 72 y 74, en donde más preferiblemente en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina, y en la posición 74 la asparagina es cambiada a una lisina.

En todavía aún otra realización preferida, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones FR en las posiciones 49, 72 y 79, en donde más preferiblemente en la posición 49 la alanina es cambiada por una glicina, en la posición 72 la arginina es cambiada por una alanina, y en la posición 79 la leucina es cambiada por una alanina.

15 Cualquiera de los anticuerpos anteriores comprende residuos RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO: 18) de región determinante de la complementariedad (CDR) de dominio liviano variable (V<sub>L</sub>); WASTRES (SEQ ID NO: 19); y HQYLSSDT (SEQ ID NO: 20). En otra realización preferida, cualquiera de los anticuerpos anteriores comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) de dominio V<sub>H</sub> GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 21), VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 22), o VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 43); y SGGFYFDY (SEQ ID NO: 23).

También, la invención provee cualquiera de los anticuerpos anteriores conjugados con un agente citotóxico, o no conjugados así. Además, la invención provee una composición que comprende tales anticuerpos y un vehículo.

En una realización adicional, la invención provee un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado, un vector que comprende tal ácido nucleico, y una célula anfitriona que comprende tal ácido nucleico.

25 Adicionalmente, la invención provee un proceso para producir un anticuerpo humanizado que comprende cultivar la célula anfitriona que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de tal manera que el ácido nucleico es expresado y el anticuerpo es producido, y preferiblemente recuperado del cultivo de la célula anfitriona, más preferiblemente a partir del medio de cultivo de la célula anfitriona. También, la célula anfitriona puede ser cotransfectada con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el dominio de peso variable y con un vector que comprende el ácido nucleico que codifica el dominio liviano variable.

30 En aún otra realización, la invención provee un método para tratar un trastorno por TGF-beta en un mamífero, preferiblemente un primate, y más preferiblemente un humano, que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva del anticuerpo humanizado, y como se define en las reivindicaciones. Esto puede comprender adicionalmente administrar al mamífero una cantidad efectiva de un agente terapéutico diferente al anticuerpo humanizado, tal como un agente quimioterapéutico, antiangiogénico o citotóxico o una citoquina.

En todavía otra realización, la invención provee un método para detectar una TGF-beta en una muestra corporal que comprende poner en contacto el anticuerpo humanizado con la muestra corporal y determinar si ha ocurrido enlazamiento del anticuerpo a la TGF-beta.

40 La invención también provee un artículo de manufactura que comprende un contenedor que contiene el anticuerpo humanizado e instrucciones que indican a un usuario para tratar un trastorno por TGF-beta en un mamífero, preferiblemente un humano, con el anticuerpo. Este artículo también puede comprender un contenedor que contiene un agente terapéutico diferente al anticuerpo humanizado, en donde las instrucciones dirigen al usuario para tratar el trastorno con el anticuerpo en combinación con el agente.

45 En otra realización, esta invención provee un método para tratar cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de un anticuerpo de TGF-beta y un anticuerpo que se enlaza a un factor de crecimiento endotelial vascular. Preferiblemente, el mamífero es humano. En otra realización, el anticuerpo de TGF-beta se enlaza a cualquiera o a más de los siguientes: TGF-beta1 y TGF-beta2. En una realización adicional, el anticuerpo se enlaza a TGF-beta1, o a TGF-beta1 y TGF-beta2.

Breve descripción de los dibujos

50 Las figuras 1A y 1B representan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios liviano variable (V<sub>L</sub>) (Figura 1A) y pesado variable (V<sub>H</sub>) (Figura 1B) de anticuerpo monoclonal murínico 2G7 (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente); dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de la versión humanizada huxTGFB (V5H.V5L) (SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente); y marcos de consenso V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> humanos (hum κ1, subgrupo kappa liviano I; humIII, subgrupo

- 5 pesado III) (SEQ ID NOS: 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre la huxTGFB humanizada y el anticuerpo 2G7 monoclonal murínico o entre huxTGFB humanizada y las regiones de marco de consenso humanas. Las Regiones de Determinación de Complementariedad (CDR) están subrayadas, y las CDR de la secuencia de línea germinal humana real están bajo las regiones de marco de consenso para comparación (SEQ ID NOS: 7 -10).
- La figura 2 muestra las secuencias de ADN (SEQ ID NOS: 11 - 17) que codifica las diversas regiones CDR (SEQ ID NOS: 18 - 24).
- 10 La figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de 709.I y H.IgG1 (SEQ ID NO: 25); de H2NI.V5L (SEQ ID NO: 26), de V11H.V11L (SEQ ID NO: 27), de V5H.V5L (SEQ ID No: 28), de chimL.chimH (SEQ ID NO: 29), y de V5H.g1L2 (SEQ ID NO: 30).
- La figura 4 muestra las secuencias de ácidos nucleicos sin y con secuencias de señal que codifica la secuencia de la figura 3 (SEQ ID NOS: 31 - 42).
- La figura 5 muestra las curvas de enlazamiento de anticuerpos humanizados de la variante 2G7 IgG a TGF-beta.
- 15 La figura 6 muestra la secuencia del plásmido pDR1 (SEQ ID NO: 44; 5391 bp) para la expresión de cadenas rellenas de inmunoglobulina como se describe en el ejemplo 2. pDR1 contiene secuencias que codifican un anticuerpo irrelevante, esto es, la cadena liviana de un anticuerpo anti-CD3 humanizado (Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992), los codones de inicio y de tensión los cuales están indicados en negrita y subrayados.
- 20 La figura 7 muestra la secuencia del plásmido pDR2 (SEQ ID NO: 45; 6135 bp) para la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulina como se describen en el ejemplo 2. pDR2 contiene secuencias que codifican un anticuerpo irrelevante, esto es la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 humanizado (Shalaby et al., supra), los codones de inicio y de tensión los cuales están identificados en negrita y subrayados.
- La figura 8 muestra las curvas de enlazamiento de anticuerpos humanizados en reversión de línea germinal 2G7 a TGF-beta.
- 25 La figura 9 muestra los resultados del bloqueo de un ensayo de proliferación celular mesangial en ratón del anticuerpo 2G7 de TGF-beta1 y de varios anticuerpos variables TGF-beta humanizados.
- Las figuras 10A - 10C muestran la neutralización de TGF-beta3 en tres concentraciones diferentes, respectivamente, en un ensayo de proliferación de fibroblastos 3T3 por tres anticuerpos humanizados contra TGF-beta (H2NI.V5L, H2NI.g1L2, y V5H.g1L2) y del anticuerpo murínico 2G7.
- 30 Las figuras 11A - 11C muestran la neutralización de TGF-beta2 en tres concentraciones diferentes, respectivamente, en un ensayo de proliferación de fibroblastos 3T3 por los cuatro anticuerpos mostrados en la figura 10.
- Las figuras 12A - 12C muestran la neutralización de TGF-beta1 en tres concentraciones diferentes, respectivamente, en un ensayo de proliferación de fibroblastos 3T3 por los cuatro anticuerpos mostrados en la figura 10.
- 35 Las figuras 13A - 13C muestran la neutralización de 2 ng/ml de TGF-beta1, beta2, y beta3, respectivamente, en un ensayo de proliferación de fibroblastos 3T3 por los cuatro anticuerpos mostrados en la figura 10.
- Las figuras 14A - 14D muestran la neutralización de las tres isoformas de TGF-beta en un ensayo de proliferación de fibroblastos 3T3 por el anticuerpo humanizado H2NI.V5L (Figura 14A), anticuerpo humanizado H2NI.g1L2 (Figura 14B), anticuerpo murínico 2G7 (Figura 14C), y anticuerpo humanizado V5H.g1L2 (Figura 14D).
- 40 Las figuras 15A y 15B muestran los resultados por ELISA de la producción e inhibición de TGF-beta por células normales y epiteliales tumorales. La figura 15A muestra la producción *in vitro* de TGF-beta1 por células epiteliales normales (EpC) (C57) y por tumorales EpC (modelo 4T1). La figura 15B muestra el efecto del anticuerpo anti-TGF-beta 2G7 *in vivo* sobre los niveles en suero de TGF-beta1 en EpC de tumor versus el anticuerpo de control IgG (IgG comparado con isotopo, el cual es un anticuerpo anti-ambrosía) en EpC normales y de tumor. Este mismo control de IgG es utilizado para las figuras restantes, y en la figura 28 se usa un control IgG que puede o puede no ser el mismo.
- 45 Las figuras 16A y 16B muestran el efecto del anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta sobre tumores de pulmón secundarios versus el control IgG. La figura 16A muestra marcadores de histología con grado y número de lóbulos afectados por tanto el anticuerpo de control IgG como el anticuerpo 2G7 de TGF-beta, y la figura 16B muestra los pesos de tejido en gramos y porcentaje de peso corporal para el mismo control y el anticuerpo 2G7 de TGF-beta.
- 50 La figura 17 muestra el efecto del anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta sobre la cuantificación de tumores pulmonares por  $\mu$ CT versus el IgG de control, tanto por el volumen tumoral como por el número de tumores.

5 Las figuras 18A y 18B muestran el efecto del anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta y quimioterapia en el modelo de cáncer de seno 4T1 versus el IgG de control. La figura 18A muestra el volumen tumoral como una función del tiempo después de la inyección de células para IgG con control salino, IgG y docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>) como control, y 2G7 anti-TGF-beta y docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>). La figura 18B muestra el peso en tejido para cerebro, pulmones, bazo y tumor para los dos controles (IgG con y sin TAXOTERE<sup>®</sup> docetaxel), y el anti-TGF-beta con docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>).

La figura 19 muestra los niveles de VEGF en plasma (pg/ml) en ratones sin tumores (normal), o en ratones con tumores mamarios 4T1 tratados bien sea con el control IgG (control) o anti-TGF-beta (2G7).

10 Las figuras 20A y 20B muestran el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta en un modelo de cáncer de seno diferente PymT. La figura 20A muestra el volumen de tumor como una función de los días de crecimiento tumoral para el anticuerpo de TGF-beta y un control IgG, y la figura 20B muestra el peso del tumor para el anticuerpo de TGF-beta y el IgG de control.

15 Las figuras 21A y 21B muestran un modelo de melanoma de ratón B16 y el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta versus el control IgG. La figura 21A muestra el porcentaje de ratones con tumores de pulmón para superficie y patología para el control y el anticuerpo de TGF-beta, y la figura 21B muestra el número de tumores de pulmón para superficie, limpios y CT para el control y anticuerpo TGF-beta.

La figura 22 muestra el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta sobre el crecimiento tumoral B16 (volumen) durante 14 días después de la inoculación versus el control de IgG.

20 La figura 23 muestra el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta sobre el recuento de metástasis en pulmón visible B16 (E6) contra el control de IgG.

La figura 24 muestra el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta sobre el crecimiento tumoral B16 (volumen) después de 17 días después de la inoculación contra el control de IgG.

La figura 25 muestra el efecto 2G7 de TGF-beta sobre el peso de tumor primario B16 versus el control de IgG.

25 La figura 26 muestra el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta sobre el recuento de metástasis de pulmón visible (E7) B16 versus el IgG de control.

La figura 27 muestra el efecto del anticuerpo 2G7 de TGF-beta, el anticuerpo A461 anti-VEGF monoclonal murínico, y una combinación de los dos anticuerpos sobre volumen tumoral en un xenoinjerto en ratón de Calu-6 de células pulmonares humanas versus el control de IgG durante un periodo de tiempo de hasta el día 42. El tratamiento con los diversos agentes se inicia en el día 2.

30 La figura 28 muestra los pesos finales tumorales para el experimento con Calu-6 en la figura 27 para tres tipos de tratamientos con anticuerpos y el control de IgG.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

#### L Definiciones

35 Los términos "TGF-beta" y "Factor beta de transformación de crecimiento" se utilizan de manera intercambiable aquí y se refieren a la familia de moléculas descritas aquí anteriormente que tienen bien sea la longitud completa, la secuencia de aminoácidos nativa de cualquiera de las TGF-betas de humanos, incluyendo las formas latentes y complejos asociados o no asociados de TGF-beta precursor y maduro ("TGF-beta latente"). La referencia a tal TGF-beta aquí será entendida como una referencia a cualquiera de sus formas actualmente identificadas, incluyendo TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 y TGF-beta5 y versiones latentes de los mismos, así como especies de TGF-beta humanas identificadas en el futuro, incluyendo polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier TGF-beta conocido y que tenga al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, todavía más preferiblemente al menos 90%, e incluso más preferiblemente al menos 95% de homología con la secuencia. Los términos específicos "TGF-beta1", "TGF-beta2", y "TGF-beta3", así como "TGF-beta4" y "TGF-beta5" se refieren a las TGF-betas definidas en la literatura, por ejemplo Derynck et al., Nature, supra, Seyedin et al., Biol. Chem., 262, supra, y deMartin et al., supra. El término "TGF-beta" se refiere al gen que codifica TGF-beta humana. La TGF-beta preferida es la TGF-beta humana de secuencia nativa.

50 Los miembros de la familia de TGF-beta son definidos como aquellos que tienen nueve residuos de cisteína en la porción madura de la molécula, comparten al menos el 65% de homología con otras secuencias de TGF-beta conocidas en la región madura, y pueden competir por el mismo receptor, además, todos aparecen como codificados como un precursor más grande que comparte una región de alta homología cercana al terminal N y muestran conservación de tres residuos de cisteína en la porción del precursor que se había retirado más adelante

por procesamiento. Además, las TGF-betas parecen tener un sitio de procesamiento con cuatro o cinco aminoácidos.

5 Un polipéptido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo TGF-beta1) derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes o sintéticos. Así, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de polipéptido humano, polipéptido murínico o polipéptido de cualquier otra especie de mamíferos de origen natural.

10 El término "variante de secuencias de aminoácidos" se refiere a los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto grado de un polipéptido de secuencia nativa. Ordinariamente, las variantes de secuencias de aminoácidos poseerán al menos 70% de homología con el polipéptido de secuencia nativa o una porción del mismo que está siendo comparada con la variante, y preferiblemente, tendrán al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos 90% y todavía más preferiblemente al menos 95% de homología con tales polipéptidos de secuencia nativa o porción. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos nativa.

15 "Homología" se define como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de homología. Son bien conocidos en la técnica métodos y programas de ordenador para el alineamiento. Un tal programa de ordenadores "Align 2", creado por Genentech, Inc., el cual fue presentado con documentación para usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

20 El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

25 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un sitio antigénico individual. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante individual en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto pueden ser sintetizados de manera no contaminada por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por ser obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse como el requerimiento de producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden ser hechos por el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o pueden ser hechos mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4, 816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden ser aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

30 Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica con u homologa a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, en tanto exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés aquí incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de enlazamiento a antígenos de dominio variables derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Monos del Viejo Mundo, Simios, etc.) y secuencias de región constante humanas.

35 "Fragmentos de anticuerpos" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende precisamente el enlazamiento al antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv como fragmentos; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

40 Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende una región variable de enlazamiento a antígeno así como un dominio constante de cadena liviana (C<sub>L</sub>) y dominios constantes de cadena pesada, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencias de aminoácidos de las mismas. Preferiblemente el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

“Funciones efectoras” de un anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variables) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen enlazamiento a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; enlazamiento a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de células B; BCR); etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden ser asignados a diferentes “clases”. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estos pueden ser divididos en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcRs) (por ejemplo, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo de enlazamiento sobre una célula objetivo y subsecuentemente producen la lisis de la célula objetivo. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan solamente Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas está resumida en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991). Para establecer la actividad ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser establecida *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 95:652-656 (1998).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan una o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc $\gamma$ RIII y llevan a cabo la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas, y neutrófilos, siendo preferidas las células PBMC y NK. Las células efectoras pueden ser aisladas a partir de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe aquí.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se utilizan para describir un receptor que se enlaza a la región Fc de un anticuerpo. El FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se enlaza a un anticuerpo IgG (un receptor  $\gamma$ ) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente divididas de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un “receptor de activación”) y Fc $\gamma$ RIIB (un “receptor inhibidor”), el cual tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren primariamente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición Fc $\gamma$ RIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase una revisión en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcRs están revisados en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que van a ser identificados en el futuro, están abarcados por el término presente “FcR”. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable por la transferencia de IgGs maternos al feto. Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim et al., J. Immunol., 24: 249 (1994).

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula para realizar lisis en un objetivo en la presencia de un complemento. La ruta de activación del complemento es iniciada por el enlazamiento del primer componente del sistema complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo un anticuerpo) complejada con un antígeno connoto. Para establecer la activación por complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, como el descrito en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996).

“Anticuerpos nativos” son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana esta enlazada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varia entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana tiene también puentes de disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable en un extremo ( $V_L$ ) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena liviana está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena liviana está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencias entre anticuerpos y se utilizan en el enlazamiento y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida homogéneamente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones hipervariables ambas en los dominios variables de la cadena liviana y de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables se denominan regiones marco (FRs). Los dominios variables de las cadenas nativas pesada y liviana comprenden cada uno cuatro FRs, adoptando principalmente una configuración en lámina  $\beta$ , conectada por tres regiones hipervariables, las cuales forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad mediante las FRs, y las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlazamiento al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et., supra). Los dominios constantes no están involucrados directamente en el enlazamiento de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable" cuando se utiliza aquí se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables por el enlazamiento al antígeno. La región hipervariable comprende en general residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementareidad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24 - 34 (L1), 50 - 56 (L2) y 89 - 97 (L3) en el dominio variable de cadena liviana y 31 - 35 (H1), 50 - 65 (H2) y 95 - 102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat et al, supra) y/o aquellos residuos forman un "bucle hipervariable" (por ejemplo residuos 26 - 32 (L1), 50 - 52 (L2) y 91 - 96 (L3) en el dominio variable de cadena liviana y 26 - 32 (H1), 53 - 55 (H2) y 96 - 101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Los residuos de la "región marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes a los residuos de la región hipervariable como se definió aquí.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de enlazamiento a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de enlazamiento sencillo al antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de enlazamiento al antígeno y esto haría capaz del entrecruzamiento con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento al antígeno y enlazamiento al antígeno completo. La región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de enlazamiento al antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad para el enlazamiento al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso a un dominio variable individual (o la mitad de un Fv que compromete solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la habilidad de reconocer y enlazar el antígeno, a una afinidad inferior que el sitio de enlazamiento completo.

El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en la cual los residuos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos del anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteína bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas livianas" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), con base en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los fragmentos "Fv de cadena liviana" o "scFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptidos sencilla. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazamiento polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el scFv forme la estructura deseada para el enlazamiento del antígeno. Para una revisión de scFv, véase Plückthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo anti-TGF-beta están descritos en WO 1993/16185; U.S. Pat. No. 5,571,894; y U.S. Pat. No. 5,587,458.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de enlazamiento al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio liviano variable (V<sub>L</sub>) en la misma cadena de polipéptidos (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Utilizando un enlazante que es demasiado corto para permitir un apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de enlazamiento al antígeno. Los diacuerpos están descritos más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (Fr) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, típicamente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todo los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos de los Fr son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales véase Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Un anticuerpo “aislado” es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) a más de 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa de rotación, o (3) hasta una homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado será preparado por al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo “que se enlaza” a un antígeno de interés, por ejemplo, el antígeno TGF-beta, es aquel que es capaz de enlazar ese antígeno con suficiente afinidad de tal manera que el anticuerpo es útil como un agente terapéutico en el direccionamiento de una célula que expresa el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que enlaza a TGF-beta, usualmente se enlazarán de manera preferencial a TGF-beta en oposición a otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y puede ser aquel que no reaccione de forma cruzada de manera significativa con otras proteínas de tal familia tales como BMP, activina, etc. En tales realizaciones, el grado de enlazamiento del anticuerpo a estas proteínas no TGF-beta será menor de 10% según se determina mediante el análisis de selección celular activado por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado, tal como el anticuerpo monoclonal designado 2G7 es aquel que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se enlazan al mismo antígeno (por ejemplo TGF-beta). Por ejemplo, un anticuerpo con una característica biológica de 2G7 puede bloquear la activación de TGF-beta y, y/o enlazarse al mismo epítipo en el dominio extracelular de TGF-beta tal como se enlaza con 2G7.

Al menos que se indique otra cosa, la expresión “anticuerpo 2G7 monoclonal” se refiere a un anticuerpo que tiene residuos de enlazamiento al antígeno de, derivados de, el anticuerpo 2G7 murínico de los ejemplos que siguen más abajo. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 2G7 puede ser el anticuerpo monoclonal 2G7 murínico o una variante del mismo, tal como el anticuerpo 2G7 humanizado, que posee residuos de aminoácidos de enlazamiento al antígeno del anticuerpo monoclonal 2G7 murínico. Ejemplos de anticuerpos 2G7 humanizados se proveen en el ejemplo 2 más abajo. Al menos que se indique otra cosa, la expresión “rhuMAb 2G7” cuando se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo que comprende las secuencias liviana variable ( $V_L$ ) y pesada variable ( $V_H$ ) de SEQ ID NOS: 1 y 2 respectivamente, fusionadas a secuencias de región constante liviana y pesadas IgG1 (no alotipo A) expresadas por una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula de cáncer que expresa TGF-beta bien sea *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan TGF-beta en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio diferente a la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores topo II tales como desoxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también participan en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

Ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son aquellos que se enlazan a TGF-beta e inhiben el crecimiento de células de cáncer que sobreexpresan TGF-beta. Anticuerpos anti-TGF-beta inhibidores de crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células tumorales de seno SK-BR-3 en cultivos celulares en más de 20%, y preferiblemente en más de 50% (por ejemplo, desde aproximadamente 50% hasta aproximadamente 100%) en una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0.5 a 30 µg/ml, en donde la inhibición del crecimiento se determina 6 días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,171 publicada el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 está descrito en más detalle en esa Patente.

Un anticuerpo que "induce la muerte celular" es aquel que causa que una célula viable se convierta en no viable. La célula es generalmente aquella que generalmente expresa el receptor TGF-beta, especialmente cuando la célula sobreexpresa el receptor TGF-beta. Preferiblemente, la célula es una célula de cáncer, por ejemplo, una célula de seno, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmones, riñones, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular *in vitro* puede ser determinada en la ausencia de complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). Así, el ensayo para la muerte celular puede ser llevado a cabo utilizando suero inactivado por calor (esto es, en ausencia de complemento) y en la ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de la integridad de la membrana puede ser evaluada por el consumo de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore et al., *Cytotechnology*, 17: 1-11 (1995)) o 7AAD que puede ser establecido con respecto a células no tratadas. Los anticuerpos preferidos que inducen a muerte celular son aquellos que inducen el consumo de PI en el ensayo de consumo de PI en células BT474 (véase más adelante).

Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es aquel que induce la muerte programada de células según se determina mediante el enlazamiento de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas en la membrana (llamados cuerpos apoptóticos). La célula es usualmente aquella que sobreexpresa el receptor TGF-beta. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de seno, ovario, estómago, endometrio, de glándula salival, pulmones, riñones, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Hay disponibles diversos métodos para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) puede ser medida por el enlazamiento de anexina; la fragmentación de ADN puede ser evaluada a través del escalamiento de ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la desfragmentación de ADN puede ser evaluada por cualquier incremento en las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es aquel que da como resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de forma aproximada 5 a 50 veces, y lo mas preferiblemente de forma aproximada 10 a 50 veces, de inducción de enlazamiento a anexina con respecto a células no tratadas en un ensayo de enlazamiento de anexina utilizando células BT474 (véase más adelante). Algunas veces el anticuerpo proapoptótico será aquel que bloquea adicionalmente el enlazamiento a TGF-beta (por ejemplo anticuerpo 2G7); esto es, el anticuerpo comparte una característica biológica con un anticuerpo ATG-beta. En otras situaciones, el anticuerpo es aquel que no bloquea significativamente TGF-beta. Adicionalmente, el anticuerpo puede ser aquel que, a la vez que induce la apoptosis, no induce una gran reducción en el porcentaje de células en fase S (por ejemplo uno que solamente induce aproximadamente 0 - 10% de reducción en el porcentaje de estas células con respecto al control).

El "epítipo 2G7" es la región en el dominio extracelular de TGF-beta al cual el anticuerpo 2G7 (ATCC HB 10240) se enlaza. Para seleccionar los anticuerpos que se enlazan al epítipo 2G7, puede llevarse a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Un "anticuerpo de TGF-beta" se refiere a un anticuerpo que se enlaza a cualquiera de las isoformas de TGF-beta, preferiblemente enlazándose bien sea a TGF-beta1, TGF-beta2 o TGF-beta3, o a cualquier combinación de los mismos, más preferiblemente al menos TGF-beta 1, o al menos TGF-beta2, y los más preferiblemente TGF-beta1 o TGF-beta 1 junto con TGF-beta2. Opcionalmente, el anticuerpo puede enlazarse a al menos TGF-beta3.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Aquellos que requieren de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los cuales el trastorno va ser prevenido. Por lo tanto, el mamífero que va a ser tratado aquí puede haber sido diagnosticado por tener el trastorno o puede estar predispuesto o ser susceptible al trastorno.

"Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, cerdos. Preferiblemente el mamífero es un primate, tal como un mono, simio o humano, por ejemplo y lo más preferiblemente un humano.

“Trastornos de TGF-beta” o “trastornos relacionados con TGF-beta” se refiere a cualquier trastorno, enfermedad o condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo anti-TGF-beta. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los trastornos que va a ser tratados aquí incluyen enfermedades caracterizadas por la acumulación de matriz extracelular, enfermedades causadas por TGF-beta circulante o TGF-beta activado en un sitio local, condiciones causadas por la supresión del sistema inmune debido a la producción endógena de TGF-beta, y deficiencias inmunes agudas resultantes de las lesiones, quemaduras y enfermedades severas tales como infecciones virales o bacterianas, enfermedades sistémicas multiórgano debido a la producción o sobreproducción de TGF-beta y tumores que producen TGF-beta. Ejemplos específicos no limitantes incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos, fibrosis, desgarramiento, daño de tejidos tales como los causados por radiación, y adhesión durante la curación de heridas, trastornos fibróticos de la piel tales como escleroderma, tejidos deteriorados por patología CNS, desgarre dérmico, desgarre queloide, y desgarre neural, enfermedades neuróticas de la cavidad peritoneal, pulmones, hígado y riñones tales como fibrosis hepática crónica, lesión aguda del hígado, fibrosis intersticial de pulmón y renal, y cirrosis de hígado, fibrosis quística, trastornos vasculares, por ejemplo fibrosis cardíaca, lesiones arteriales tales como aterosclerosis y arterioesclerosis, tumores benignos y malignos, ciertas leucemias no inhibidas por TGF-beta y enfermedades malignas (por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas), incluyendo cáncer de próstata, fibrótico, de ovario, melanoma maligno, de seno, de pulmón, de colon, rectal, colorrectal, o cervical y cáncer metastásico, así como tumores neuroendocrinos del sistema digestivo y glioblastoma, angiopatía, vasculopatía, nefropatía, esclerosis sistémica, infecciones tales como infecciones de patógenos macrófagos e infecciones virales tales como hepatitis C y VIH, trastornos inmunológicos, angiogénicos e inflamatorios y deficiencias tales como artritis reumatoide, un trastorno ocular, especialmente aquellos que involucran fibrosis ocular, incluyendo retinopatía proliferativa, desprendimiento de retina y drenaje postcirugía de glaucoma tal como retina neural, pigmento retinal coroide de epitelio y vítreo del ojo humano, y cataratas, osteoporosis, síndrome de distensión respiratoria en adultos, infarto postmiocardio, restenosis postangioplastia, glomerulonefritis, una condición relacionada con la diabetes tal como hiperglicemia, diabetes, enfermedad renal diabética, nefropatía diabética, neuropatía o retinopatía diabética, y enfermedades por deficiencia de macrófagos.

Preferiblemente, el trastorno es fibrosis, una lesión arterial, una infección, artritis reumatoide, diabetes o una condición diabética, o una enfermedad maligna, tal como un cáncer que exprese TGF-beta, más preferiblemente en donde el cáncer es caracterizado por la activación excesiva de TGF-beta. Tal cáncer puede sobreexpresar TGF-beta, o alternativamente puede no ser caracterizado por la sobreexpresión de TGF-beta.

El término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o trastorno de un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño del tumor; inhibir (esto es, hacer disminuir hasta cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (esto es, disminuir hasta cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Hasta el grado en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia para el cáncer, la eficacia puede ser medida, por ejemplo, estableciendo el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la rata de respuesta (RR).

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que es típicamente caracterizada por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o enfermedades malignas linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales) cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios y, cáncer del hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma del endometrio o uterino, carcinoma de la glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene así como cáncer de cabeza y cuello.

Un “cáncer que expresa TGF-beta” es aquel que produce niveles suficientes de TGF-beta en la superficie de las células del mismo, de tal manera que un anticuerpo anti TGF-beta puede enlazarse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

Un cáncer “caracterizado por activación excesiva” de un receptor TGF-beta es aquel en el cual el grado de activación del sector de TGF-beta en células cancerosas excede significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Tal activación excesiva puede ser el resultado de una sobreexpresión del receptor de TGF-beta y/o mayor que los niveles normales de un ligando de TGF-beta disponible para activar el receptor de TGF-beta en las células cancerosas. Tal activación excesiva puede causar y/o ser causada por un estado maligno de una célula de cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer será sometido a una prueba diagnóstica o pronóstica para determinar si la amplificación y/o sobreexpresión de un receptor de TGF-beta

está ocurriendo de tal forma que da como resultado una activación excesiva del receptor de TGF-beta. Alternativamente, o adicionalmente, el cáncer puede ser sometido a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o sobreexpresión de un ligando de TGF-beta está ocurriendo en el cáncer atribuible a activación excesiva del receptor. En un subconjunto de tales cánceres, la activación excesiva del receptor puede ser el resultado de una ruta estimuladora autocrina.

En una ruta estimuladora "autocrina" ocurre la autoestimulación en virtud de que la célula cancerosa produce tanto un ligando de TGF-beta y su receptor cognato TGF-beta. Por ejemplo, el cáncer puede expresar o sobreexpresar el receptor de TGF-beta y también expresar o sobreexpresar el ligando de TGF-beta (por ejemplo TGF-beta1).

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor de TGF-beta es aquel que tiene niveles significativamente más altos de un receptor TGF-beta, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal sobreexpresión puede ser causada por amplificación del gen o por transcripción o traducción incrementadas. Las sobreexpresión del receptor de TGF-beta puede ser determinado en un ensayo diagnóstico o pronóstico por la evaluación de los niveles incrementados de la proteína de TGF-beta presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica TGF-beta en una célula, por ejemplo, a través de hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase WO 1998/45479 publicada en octubre de 1998), transferencia *southern*, o técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del receptor de TGF-beta midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo dominio extracelular TGF-beta) en un fluido biológico tal como suero (véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos No. 4,933,294 publicada el 12 de junio de 1990, WO 1991/05264 publicada el 18 de abril de 1991; la Patente de los Estados Unidos No. 5,401,638 publicada el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods. 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, hay disponibles diversos ensayos *in vivo* para el practicante experto. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y el enlazamiento del anticuerpo a las células en el paciente puede evaluarse, por ejemplo, mediante un barrido externo por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Por el contrario, un cáncer que "no está caracterizado por la sobreexpresión del receptor de TGF-beta" es aquel que, en un ensayo diagnóstico no expresa niveles más altos de los normales del receptor TGF-beta en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

Un cáncer que "sobreexpresa" un ligando de TGF-beta es aquel que produce niveles significativamente más altos de ese ligando en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo. Tal sobreexpresión puede ser causada por la amplificación de genes o por transcripción o traducción incrementadas. La sobreexpresión del ligando de TGF-beta puede ser determinada por medios diagnósticos evaluando los niveles del ligando (o del ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo en una biopsia tumoral o por diversos ensayos diagnósticos tales como IHC, FISH, transferencia *southern*, PCR o ensayos *in vivo* descritos más arriba.

Un cáncer "independiente de hormonas" es aquel en la cual la proliferación del mismo no es dependiente de la presencia de una hormona que se enlace a un receptor expresado por células en el cáncer. Tales cánceres no experimentan regresión clínica por administración de estrategias farmacológicas o quirúrgicas que reducen la concentración de hormona en o cerca del tumor. Ejemplos de cánceres independientes de hormonas incluyen cáncer de próstata independiente de andrógenos, cáncer de seno independiente de estrógenos, cáncer del endometrio y cáncer de ovario. Tales cánceres pueden comenzar como tumores dependientes de hormonas y progresar desde un estado sensible a las hormonas hasta un tumor refractario a las hormonas después de terapia antihormonal.

El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (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 para moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>TM</sup>); sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocoune, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafacina, clorofosfamida, estrasmustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido clorhidrato, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmostina, clorotocina, fotemostina, lomostina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicleamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicinas, daunorrobicina, deunorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina,

5 potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteroterina, trimetrexato; análogos de la purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de la pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didexosiidina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperadores del ácido fólico tales como ácido folínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK<sup>®</sup> crestina; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2, 2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos (o taxoides), por ejemplo paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino y carboplatino; 15 vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores receptores electivos de estrógenos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifen (incluyendo tamoxifen NOLVADEX<sup>®</sup>), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON<sup>®</sup> toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE<sup>®</sup> megestrol acetato, AROMASIN<sup>®</sup> exemestano, formestantina, fadrozol, RIVISOR<sup>®</sup> vorozol, FEMARA<sup>®</sup> letrozol, y ARIMIDEX<sup>®</sup> anastrozol; y anti andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de la 1,3-dioxolan nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como por ejemplo PKC-alfa, Ralf y H-Ras; vacunas tales como vacunas de terapia genética, por ejemplo vacuna ALLOVECTIN<sup>®</sup>, vacuna LEUVECTIN<sup>®</sup>, y vacuna VAXID<sup>®</sup>; 30 PROLEUKIN<sup>®</sup> rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN<sup>®</sup>; ABARELIX<sup>®</sup> rmRH; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

35 Tal como se utiliza aquí, el término "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se enlaza a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se enlazan a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se enlazan a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase Patente de los Estados Unidos No. 4,943,533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225) y humano 225 reformado (H225) (véase, WO 1996/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se enlazan a EGFR mutante tipo II (Patente de los Estados Unidos No. 5,212,290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se enlazan a EGFR tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,891,996; y anticuerpos humanos que se enlazan a EGFR (véase WO 1998/50433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR puede ser conjugado con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, EP 659,439, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se enlazan a EGFR incluyen ZD1839 (Astra Zeneca), CP-358774 (OSI/Pfizer), y AG1478.

45 Un "agente terapéutico diferente al anticuerpo humanizado" se refiere a cualquier agente que es efectivo en el tratamiento de trastornos por TGF-beta diferentes a los anticuerpos aquí, e incluye aquellos tipos listados más adelante.

50 Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere con, hasta cierto grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o un anticuerpo que se enlaza a un factor de crecimiento o a un receptor del factor de crecimiento involucrado en la promoción de la angiogénesis. Ejemplos incluyen antagonistas del factor de crecimiento endotelial vascular, anticuerpos humanos y humanizados así como fragmentos, y también incluyen anticuerpos que bloquean o neutralizan el VEGF que se enlaza a uno o más receptores de VEGF, preferiblemente ambos receptores.

55 La expresión "reguladores de la función inmune en un mamífero" se refiere a citoquinas y factores de crecimiento que regulan una función inmune de un mamífero, incluyendo interleucinas, factores de necrosis tumoral, linfotoxina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, TGF-alfa, factor inhibidor de la migración de macrófagos, factor de activación de macrófagos, factor de crecimiento de fibroblastos, factores de activación de macrófagos, interferones y factores estimuladores de colonias. Estos reguladores pueden ser derivados de fuentes naturales formadas por leucocitos, sintetizados por métodos químicos si es apropiado, o 60 preparados por vía recombinante. Se prefieren IL-1, IL-2, IL-6 e IFN-β.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas dentro de las citoquinas están hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante de folículos (FSH), hormonas estimulantes de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno de placenta; factor alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de muleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervios tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TGF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y un ligando (KL). Tal como se utiliza aquí, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencias nativas.

El término "profármacos" tal como se utiliza en esta solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica a las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de ser activada o convertida enzimáticamente en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden ser convertidos en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivados hacia una forma profármaco para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos más arriba.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes que se utiliza para administración de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-TGF-beta divulgados aquí y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes de liposomas están dispuestos comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

El término "inserto en el empaque" se utiliza para referirse a instrucciones que se incluyen habitualmente en paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias que conciernen al uso de tales productos terapéuticos.

Un "cardioprotector" es un compuesto o composición que evita o reduce la disfunción del miocardio (esto es, cardiomiopatía y/o fallo cardíaco congestivo) asociada con la administración de un fármaco, tal como un antibiótico de antraciclina y/o un anticuerpo anti-TGF-beta, a un paciente. El cardioprotector puede, por ejemplo, bloquear o reducir el efecto cardiotóxico mediado por radicales libre y/o evitar o reducir la lesión por estrés oxidativo. Ejemplos de cardioprotectores abarcados por la presente definición incluyen el agente quelante de hierro dexarrazoxano (ICRF-187) (Seifert et al., The Annals of Pharmacotherapy, 28: 1063-1072 (1994)); un agente de disminución de lípidos y/o antioxidante tal como probocol (Singal et al., J. Mol. Cell Cardiol. 27: 1055-1063 (1995)); amifostina (aminotiol 2-[(3-aminopropil)amino]etanetiol-dihydrogen phosphate ester, también llamado WR-2721, y el consumo celular desfosforilado del mismo llamado WR-1065) y S-3-(3-metilaminopropylamino)propylphosphorotioic acid (WR-151327), véase Green et al., Cancer Research, 54: 738-741 (1994); digoxina (Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. Drug-Induced Heart Disease (New York: Elsevier 191-215 (1980)); betabloqueadores tales como metoprolol (Hjalmarson et al., Drugs, 47: Suppl 4:31-9 (1994); y Shaddy et al., Am. Heart J., 129: 197-199 (1995)); vitamina E; ácido ascórbico (vitamina C); consumidores de radicales libres tales como ácido oleanólico, ácido ursólico, y N-acetilcisteína (NAC); compuestos atrapadores de rotación tales como alfa-fenil-tert-butyl nitrona (PBN) (Paracchini et al., Anticancer Res., 13: 1607-1612 (1993)); compuestos selenoorgánicos tales como P251 (Elbesen); y similares.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente a otra en la forma o condiciones en las cuales se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que ordinariamente expresa el anticuerpo en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación operativamente enlazada en un organismo anfitrión particular. Las secuencia de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de enlazamiento al ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "enlazado operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o guía de secreción está enlazado operativamente con el ADN para un polipéptido si este es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido. Un promotor o potenciador esta enlazado operativamente a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia; o el sitio de enlazamiento del ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si esta posicionada de tal manera que facilite la traducción. En general, "enlazado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas, y, en el caso de una guía de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlazamiento es logrado mediante ligazón en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlazadores se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se utilizan aquí, las expresiones "células", "línea celular" y "cultivo de células" se utilizan de manera intercambiable y todas las tales designaciones incluyen progenie. Así, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y cultivos derivados de la misma sin importar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal como es seleccionada en la célula transformada originalmente está incluida. Cuando haya designaciones diferentes, esto será claro desde el contexto.

Tal como se utiliza aquí, "muestra corporal" se refiere a cualquier líquido o muestra biológica que contiene o puede contener el TGF-beta que va a ser detectado. La muestra incluye fluidos tales como fluidos corporales humanos o animales, por ejemplo, sangre, suero, orina, líquido amniótico, extractos de tejido, fluido cerebroespinal y similares. Las muestras pueden requerir tratamiento especial tal como extracción antes de ser analizada, dependiendo de la tendencia de los componentes contenidos en las mismas hacia sensibilidad, agregación o absorción por parte del contenedor de almacenamiento.

## II. Producción de anticuerpos anti TGF-beta humanizados.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos han sido descritos en la técnica. Preferiblemente un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son denominados frecuentemente como residuos "importados" los cuales típicamente son tomados de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de una región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Colocando en sustitución las secuencias de región hipervariable para las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567) en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de la región hipervariables y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Otro método para hacer anticuerpos humanizados está descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0017534 publicada el 23 de enero de 2003, en donde se producen anticuerpos humanizados y preparaciones de anticuerpos a partir de animales no humanos transgénicos. Los animales no humanos son manipulados genéticamente para contener uno o más loci de inmunoglobulina humanizados capaces de experimentar reordenamiento genético y conversión genética en los animales no humanos transgénicos para producir inmunoglobulinas humanizadas diversificadas.

La selección de dominios variables humanos, tanto livianos como pesados, para ser usados en la confección de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el así llamado método de "mejor ajuste" la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor es seleccionada contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor es aceptada entonces como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas livianas o pesadas. El mismo marco puede ser utilizado para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es importante adicionalmente que los anticuerpos sean humanizados con retención de la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con el método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y de diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para aquellos experimentados en la técnica. Hay programas de ordenador disponibles que ilustran y despliegan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estos despliegues permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, esto es, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para enlazarse a su antígeno. De esta manera los residuos FR pueden ser seleccionados y combinados desde el receptor y las secuencias importadas de tal manera que la característica del anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el antígeno objetivo, se logra. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y lo más sustancialmente involucrados en la influencia del enlazamiento al antígeno.

El ejemplo 2 más adelante describe la producción de anticuerpos anti-TGF-beta humanizados de ejemplo que se enlazan a TGF-beta. El anticuerpo humanizado comprende aquí residuos de una región hipervariable no humana incorporada en el dominio pesado variable humano y comprende adicionalmente una sustitución de región marco (FR) en una posición seleccionada del grupo consistente de 48, 49, 68, 70, 72, 74 y 79 utilizando el sistema de numeración de dominios variables fijado en Kabat et al., supra. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones en FR en dos o más de las posiciones 48, 49, 68, 70, 72, 74 y 79; y en otras realizaciones, en tres o cuatro o más de tales posiciones. Realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende sustituciones en FR en las posiciones 49, 68 y 72, o en las posiciones 48, 49 y 72, o en las posiciones 49, 70 y 72, o en las posiciones 49, 70, 72 y 74, o en las posiciones 49, 72 y 74, o en las posiciones 49, 72 y 79. Se prefiere que haya menos en vez de más sustituciones en el marco para minimizar la inmunogenicidad, pero la eficacia también es una consideración muy importante. Los aminoácidos realmente sustituidos son aquellos que se conservan preferiblemente de tal forma que no se cambie la inmunogenicidad o eficacia. En la posición 48, el cambio es preferiblemente de valina a isoleucina, en la posición 49, el cambio es preferiblemente de alanina a glicina, en la posición 68, el cambio es preferiblemente de fenilalanina a alanina, en la posición 70, el cambio es preferiblemente de fenilalanina a alanina, en la posición 72, el cambio es preferiblemente de arginina a alanina, en la posición 74, el cambio es preferiblemente de asparagina a lisina, y en la posición 79, el cambio es preferiblemente de leucina a alanina.

Un anticuerpo humanizado de ejemplo de interés aquí comprende residuos determinantes de la complementariedad del dominio pesado variable GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 21); VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 22) o VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 43); y/o SGGFYFDY (SEQ ID NO: 23), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de aquellos residuos CDR, por ejemplo, donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener desde aproximadamente una hasta aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR de dominio pesado variable anteriores. Tales variantes de anticuerpos pueden ser preparadas por maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe más abajo. Preferiblemente, los residuos son dos o más de GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 21); VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 27) o VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 43), más preferiblemente todas tres; y/o SGGFYFDY (SEQ ID NO: 23). El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos de dominio pesado variable en SEQ ID NO: 4 o una con GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 21); VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 43); y SGGFYFDY (SEQ ID NO: 23). El anticuerpo humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de dominio liviano variable en SEQ ID NOS: 3. La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se enlazan a TGF-beta. El anticuerpo original puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias variables liviana y/o pesada de SEQ ID NO: 3 y 4 respectivamente (esto es, versión 5). El anticuerpo madurado por afinidad se enlaza preferiblemente a TGF-beta con una afinidad superior a la de la murina 2G7 o variante 5 (por ejemplo, desde aproximadamente 2 o aproximadamente 4 veces, hasta aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces de afinidad mejorada, por ejemplo, como se establece utilizando un dominio extracelular TGF-beta (ECD) (ELISA).

Diversas formas del anticuerpo humanizado o del anticuerpo madurado por afinidad se contemplan. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad pueden ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, el cual es conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunocóncugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo intacto IgG1.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos de anticuerpos humanizados. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas más arriba. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH, pueden ser recuperados directamente de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al.,

Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra metodología, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden ser aislados directamente a partir de cultivos de células anfitrionas recombinantes.

Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para un practicante experimentado. En otras realizaciones, el anticuerpo de selección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 1993/16185; la Patente de los Estados Unidos No. 5,571,894; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,587,458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo como el descrito en la Patente de los Estados Unidos 5,641,870, por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad de enlazamiento para al menos dos epítopos diferentes. Anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden enlazarse a dos epítopos diferentes de la proteína de TGF-beta. Otros tales anticuerpos pueden combinar un sitio de enlazamiento de TGF-beta con sitios de enlazamiento para HER-2, EGFR, ErbB, ErbB3, y/o ErbB4. Alternativamente, el brazo anti-TGF-beta puede ser combinado con un brazo que se enlaza a una molécula disparadora sobre un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) de tal manera que se enfoquen los mecanismos de defensa celular a la célula que expresa TGF-beta. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para células que expresan TGF-beta. Estos anticuerpos poseen en un brazo de enlazamiento a TGF-beta y un brazo que enlaza el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena de ricina A, metotrexato, o isótopo radioactivo hapteno). Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de F(ab')<sub>2</sub>).

La WO 1996/16673 describe un anticuerpo anti-TGF-beta/anti-FcγRIII y la Patente de los Estados Unidos No. 5,837,234 divulga un anticuerpo biespecífico anti-TGF-beta/anti-FcγRI. Un anticuerpo biespecífico anti-TGF-beta/Fcα es mostrado en la WO 1998/02463. La Patente de los Estados Unidos No. 5,821,337 enseña un anticuerpo biespecífico anti-TGF-beta/anti-CD3.

Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de cadena completas está basada en la coexpresión de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada - cadena liviana, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la selección aleatoria de cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual se hace normalmente por etapas de cromatografía por afinidad, es más bien engorrosa y los rendimientos de productos son bajos. Procedimientos similares se divulgan en WO 1993/08829, y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con una metodología diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de enlazamiento deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan en secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que contiene al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Se prefiere tener una primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para el enlazamiento de la cadena liviana, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina, y si se desea, la cadena liviana inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y son cotransfectados en un organismo anfitrión adecuado. Esto provee una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos y modalidades en las cuales las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción provee los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales da como resultado alto rendimientos o cuando las relaciones no son de significado particular.

En una realización preferida de esta metodología, los anticuerpos biespecíficos compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de enlazamiento en un brazo, y un par cadena pesada - cadena liviana de inmunoglobulina híbrida (que provee una segunda especificidad de enlazamiento) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, puesto que la presencia de una cadena liviana de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica provee una vía fácil de separación. Esta metodología esta divulgada en WO 1994/04690. Para detalles adicionales en la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 12: 210 (1986).

De acuerdo con otra metodología descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 5,731,168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser manipulada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que son recuperados del cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo es reemplazada con cadenas laterales más grandes (por ejemplo

tirosina o triptófano). Las “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes se quedan sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto provee un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

5 Anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede ser acoplado con avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para apuntar a células del sistema inmune hacerlas indeseadas (Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980) y para el tratamiento de infección por VIH (WO 1991/00360, WO 1992/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden hacerse utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente.  
10 Agentes de entrecruzamiento adecuado son bien conocidos en la técnica, y están divulgados, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980, junto con un cierto número de técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también han sido descritas en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados utilizando enlazamiento químico. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el cual anticuerpos intactos son escindidos proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos son reducidos en la presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecino y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados son convertidos entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB es reconvertido entonces en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y es mezclado con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden ser usados como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.  
15  
20

Progresos recientes han facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, los cuales pueden ser acoplados para formar anticuerpos específicos. Shalaby et al., J. Exp. Med.- 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico (ab')<sub>2</sub> completamente humanizada. Cada fragmento Fab' fue secretado separadamente de *E. coli* y son sometido a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de enlazarse a células que sobreexpresan el receptor de TGF-beta y células T humanas normales, así como de disparar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos tumorales de seno humanos.  
25

También han sido descritas Diversas técnicas para hacer y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun fueron enlazados a las porciones Fab' en dos anticuerpos diferentes por fusión genética. Los homodímeros del anticuerpo fueron reducidos en la región bisagra para formar monómeros y luego reoxidados para formar los heterodímeros de los anticuerpos. Este método también puede ser utilizado para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología “diacuerpo” descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) a provisto un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V<sub>L</sub>) mediante un enlazante que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena. De acuerdo con lo anterior, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios complementarios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de otro fragmento, formando por lo tanto dos sitios de enlazamiento al antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de cadena sencilla Fv (sFv) también ha sido reportada. Véase Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).  
30  
35  
40

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991).

Se pueden establecer los efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo estableciendo, por ejemplo, su capacidad para neutralizar, antagonizar o inhibir una actividad de TGF-beta, por ejemplo, previniendo sustancialmente al menos una de las actividades indeseables inhibitoras de crecimiento, inmunosupresoras, formadoras de estroma (los elementos de estroma que incluyen células inflamatorias, células endoteliales y fibroblastos), o promotoras del crecimiento independientes del anclaje de una TGF-beta madura, como se define en la literatura. El anticuerpo es así capaz de bloquear la actividad de todas las TGF-beta endógenas producidas por tumores y células linfoides supresoras (células T). Una manera de medir tal neutralización es mediante la inhibición del consumo de <sup>3</sup>H-timidina de una célula de fibroblastos de pulmón de mink, por ejemplo Mv-3D9, en donde a medida que la concentración del anticuerpo se incrementa la actividad de la TGF-beta disminuye de manera balanceada, bien sea lineal o no linealmente. La línea celular de pulmón de mink es muy sensible a los efectos inhibidores del crecimiento de TGF-beta y es un ensayo relativamente fácil de ejecutar. En general, el ensayo se lleva a cabo incubando las células con una mezcla de una TGF-beta y el anticuerpo en medio esencial mínimo que contiene glutamina 2 mM y 5% de suero bovino fetal durante 18 – 24 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% y luego pulsándola con 1 µCi de <sup>3</sup>H-timidina en 20 µl y recolectando después de 4 horas a 37°C. Preferiblemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular por TGF-beta hasta un grado mayor que el anticuerpo monoclonal 2G7. Otra manera de establecer efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo es probar si inhibe TGF-beta en un ensayo de proliferación celular mesangial de ratón como se cita en los ejemplos más adelante. Los anticuerpos aquí también  
45  
50  
55  
60

- son útiles en un ensayo de enlazamiento al receptor o radioreceptor de una forma convencional, por ejemplo incubando una mezcla de TGF-beta radiomarcada (por ejemplo, rhTGF-beta1 radioyodada) y el anticuerpo con células que contiene el receptor TGF-beta (por ejemplo células de fibroblasto de pulmón de mink como la línea celular Mv1Lu, la cual está disponible del ATCC como ATCC No. CCL-64), y determinando si el anticuerpo bloquea el enlazamiento de la TGF-beta marcada al receptor.
- Para seleccionar anticuerpos que inducen la muerte celular, puede establecerse la pérdida de la integridad de la membrana según se indica, por ejemplo, por el consumo de PI, azul de tripano o 7AAD con respecto al control. El ensayo preferido es el ensayo de consumo de PI utilizando células BT474. De acuerdo con este ensayo, las células BT474 (las cuales pueden ser obtenidas de la American Type Culture Collection (Manassas, VA)) son cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM): Ham's F-12 (50:50) suplementado con 10% de FBS inactivado (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. (Así, el ensayo se lleva a cabo en la ausencia de complemento y células efectoras inmunes). Las células BT474 son sembradas a una densidad de  $3 \times 10^6$  por placa en placas de 100 x 20 mM y se dejan unir durante la noche. Se remueve entonces el medio y se reemplaza con medio fresco solo o con medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal apropiado. Las células son incubadas durante un periodo de 3 días. Después de cada tratamiento, las monocapas son lavadas con solución salina regulada con fosfato (PBS) y desprendidas por tripsinización. Las células son centrifugadas entonces a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, y la pella es resuspendida en 3 ml de regulador de enlazamiento de  $Ca^{2+}$  en hielo seco (Hepes 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM), y se divide en alícuotas de 12 x 75 tubos de 35 mm con tapa drenante (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para eliminar los grumos de células. Los tubos reciben entonces PI (10 µg/ml). Las muestras pueden ser analizadas usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Estos anticuerpos que inducen niveles significativos estadísticamente de muerte celular según se determina mediante el consumo de PI pueden ser seleccionados como anticuerpos que inducen la muerte celular.
- Con el fin de seleccionar anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible el ensayo de enlazamiento a anexina utilizando células BT474. Las células BT474 son cultivadas y sembradas en placas como se discutió en el párrafo precedente. El medio es removido entonces y reemplazado con medio fresco solo o con un medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de 3 días, las monocapas son lavadas con PBS y desprendidas por tripsinización. Las células son centrifugadas entonces, resuspendidas en regulador de enlazamiento de  $Ca^{2+}$  y separadas en alícuotas en tubos como se discutió anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben entonces anexina marcada (por ejemplo anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras pueden ser analizadas utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Estos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de enlazamiento a la anexina con respecto al control son seleccionados como anticuerpos que inducen la apoptosis.
- Además del ensayo de enlazamiento a la anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN utilizando células BT474. Con el fin de llevar a cabo este ensayo, las células BT474 que han sido tratadas con el anticuerpo de interés como se describe en los dos párrafos precedentes son incubadas con 9 µg/ml de sonda de fluorescencia de HOECHST 33342™ durante 2 horas a 37°C y luego se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation), utilizando el software MODFIT LT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es dos veces o más (preferiblemente tres veces o más) que las células no tratadas (hasta 100% de células apoptóticas) pueden ser seleccionados como anticuerpos proapoptóticos utilizando este ensayo.
- Para seleccionar anticuerpos que se enlazan a un epítipo sobre TGF-beta enlazado por un anticuerpo de interés, puede llevarse a cabo un ensayo de entrecruzamiento de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativa o adicionalmente, puede llevarse a cabo un mapeo del epítipo por métodos conocidos en la técnica.
- La invención también es pertinente a inmunoconjugados que comprende un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos), o un isótopo radioactivo (esto es, un radioconjugado).
- Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados han sido descritos más arriba. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como la caliqueamicina, una maitansina (Patente de los Estados Unidos No 5, 208,020), un tricoteno, y el agente anticáncer CC1065, también son contemplados aquí).
- En una realización preferida de la invención, el anticuerpo es conjugado a una o más moléculas de maitansina (por ejemplo aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina por ejemplo, puede ser convertida a May-SS-Me, la cual puede ser reducida a May-SH3 y se puede hacer reaccionar con anticuerpo modificado (Chari et al, Cancer Research, 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado maitansinoide-anticuerpo.

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-TGF-beta conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir rupturas de ADN de cadena doble en concentraciones subpicomolares. Análogos estructurales de caliqueamicina que pueden ser utilizados incluyen, pero no se limitan a  $\gamma_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , N-acetil- $\gamma_1$ , PSAG y  $\theta^1$  (Hinman et al., Cancer Research, 53: 3336-3342 (1993) y Lode et al. Cancer Research, 58: 2925-2928 (1998)). Véanse también, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586; y 5,773,001.

Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden ser utilizados incluyen cadenas de difteria A, fragmentos activos de no enlazante de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica carantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricoticenos. Véase, por ejemplo, la WO 1993/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

Una variedad de isotopos radioactivos está disponible para la producción de anticuerpos anti-TGF-beta radioconjugados. Ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ , Re, Re, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P e isotopos radioactivos de Lu.

Pueden hacerse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-pyridylditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diaizoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolyene 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al. Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilen triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO 1994/11026. El enlazante puede ser un "enlazante escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, un enlazante lábil a los ácidos, un enlazante sensible a la peptidasa, enlazante de dimetilo o enlazante que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research, 52: 127-131 (1992)) pueden ser usados.

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-TGF-beta y agente citotóxico puede hacerse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

En aun otra realización, el anticuerpo puede ser conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en predireccinamiento tumoral en donde el conjugado anticuerpo-receptor es administrado al paciente, seguido por remoción del conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente aclarador y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que es conjugada a un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser utilizados en ADEPT conjugando el anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase WO 1981/01145) en un fármaco anticáncer activo. Véase, por ejemplo, WO 1988/07378 y la Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278.

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

Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contiene fosfato en fármacos libres; la arilsulfatasa útil para la conversión de profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; la citosina desaminasa útil para la conversión de 5-fluorocitosina no toxica en el fármaco anticáncer, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para la conversión de profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para la conversión de fármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuraminidasa útiles para la conversión de profármacos glicosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa útil para la conversión de fármacos derivados con  $\beta$ -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como la penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útil para la conversión de fármacos derivados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden utilizarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature, 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe aquí para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas útiles en esta invención pueden ser enlazadas covalentemente a los anticuerpos anti-TGF-beta por técnicas bien conocidas en el arte tales como el uso de reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales discutidos más arriba. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos una región de enlazamiento al antígeno de un anticuerpo de la invención enlazada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima adecuada pueden ser construidas utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984)).

Se contemplan aquí otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser enlazado a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilén glicol, polipropilén glicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilén glicol y polipropilén glicol. El anticuerpo también puede ser atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfases (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetil celulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas están divulgadas en Remington Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos anti-TGF-beta divulgados aquí también pueden ser formulados como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo son preparados por métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y WO 1997/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. En la Patente de los Estados Unidos No. 5,013,556 se divulgan liposomas con tiempos de circulación potenciados.

Liposomas particularmente útiles pueden ser generados mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extrudidos a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos de Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden ser conjugados a los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

### III. Vectores, células anfitrionas y métodos recombinantes

La invención también provee ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta humanizado, vectores y células anfitrionas que comprenden el ácido nucleico y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica es aislado e insertado en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal es aislado fácilmente y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector incluyen en general, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señalización, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de transcripción-terminación.

#### (i) Componente de secuencia de señalización

El anticuerpo anti-TGF-beta de esta invención puede ser producido de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, el cual es preferiblemente una secuencia de señalización u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el terminal N de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia de señalización heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que es reconocida y procesada (esto es, escindida por una peptidasa de señalización) por la célula anfitriona. Para células anfitrionas procarióticas que no reconocen y procesan la secuencia de señalización natural del anticuerpo anti-TGF-beta, la secuencia de señalización es sustituida por una secuencia de señalización procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de fosfatasa alcalina, penicilinasasa Ipp, o guías de enterotóxina II estables al calor. Para la secreción de levadura la secuencia de señalización natural puede ser sustituida, por ejemplo, por el líder de invertasa de levadura, el líder de factor  $\alpha$  (incluyendo las guías del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), la guía de fosfatasa ácida, la guía de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señalización descrita en WO 1990/13646. En expresión en células de mamíferos, están disponibles las secuencias de señalización de mamíferos así como las guías secretoras virales, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex.

El ADN para tal región precursora está ligado en el marco de lectura para el ADN que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta.

#### (ii) Origen del componente de replicación

5 Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células anfitrionas seleccionadas. En general, los vectores de clonación esta secuencia es aquella que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico anfitrión, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomamente. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuada para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

10 (iii) Componente del gen de selección

15 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típico codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas complementarias, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponibles para medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitriona. Estas células son transformadas exitosamente con un gen heterólogo que produce una proteína que confiere resistencia al fármaco y sobrevive así al régimen de selección. Ejemplos de tales selecciones dominantes usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

20 Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y II, preferiblemente genes de metalotioneina de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

25 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR son identificadas primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula anfitriona apropiada cuando se emplea el DHFR tipo silvestre es la línea celular de ovarios de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

30 Alternativamente, las células anfitrionas (particularmente anfitriones tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-TGF-beta, proteína DHFR tipo silvestre, y otros marcadores seleccionables tales como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden ser seleccionados por crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 4,965,199.

35 Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* provee un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de una célula anfitriona de levadura provee entonces un ambiente efectivo para detectar la transformación por crecimiento en la ausencia de triptófano. De la misma manera, cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC20, 622 o 38,626) son complementadas por plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

40 Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1.6  $\mu$ m pKD1 pueden ser utilizados por la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Alternativamente, un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina recombinante de ternera fue reportado para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). Vectores de expresión de copias múltiples estables para secreción de albumina de suero humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces* también fueron divulgados. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

45 (iv) Componente promotor

50 Los vectores de expresión y clonación contienen usualmente un promotor que es reconocido por el organismo anfitrión y está enlazado operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta. Los promotores adecuados para uso con anfitriones procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) enlazado operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta.

Las secuencias promotoras son conocidas para los eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 hasta 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes de la región CNCAAT (SEQ ID NO: 46) en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 47) que puede ser la señalización para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias son insertadas adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con anfitriones de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, exoquinasa, piruvato de descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores en levaduras, que son promotores inducibles que tiene la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables por la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levaduras están descritos adicionalmente en EP 73,657. Los potenciadores de levaduras también son usados ventajosamente como los promotores de levaduras.

La transcripción del anticuerpo anti-TGF-beta a partir de vectores en células anfitrionas de mamíferos es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de viruela aviar, adenovirus (tales como, adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y lo más preferiblemente Virus de Simio 40 (SV40), promotores heterólogos en mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y promotores de choque por calor, dado que tales promotores son compatibles con los sistemas celulares anfitriones.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que contiene también el origen viral de SV40 de la replicación. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano es obtenido convenientemente de un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en anfitriones de mamíferos utilizando el virus de papiloma bovino como vector es divulgado en la Patente de los Estados Unidos No. 4,419,446. Una modificación de este sistemas está descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 4,601,978. Véase también Reyes et al., Nature, 297: 598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de el virus de herpes simplex. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus de sarcoma de Rous puede ser utilizado como promotor.

#### (v) Componente del elemento potenciador

La transcripción del ADN que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta de esta invención por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas de genes de mamíferos (globina, elastasa, albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usara un potenciador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100 - 270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede ser dividido en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia de codificación del anticuerpo anti-TGF-beta, pero está localizado preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

#### (vi) Componente de la terminación de transcripción

Los vectores de expresión usados en células anfitrionas eucariotas (por ejemplo, células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias son disponibles comúnmente del extremo 5', ocasionalmente del extremo 3', de regiones no traducidas de ADN o ADNc eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase WO 1994/11026 y el vector de expresión divulgado allí.

#### (vii) Selección y transformación de células anfitrionas

Células anfitrionas adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores presentes son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Procariotas adecuadas para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo,

5 *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. Licheniformis* (por ejemplo, *B. Licheniformis* 41P divulgado en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un anfitrión de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

10 Además de las procariontes, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o levaduras son anfitriones para clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-TGF-beta. La *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadería, es el más comúnmente usado entre los microorganismos anfitriones eucariotas inferiores. Sin embargo, un buen número de otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles aquí, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hosts such as, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC56,500) *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* como anfitriones tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

20 Células anfitrionas adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado anti-TGF-beta son derivadas de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Numerosas cepas de baculovirus y variantes y células anfitrionas de insectos permisivas correspondientes de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori* han sido identificados. Una variedad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden ser utilizados como los virus presentes, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

25 Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco pueden ser utilizadas como anfitriones.

30 Sin embargo, el interés ha sido creciente en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivos de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebe (BHK, ATCC CCL 10); células/-DHFR de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. US 77:4216 (1980), incluyendo DG44 (Urlaub et al., Som. Cell and Mol. Gen., 12: 555-566 (1986)) y líneas celulares DP12); células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

40 Las células anfitrionas son transformadas con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-TGF-beta y cultivadas en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para promotores de inducción, transformantes de selección o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células anfitrionas

45 Las células anfitrionas utilizadas para producir el anticuerpo anti-TGF-beta de esta invención pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células anfitrionas. Además, cualquiera de los medios descritos, por ejemplo en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979); Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980); Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 1990/03430; WO 1987/OO195; o la Patente de los Estados Unidos Re. No. 30,985 pueden ser utilizados como medios de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios pueden ser implementados según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), reguladores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes usualmente en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede ser incluido también en concentraciones apropiadas que serían conocidas para los experimentados en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas utilizadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el tecnólogo experimentado de manera normal.

## (ix) Purificación de anticuerpo anti-TGF-beta

5 Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede ser producido intracelularmente o en el espacio periplasmático, o secretado directamente en el medio. Si el anticuerpo es producido de manera intracelular, como una primera etapa, los residuos de partículas, bien sea de células anfitrionas o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplasmático de *E. coli*. En resumen, la pasta celular es descongelada en la presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden ser removidos por centrifugación. Cuando el anticuerpo es secretado hacia el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión son concentrados primero generalmente utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON™ o MILLIPORE PELLICON™. Un inhibidor de proteasa tal como fluoruro de fetilmetilsulfonilo (PMSF) puede ser incluido en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

15 La composición anticuerpos preparada a partir de las células puede ser purificada utilizando por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad, siendo la cromatografía por afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuabilidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A puede ser utilizada para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62: 1-13 (1983)). La proteína G es recomendada para todos los isotipos de ratón y para  $\gamma 3$  humana (Guss et al., *EMBO J.*, 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es lo más frecuentemente agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Matrices estables mecánicamente tales como vidrio o poli (estirendivinil) benceno de poro controlado permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamientos más cortos que los que pueden ser alcanzados con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio  $C_{H3}$ , la resina BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol cromatografía por HPLC en fase reversa sobre sílica, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE, y precipitación por sulfato de amonio están también disponibles dependiendo del anticuerpo que va a ser recuperado.

30 Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede ser sometida a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH utilizando un regulador de elusión y un pH entre aproximadamente 2.5-4.5, llevada a cabo preferiblemente a concentraciones bajas de sal (por ejemplo desde aproximadamente 0-0.25 M de sal).

## IV. Formulaciones farmacéuticas

35 Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan por almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen reguladores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilobencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albumina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteínas); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG). Formulaciones liofilizadas preferidas del anticuerpo anti-TGF-beta están descritas en WO 1997/048011.

55 La formulación presente también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente uno al otro. Por ejemplo, puede ser deseable proveer adicionalmente anticuerpos que se enlazan a HER-2, EGFR, TGF-beta (por ejemplo un anticuerpo que se enlace a un epitopo diferente sobre antígenos TGF-beta), ErbB3, ErbB4 o factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en la formulación. Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal, un fármaco direccionado a TGF-beta, un agente antiangiogénico, y/o un cardioprotector. Tales moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito buscado.

Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfases, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, y sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas están divulgadas en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli (2-hidroxietil metacrilato) o poli (alcohol vinílico)), poliláctidos, Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico, y  $\gamma$  etil-L-glutamato, acetato de etileno vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico - ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico - ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a utilizar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

#### V. Tratamiento con los anticuerpos anti-TGF-beta

Se contempla que, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos anti-TGF-beta pueden ser utilizados para tratar diversas enfermedades o trastornos, como se define en las reivindicaciones. Condiciones o trastornos de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemias y enfermedades malignas linfoides; y otros trastornos tales como trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromales, blastocélulas, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

En general, el trastorno que se va a tratar es un trastorno de TGF-beta, lo más preferiblemente cáncer. Ejemplos de cánceres que pueden ser tratados aquí incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o enfermedades malignas linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

En una realización, el cáncer será uno que exprese (o pueda sobreexpresar) un receptor de TGF-beta. Ejemplos de cánceres que pueden expresar/sobreexpresar los receptores de TGF-beta incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. Sin embargo, el cáncer que va a ser tratado por el anticuerpo presente puede ser cualquier cáncer, no simplemente aquellos que expresen o sobreexpresen el receptor de TGF-beta.

Si el cáncer que va a ser tratado aquí puede ser uno caracterizado por activación excesiva del receptor de TGF-beta, tal activación excesiva puede ser atribuible a sobreexpresión o a una producción incrementada del receptor de TGF-beta. En una realización de la invención, se llevará a cabo un diagnóstico o ensayo de pronóstico para determinar si el cáncer del paciente está caracterizado por una activación excesiva del receptor de TGF-beta. Por ejemplo, puede determinarse la amplificación de genes de TGF-beta y/o la sobreexpresión de un receptor de TGF-beta en el cáncer. Están disponibles en la técnica diversos ensayos para determinar tal amplificación/sobreexpresión, por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC); FISH, transferencia southern, o técnicas de PCR.

Además, la sobreexpresión o amplificación del receptor de TGF-beta puede ser evaluado utilizando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se enlaza a la molécula que va a ser detectada y está marcado con un marcador detectable (por ejemplo un isótopo radioactivo) y barriendo externamente el paciente para localizar el marcador.

Se describen a continuación ensayos útiles para determinar si el anticuerpo humanizado presente es encontrado para potenciar la actividad de reducción tumoral de TNF- $\alpha$  en pruebas tanto *in vivo* como *in vitro*:

## A. Procedimiento de ensayo citotóxico

En el sistema de ensayo L-929 es un ensayo *in vitro* conveniente que permite una visión rápida de la actividad del anticuerpo presente opcionalmente en conjunción con un regulador apropiado de función inmune. Su grado de correlación con el ensayo de necrosis tumoral *in vivo* de Carswell et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3666 (1975) es desconocido hasta el momento; sin embargo, puesto que utiliza células tumorales murínicas específicamente, se espera que la correlación sea alta. Las proteínas del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y linfotóxina (TNF-beta) dan actividad en este ensayo. El ensayo es similar en concepto al divulgado en la Patente de los Estados Unidos No. 4, 457,916 el cual utilizó células L-M murínicas y tinción con azul de metileno. Sin embargo, el ensayo L-929 ha demostrado estar correlacionado (para TNF- $\alpha$  derivado de células HL-60) con la citotoxicidad de la línea celular tumoral humana.

En el sistema de ensayo L-929 presente, las células L-929 se preparan durante la noche como monocapas en placas de microtitulación. Las mejores muestras son diluidas dos veces a través de la placa, irradiadas con UV y luego agregadas sobre las monocapas de células preparadas. Los medios de cultivo en los pozos son llevados entonces a 1  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D. Las placas se dejan incubar durante 18 horas a 37°C y luego las placas se clasifican visualmente bajo el microscopio. A cada pozo se da una marca de 25, 50, 75 o 100% indicando el grado de muerte celular en el pozo. Se define una unidad de actividad TNF como el recíproco de la dilución al cual se presenta el 50% de mortandad.

B. Ensayos *in vivo*

Las preparaciones también pueden probarse en cuanto a su actividad utilizando la capacidad del anticuerpo anti-TGF-beta para matar o reprimir el crecimiento de tumores y para proteger el animal que porta el tumor de la mortalidad. Se inyectan ratones Balb/c por vía subcutánea con diversos tipos de células tumorales para crear un tumor localizado. Las líneas de células tumorales incluyen fibrosarcoma de ratón MethA, obtenido de una suspensión celular de fluido de ascites, y MCF-7, un carcinoma de seno humano que es administrado como una aglomeración de 1  $\text{mm}^3$  de células.

Para el ensayo, se inyectan ratones hembra Balb/c (19 – 22 g) por vía subcutánea con una aguja de calibre 26 bien sea con una suspensión que tiene 5 x 10<sup>5</sup> células de fibrosarcoma en 0.1 ml de medio o con los aglomerados de MCF-7. (La suspensión de fibrosarcoma se prepara a partir de fluido de ascites de 8 días por recuento de células y dilución con medio libre de suero). Después de 9 -10 días, cuando el tumor se hace palpable, se inyecta por vía intravenosa 1  $\mu\text{g}$  por ratón de TNF- $\alpha$ , y se repite la administración del TNF- $\alpha$ , si se desea, en los días subsiguientes. Los resultados se establecen midiendo el volumen del tumor y por la rata de supervivencia. La prueba se repite utilizando inyecciones secuenciales separadas de 1  $\mu\text{g}$  por ratón de TNF- $\alpha$  y 10 mg/kg por ratón de anticuerpo 4A11. El anticuerpo de prueba es comparado contra estos agentes en cuanto a su actividad.

Cuando el cáncer que va a ser tratado es un cáncer dependiente de hormonas, la expresión de la hormona (por ejemplo, andrógenos) y/o su receptor cognato en el tumor puede establecerse utilizando cualquiera de los diversos ensayos disponibles, por ejemplo, como se describió anteriormente. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede ser diagnosticado por tener un cáncer independiente de hormona en el que el paciente no responde más a la terapia con antiandrógeno.

En ciertas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo anti-TGF-beta conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado y/o la proteína TNF-beta a la cual está enlazado es/son internalizados por las células, dando como resultado una eficacia terapéutica incrementada del inmunoconjugado en la matanza de las células cancerosas a las cuales se enlaza. En una realización preferida, el agente citotóxico apunta o interfiere con el ácido nucleico en las células cancerosas. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen maytansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

Los anticuerpos anti-TGF-beta o inmunoconjugados son administrados al paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continuo durante un periodo de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Se prefiere la administración intravenosa, intraperitoneal o subcutánea del anticuerpo, siendo particularmente preferidas las rutas subcutánea o intraperitoneal. Una programación de administración preferida es de aproximadamente 2–3 veces por semana, dependiendo del mamífero en particular que está siendo tratado, el tipo de anticuerpo y otros factores bien conocidos por el practicante sanitario. Sin embargo, son operables aquí otras programaciones de administración.

Otros regímenes terapéuticos pueden ser combinados con la administración del anticuerpo anti-TGF-beta. La administración combinada incluye coadministración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica simple, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay un periodo de tiempo en el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

En una realización preferida, el paciente es tratado con dos anticuerpos anti-TGF-beta diferentes.

También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-TGF-beta con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado con el tumor. El otro anticuerpo en este caso puede enlazarse, por ejemplo, con un antígeno tal como HER-2, EGFR, ErbB3, ErbB4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un marcador o antígeno de superficie de células B (un antígeno expresado sobre la superficie de una célula B que puede ser el objetivo de un antagonista que se enlaza a la misma), tal como por ejemplo, los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para descripciones, véase *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores superficiales de células B incluyen RP105, FcRH2, CR2 de células B, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Bt1g, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, y 239287. El marcador superficial de células B de interés particular se expresa preferencialmente en células B en comparación con los tejidos que no son de células B de un mamífero y pueden ser expresado tanto en células B precursoras como células B maduras. Los marcadores de superficie de células B preferidos aquí son CD20 y CD22. En otro aspecto, el anticuerpo TGF-beta puede ser combinado con un agente antiangiogénico, el cual actúa para inhibir la angiogénesis. Un ejemplo es un antagonista del VEGF, tal como un anticuerpo, por ejemplo AVASTIN™.

En una realización, el tratamiento de la presente invención involucra la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) de anti-TGF-beta y uno o más reguladores de la función inmune en un mamífero, tal como citoquinas, así como agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de la antraciclina. La preparación y las programaciones de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden ser utilizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se haya determinado empíricamente por el sanitario experimentado. La preparación y programaciones de dosificación para tales quimioterapias también están descritas en *Chemotherapy Service*, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

El anticuerpo puede ser combinado con un compuesto antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifen o un inhibidor de aromatasas tal como anastrozol; un agente antiprogesterona tal como onapristona (véase, EP 616 812); o un agente antiandrógeno tal como frutamida, en dosificaciones conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer que va a ser tratado es un cáncer independiente de las hormonas, el paciente puede haber sido sometido previamente a una terapia antihormonal y, después de que el cáncer se convierte en independiente de las hormonas, pueda administrarse al paciente el anticuerpo (y opcionalmente otros agentes tal como los descritos aquí) anti-TGF-beta.

En algunas ocasiones, puede ser beneficioso también coadministrar un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción del miocardio asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. También se puede administrar un agente citotóxico. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede ser sometido a remoción quirúrgica de las células cancerosas y/o terapia de radiación.

Los anticuerpos anti-TGF-beta presentes también pueden ser combinados con un fármaco direccionado a EGFR tal como los discutidos anteriormente en la sección de definiciones dando como resultado un efecto terapéutico complementario y potencialmente sinérgico.

Dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las que se utilizan actualmente y pueden ser disminuidas debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo anti-TGF-beta.

Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que va a ser tratada, tal como se definió anteriormente, la severidad y trascurso de la enfermedad, de si el anticuerpo es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos, terapias previas, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico responsable. El anticuerpo es administrado adecuadamente al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0.1 – 20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento es sostenido hasta que se presenta una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

La dosificación preferida del anticuerpo estará en el rango de aproximadamente 0.05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. Así, una o más dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) puede ser administrada al paciente. Tales dosis pueden ser administradas de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal forma que el paciente recibe desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20, por ejemplo aproximadamente 6 dosis, del anticuerpo anti-TGF-beta). Una dosis de carga más alta inicial, seguida por una o más dosis más bajas, puede ser administrada. Un

régimen de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TGF-beta. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia es monitoreado fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

- 5 Alternativamente, el anticuerpo se administra adecuadamente de manera seriada o en combinación con tratamientos radiológicos - irradiación o introducción de sustancias radioactivas- como los referidos en UICC (Ed.), *Klinische Onkologie*, Springer-Verlag (1982).

Aparte de la administración de la proteína anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia genética. Tal administración de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo es abarcada por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo", Véase, por ejemplo, la WO 10 1996/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 concerniente al uso de terapia genética para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos metodologías principales para hacer llegar el ácido nucleico (contenido opcionalmente en un vector) a las células del paciente, *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo* el ácido nucleico se inyecta directamente al paciente, usualmente en el sitio donde se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente son retiradas, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas, y las células modificadas son administradas al paciente bien sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que son implantadas al paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,892,538 y 5,283,187). Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico es transferido en células cultivadas *in vitro*, o transferidas *in vivo* a las células del anfitrión previsto. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácidos nucleicos en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado comúnmente para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* preferidas actualmente incluyen transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus de herpes simplex I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proveer la fuente de ácido nucleico con un agente que apunte a las células objetivo, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular o de la célula objetivo, un ligando para un receptor sobre la célula objetivo, etc. Cuando se emplean liposomas, las proteínas que se enlazan a una proteína de una membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis pueden ser utilizadas para direccionar y/o facilitar la toma, por ejemplo, proteínas cápsido o fragmentos de las mismas apropiadas para un tipo de célula particular, anticuerpos o proteínas que experimentan internalización en la ciclización, y proteínas que apuntan a la localización intracelular y potencian la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por el receptor están descritas, por ejemplo, por Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432 (1987) y Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3410-3414 (1990). Para revisión de los protocolos de terapia genética y de marcación de genes conocidas actualmente, véase Anderson et al., *Science*, 256: 808-813 (1992). Véase también WO 1993/25673 y las referencias citadas allí.

En una realización específica, el cáncer, tal como cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de seno, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer pancreático o cáncer de próstata, se trata en un mamífero, preferiblemente un humano, administrando al mamífero una cantidad efectiva del anticuerpo de TGF-beta y un anticuerpo que se enlaza a VEGF, opcionalmente junto con cualquier otro agente adecuado tal como se define aquí. Preferiblemente, el anticuerpo de TGF-beta es un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente se enlaza a uno o más de los siguientes: TGF-beta1 y TGF-beta2, y todavía más preferiblemente se enlaza a al menos a TGF-beta o ambos TGF-beta1 y TGF-beta2, y lo más preferiblemente es el anticuerpo humanizado como se define aquí. En otra realización, el anticuerpo que se enlaza a VEGF es un anticuerpo monoclonal y más preferiblemente bloquea o neutraliza VEGF y/o bloquea el enlazamiento de VEGF a uno o ambos de sus receptores.

#### VI. Artículos de manufactura

En otra realización de la invención, se provee un artículo de manufactura que contiene los materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un contenedor y una etiqueta o inserto de empaque o asociado con el contenedor. Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringa, etc. Los contenedores pueden ser formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor mantiene una composición que es efectiva para el tratamiento de la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el anticuerpo anti-TGF-beta humanizado presente. La etiqueta o inserto del empaque indica que la composición es utilizada para tratar la condición de selección, tal como cáncer. En una realización, la etiqueta o inserto de empaque indica que la composición que comprende el anticuerpo puede ser utilizada para tratar un trastorno de TGF-beta, por ejemplo, para tratar un cáncer que expresa un receptor de TGF-beta. Además, la etiqueta o inserto de empaque puede indicar que el paciente que va a ser tratado es uno que tiene cáncer

caracterizado por activación excesiva de un receptor TGF-beta. La etiqueta o inserto de empaque también puede indicar que la composición puede ser utilizada para tratar cáncer, en donde el cáncer no está caracterizado por sobreexpresión del receptor de TGF-beta. En otras realizaciones, el inserto de empaque puede indicar que el anticuerpo o composición puede ser utilizado para tratar cáncer de seno (por ejemplo, cáncer de seno metastásico);

5

Además, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende el anticuerpo humanizado presente, y (b) un segundo contenedor con una composición contenida allí, en donde la composición comprende un agente terapéutico diferente al anticuerpo humanizado. El artículo de manufactura en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un inserto de empaque que indica que la primera y segunda composiciones pueden ser utilizadas en combinación para tratar un trastorno de TGF-beta tal como cáncer. Tal agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección precedente (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector, y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluyendo una citoquina). Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender adicionalmente un segundo (o tercero) contenedor que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

10

15

20

#### VII. Usos no terapéuticos del anticuerpo anti-TGF-beta

Los anticuerpos (por ejemplo los anticuerpos anti-TGF-beta humanizados) de la invención tienen aplicaciones adicionales no terapéuticas.

Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser utilizados como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos son inmovilizados sobre una fase sólida tal como resina de SEPHADEX<sup>TM</sup> o papel de filtro, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado es puesto en contacto con una muestra que contiene la proteína TGF-beta (o fragmento de la misma) que va a ser purificada, y después de esto el soporte es lavado con un solvente adecuado que removerá sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína de TGF-beta, la cual está enlazada al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte es lavado con otro solvente adecuado, tal como regulador de glicina, pH 5.0, que liberará la proteína de TGF-beta del anticuerpo.

25

30

Los anticuerpos anti-TGF-beta también pueden ser utilizados en ensayos de diagnóstico para proteína TGF-beta, por ejemplo, detectar su expresión en células, tejidos o suero específicos.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo será marcado típicamente con una unidad estructural detectable. Hay disponibles numerosos marcadores que pueden ser agrupados generalmente en las siguientes categorías:

35

(a) Radioisótopos, tales como <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H y <sup>131</sup>I. El anticuerpo puede ser marcado con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs, (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede ser medida utilizando conteo de centelleo.

40

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, Lissamina, ficoeritrina y rojo de Texas. Los marcadores fluorescentes pueden ser conjugados y el anticuerpo puede ser utilizado en las técnicas divulgadas, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, supra. La fluorescencia puede ser cuantificada utilizando un fluorímetro.

45

(c) Hay disponibles diversos marcadores de enzima-sustrato y la Patente de los Estados Unidos No. 4,275, 149 provee una revisión de algunos de ellos. La enzima en general cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede ser medido utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, el cual puede ser medido espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia están descritas más arriba. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede emitir entonces luz que puede ser medida (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo), o entrega energía un receptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de los Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β-galactocidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos están descritas en O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzymes

50

55

immunoassay", in *Methods in Enzym.* (Ed., J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press New York, 73: 147-166 (1981).

**Ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:**

5 (i) peroxidasa de rábano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor colorante (por ejemplo, ortofenilén diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico 4-metillumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

10 Otras numerosas combinaciones enzimas-sustrato están disponibles para los experimentados en la técnica. Para una revisión general de estas, véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,275,149 y 4,318,980.

15 Algunas veces, el marcador es conjugado directamente con el anticuerpo. El experto en la técnica estará al tanto de diversas técnicas para alcanzar esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser conjugado con biotina, y cualquiera de estas amplias categorías de marcadores mencionadas anteriormente pueden ser conjugadas con avidina, o viceversa. La biotina se enlaza selectivamente a la avidina, y así, el marcador puede ser conjugado con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para alcanzar una conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo es conjugado con un hapteno pequeño (por ejemplo digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente es conjugado con un anticuerpo antihapteno (por ejemplo, anticuerpo antidigoxina). Así, la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo puede ser lograda.

20 En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-TGF-beta no puede ser marcado, y la presencia del mismo puede ser detectado utilizando un anticuerpo marcado que se enlaza al anticuerpo de TGF-beta.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de enlazamiento competitivo, ensayos sándwich directos e indirectos, y en ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

25 Para inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser fresca o congelado o puede estar embebida en parafina y fijada con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos pueden ser utilizados también en ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, el anticuerpo es marcado con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ), de tal manera que, por ejemplo, un tumor puede ser localizado utilizando inmunoescintigrafía.

30 Como materia conveniente, los anticuerpos de la presente invención pueden ser provistos en un kit, esto es una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo es marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que provee el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, reguladores (por ejemplo un regulador de bloqueo o un regulador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden ser variadas ampliamente para proveer las concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden ser provistos como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que por disolución proveerán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

40 El anticuerpo presente también es útil para generación de imágenes *in vivo*, en donde el anticuerpo marcado es administrado a un huésped, preferiblemente la corriente sanguínea, y se prueba la presencia y localización del anticuerpo marcado en el huésped. Esta técnica de imágenes se utiliza adecuadamente en la estadificación y tratamiento de neoplasmas. El anticuerpo es marcado adecuadamente con cualquier unidad estructural que sea detectable en un huésped, incluyendo indicadores no radioactivos detectables, por ejemplo, por resonancia magnética nuclear, o por otros medios conocidos en la técnica. Preferiblemente, sin embargo, el marcador es un radiomarcador incluyendo yodo, por ejemplo  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ , selenio, quelatos difuncionales, cobre, por ejemplo  $^{67}\text{Cu}$ , tecnecio, por ejemplo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y renio, por ejemplo  $^{186}\text{Re}$  y  $^{188}\text{Re}$ . El radioisótopo es conjugado a la proteína por cualquier medio, incluyendo compuestos quelantes de metales o lactoperoxidasa, o técnicas yodogénicas para yodación.

45 El anticuerpo 2G7 monoclonal murínico fue depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209, USA (ATCC) como HB10240 el 28 de septiembre de 1989; y el anticuerpo monoclonal murínico 4A11 fue depositado como ATCC HB10241 el 28 de septiembre de 1989.

50 Detalles adicionales de la invención están ilustrados mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Las divulgaciones de todas las citaciones en la especificación se incorporan expresamente aquí como referencia.

**Ejemplo 1**

Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales 2G7 y 4A11

## A. Procedimientos de ensayo

## I. Determinación por ELISA

- 5 Placas de ensayo de poliestireno de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de TGF-beta1 purificado a 1 µg/ml en regulador de carbonato de pH 9.6 durante 18 horas a 4°C. Las placas recubiertas fueron bloqueadas con 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS (denominado BPBS) durante una hora a 22°C, lavadas con surfactante TWEEN 20™ al 0.05% en PBS (denominado PBST), e incubadas con 100 µl de sobrenadantes de hibridoma durante una hora a 22°C. Las placas fueron lavadas con PBST, y los anticuerpos enlazados fueron detectados con un IgG de cabra antirratón conjugado con peroxidasa (Tago, Burlingame, CA). Las placas fueron lavadas con PBST, y se agregó sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina a 100 µl/pozo. La reacción fue detenida después de 15 minutos y se determinó la densidad óptica a 492 nm sobre un lector de placas UVMAX™ (Molecular Devices, Palo Alto, CA).

## II. Yodación de rTGF-beta1

- 15 La TGF-beta1 purificada fue yodada mediante un procedimiento modificado utilizando CHLORAMINA T™ sal de sodio de n-cloro-para-tolueno sulfonamida (Greenwood et al., Biochem. J., 89: 114 (1963)). En resumen, 10 µg de rTGF-beta1 purificada fueron marcados con 1 mCi de Na<sup>125</sup>I sobre hielo utilizando tres adiciones secuenciales de 20 µl de CHLORAMINA T™ n-cloro-para-tolueno sulfonamida sal de sodio 0.1 mg/ml separada por incubaciones de dos minutos. La reacción fue detenida utilizando adiciones secuenciales de 20 µl de N-acetil tirosina 50 mM, yoduro de potasio 1 M, seguido por 200 µl de urea 8 M. La rTGFbeta1 yodada fue separada del Na<sup>125</sup>I libre por HPLC utilizando una columna C18 y un gradiente de ácido trifluoroacético/acetronitrilo, y las fracciones que contenían el pico principal fueron reunidas y almacenadas a -70°C (actividad específica 112 µCi/µg).

## III. Radioinmunoensayo de captura de antígeno

- 25 Tiras de microtitulación IMMULON™ 2 "REMOVAWELL"™ (Dynatech, Chantilly, VA) fueron recubiertas con 5 µg/ml de IgG de cabra antirratón (Boehringer Mannheim) en carbonato de pH 9.6 durante 18 horas a 4°C. Los pozos fueron lavados con PBST, bloqueados con PBS que contenía 0.1% de gelatina (denominado PBSG), lavado con PBST, e incubado con sobrenadantes de hibridoma durante cuatro horas a 22°C. Los pozos fueron lavados con PBST, y se agregaron aproximadamente 75,000 CPM/pozo de <sup>125</sup>I-rTGF-beta1, en 100 µl de gelatina al 0.1% en PBST, y se incubó durante dos horas a 22°C. Las placas fueron lavadas con PBST, y el <sup>125</sup>I-rTGF-beta1 enlazado fue cuantificado sobre un contador GAMMAMASTER™ (LKB, Suecia).

IV. Inmunoprecipitación de <sup>125</sup>I-rTGF-beta

- 35 La especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-TGF-beta fue evaluada también en cuanto a su capacidad para inmunoprecipitar la <sup>125</sup>I-rTGF-beta1 o la <sup>125</sup>I-TGF-beta2 porcina derivada de plaquetas (R & D Systems, Minneapolis, MN; actividad específica 103.4 µCi/µg). Dos µg de anticuerpo monoclonal purificado fueron incubados en 5 x 10<sup>4</sup> CPM de <sup>125</sup>I-rTGF-beta1 o <sup>125</sup>I-TGF-beta2 durante dos horas a 22°C. Los inmunocomplejos fueron convertidos en pellas con agarosa de proteína A-SEPHAROSE™ (Repligen, Cambridge, MA) recubierto con IgG antirratón de conejo (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) y subsecuentemente lavada 3 X con PBST. Los complejos fueron disociados de la agarosa de proteína A-SEPHAROSE™ con regulador reductor de muestra, sometido a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), y expuesto a autorradiografía.

## 40 V. Determinación de la afinidad de anticuerpos monoclonales de TGF-beta

- El procedimiento de radioinmunoensayo a fase sólida descrito por Mariani et al., J. Immunol. Methods, 71: 43 (1984) fue utilizado para determinar las afinidades de los anticuerpos monoclonales específicos de TGF-beta. En resumen, los anticuerpos de monoclonales anti-TGF-beta purificados fueron recubiertos sobre tiras de microtitulación IMMULON™ 2 "REMOVAWELL"™ en regulador de carbonato de pH 9.6 durante 18 horas a 4°C. Los pozos fueron lavados y bloqueados como se describió anteriormente. Se agregaron 40,000 CPM/pozo tanto de <sup>125</sup>I-rTGFbeta1 como de <sup>125</sup>I-TGF-beta2 porcino (R & D Systems), en 50 µl de PBSG, a soluciones 2 veces en serie de rTGF-beta1 o TGF-beta2 porcino variando desde 2500 a 9.7 ng/pozo en 50 µl de PBSG. La mezcla resultante fue incubada durante 18 horas a 4°C. Los pozos fueron lavados y contados como se describió anteriormente y las constantes de afinidad fueron determinadas por el análisis Scatchard (Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)), la cual produjo resultados similares que el análisis de regresión no lineal de Antoni y Mariani, J. Immunol. Meth., 83: 61 (1985).

## VI. Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de fluido de ascites

Cultivos de hibridoma parental que secretaban anticuerpo positivo en los ensayos anteriores fueron clonados limitando la dilución y el crecimiento en fluido de ascites en ratones Balb/c (Potter et al., JNCI, 49: 305 (1972)) y cebado con cebador PRISTANE™. Los anticuerpos monoclonales fueron purificados del fluido de ascites sobre agarosa de proteína A-SEPHAROSE™ y diluidos en ácido acético 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 2.4, utilizando procedimientos establecidos (Goding, J. Immunol. Methods, 20: 241 (1978)) y almacenados estériles en PBS a 4°C.

#### VII. Neutralización de anticuerpos monoclonales en actividad específica de TGF-beta *in vitro*

El ensayo de TGF-beta *in vitro* utilizó la línea celular de fibroblastos de pulmón de mink, Mv-3D9 (subclonado a partir de Mv1Lu, el cual está disponible en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, como ATCC No. CCL-64). En resumen, los anticuerpos monoclonales anti-TGF-beta purificados y los controles fueron incubados con rTGF-beta1, o bien con TGF-beta2 porcino nativo (R & D Systems), o rTGF-beta3 (Derynck et al., Nature, supra) a una concentración final de 1000 - 2000 pg/ml durante 18 horas a 4°C. Cincuenta µl de estas mezclas fueron agregados a placas de microtitulación de 96 pozos seguidos por  $1 \times 10^4$  de células Mv-3D9, en 50 µl de medio esencial mínimo que contenía glutamina 2 mM y suero bovino fetal al 5%, y se incubó durante 18 - 24 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Los pozos fueron pulsados con un µCi de <sup>3</sup>H-timidina en 20 µl y recolectados después de 4 horas a 37°C y contados en un contador de centelleo. El porcentaje de inhibición del consumo de <sup>3</sup>H-timidina para cada dilución del estándar de TGF-beta fue utilizado para calcular la actividad de TGF-beta en pg/ml del anticuerpo monoclonal de control negativo y de las muestras de TGF-beta específicas monoclonales tratadas con anticuerpo.

#### VIII. Isotipificación de anticuerpos monoclonales

La isotipificación de los anticuerpos monoclonales reactivos a TGF-beta1 fue llevada a cabo utilizando la tecnología de la máquina de selección por fluorescencia PANDEX™. Partículas de poliestireno recubiertas con antisuero IgG antirratón de rata fueron utilizadas para enlazar el anticuerpo monoclonal de los sobrenadantes del cultivo dispensados en placas de ensayo de 96 pozos PANDEX™. Las placas fueron lavadas y se agregaron los reactivos específicos del isotipo antirratón monoclonales de rata conjugados con FITC (Becton Dickinson Monoclonal Center). La fluorescencia enlazada fue cuantificada utilizando la tecnología de la máquina de selección de fluorescencia PANDEX™.

#### IX. Análisis de epítomos

Los anticuerpos monoclonales anti-rTGF-beta1 purificados fueron acoplados con peroxidasa de rábano (HRP) por el método de Nakane y Kawaoi, J. Histochem. Cytochem., 22: 1084 (1974). Las placas recubiertas con rTGF-beta1 fueron incubadas con 50 µg/ml de anti-rTGF-beta1 purificado o control negativo en PBS durante dos horas a 22°C. Se agregó entonces una dilución predeterminada del anticuerpo monoclonal anti-rTGF-beta conjugado con HRP a las placas e incubado durante una hora a 22°C. Las placas fueron lavadas y el sustrato fue agregado y se cuantificó la reactividad como se describió anteriormente. El porcentaje de bloqueo de los anticuerpos monoclonales anti-rTGF-beta1 heterólogos fue comparado con el control de bloqueo positivo autólogo.

#### X. Análisis por inmunoprecipitación

Se sometió un µg/línea de rTGF-beta1 a electroforesis en SDS-PAGE al 12% utilizando regulador de muestra no reductor para determinar la reactividades de los diversos anticuerpos monoclonales con las formas dimericas de rTGF-beta1. Los péptidos fueron sembrados por inmunotransferencia sobre papel de nitrocelulosa y sondeados con el anticuerpo monoclonal apropiado conjugado con HRP. El anticuerpo enlazado fue visualizado utilizando el sustrato insoluble 4-cloro-1-naftol (Kirkegaard y Perry, Gathersburg, MD). La reacción fue detenida después de 15 minutos por lavado exhaustivo con agua destilada y los inmunoprecipitados fueron secados y fotografiados.

#### B. Producción de anticuerpos monoclonales específicos anti-TGF-beta1 y anti-TGF-beta2

En los protocolos de inmunización iniciales, se inmunizaron ratones Balb/c con rTGF-beta1 (producida y purificada como lo describe Derynck et al., Nature, supra) por rutas subcutáneas e intraperitoneales utilizando una variedad de preparaciones inmunogénicas, dosis y programaciones y utilizando el adyuvante de Freund tanto completo como incompleto. Las programaciones de inmunización fueron continuadas por hasta 11 semanas. Varios ratones respondieron con títulos de anti-rTGF-beta1 medibles pero bajos y dos de estos ratones fueron sacrificados y sus bazos fueron utilizados para fusiones. De 1152 cultivos originales solamente se detectaron 84 sobrenadantes anti-TGF-beta positivos. Diez de estos híbridos fueron clonados y dieron como resultado anticuerpos monoclonales de baja afinidad que no podrían ser utilizados para el desarrollo de ensayos o purificación.

Como una estrategia alternativa, un grupo de diez ratones hembra Balb/c (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA) fueron inyectados con 5 µg/dosis de TGF-beta1 purificada en 100 µl de adyuvante de DETOX™ (RIBI ImmunoChem Res. Inc., Hamilton, MT) en las almohadillas de los pies de las extremidades inferiores en los días 0, 3, 7, 10 y 14. En el día 17 los animales fueron sacrificados, se removieron sus nódulos linfáticos de drenaje inguinal y popliteal, y los linfocitos fueron asociados de los estromas de nodo usando mallas de acero inoxidable. Las suspensiones de linfocitos de todos los diez ratones fueron reunidas y fusionadas con la línea de mieloma de

ratón X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol., 123: 1548 (1979)) utilizando polietileno glicol 4000 al 50% mediante un procedimiento establecido (Oi y Herzenberg, in Selected Methods in Cellular Immunology, B. Mishel y Schiigi, eds. (W.J. Freeman Co., San Francisco, CA, 1980), p. 351). Las células fusionadas fueron sembradas en un total de 1344 placas de microtitulación de 96 pozos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozos seguidas por selección por HAT (Littlefield, J.W., Science, 145: 709 (1964)) en el día 1 postfusión.

1190 de los pozos fueron reactivos con TGF-beta1 recombinante inmovilizado en la prueba de ELISA. 18 de estos cultivos permanecieron estables cuando se expandieron y las líneas celulares fueron crioconservadas. Estos cultivos progenitores fueron isotipificados y ensayados en cuanto a su capacidad para capturar  $^{125}\text{I}$ -rTGF-beta1 y para neutralizar la actividad de TGF-beta1 *in vitro*. A partir de los 18 cultivos progenitores que fueron ensayados para la neutralización de rTGF-beta1 y subsecuentemente isotipificados, dos fueron del isotipo IgG1 kappa; los restantes fueron del isotipo IgG2b kappa. Solamente los anticuerpos monoclonales pertenecientes a la subclase IgG1 demostraron actividad inhibitora (neutralización) de rTGF-beta1 *in vitro*. Se seleccionaron tres hibridomas estables que secretaban anticuerpos monoclonales anti-TGF-beta de alta afinidad. La caracterización de estos anticuerpos se detalla adicionalmente a continuación.

C. Inmunoprecipitación de TGF-beta radioyodado

Se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación para determinar la capacidad de los tres anticuerpos monoclonales para reconocer y precipitar la TGF-beta1 en solución. La autorradiografía muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TGF-beta 2G7, 4A11 y 12H5 inmunoprecipitaron cantidades equivalente de  $^{125}\text{I}$ -rTGF-beta1, mientras que el anticuerpo monoclonal de control 6G12 fue negativo. Las bandas inmunoprecipitadas tenían un peso molecular aparente de aproximadamente 14.5 kD. Se utilizó un ensayo de inhibición competitiva para determinar la afinidad de la interacción entre TGF-beta1 y cada uno de los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales 2G7 y 4A11 tenían afinidades igualmente más altas, las cuales fueron  $1.2 \times 10^8$  l/mol.

También se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación para determinar la capacidad de los anticuerpos monoclonales seleccionados para reconocer y precipitar la TGF-beta2 en solución. La autorradiografía mostró que, en contraste con la rTGF-beta1, solo el anticuerpo 2G7 inmunoprecipitó la  $^{125}\text{I}$ -TGF-beta2 a un grado medible. La comparación de 4A11 y 12H5 con el control negativo revela poca precipitación específica. Estos resultados fueron sorprendentes en cuanto que los experimentos de bloqueo cruzado revelaron que 4A11 y 2G7 eran capaces de inhibir el enlazamiento de uno a otro a rTGF-beta1 humano. Véase la Tabla 1.

Tabla 1

Enlazamiento de anticuerpo monoclonal	Porcentaje del bloqueo cruzado de Mabs a anticuerpo monoclonal que bloquea TGF-beta1			
	2G7	4A11	12H5	456*
2G7	100	74	32	1.9
4A11	96	100	19	1.5
12H5	28	12	100	3.4

\*Mab 456 es un anticuerpo de control que reacciona con CD4.

Tomados en conjunto, los datos indican que los epítomos reconocidos por estos dos anticuerpos monoclonales son distintos pero están bien sea en cercana proximidad o de alguna manera afectan el enlazamiento de uno a otro desde una distancia. A partir tanto de los experimentos de inmunoprecipitación como de bloqueo cruzado parece que 12H5 es un epítomo distinto, aunque se observó algún bloqueo. La conclusión también está soportada por los datos de neutralización más adelante.

D. Análisis de inmunoprecipitación con rTGF-beta1

Puesto que la forma activa de TGF-beta es un homodímero, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones para determinar si los anticuerpos monoclonales reconocían esta forma. Los anticuerpos 2G7, 4A11 y 12H5 reaccionaron todos en una inmunoprecipitación indirecta con la forma dimerica de TGF-beta1 (no reducida). 2G7 dio una banda mucho más fuerte que 4A11 o 12H5. Como en el experimento de inmunoprecipitación, el anticuerpo de control 6G12 fue negativo. Este patrón de reactivo también fue observado en una transferencia Western directa con conjugados de HRP de estos anticuerpos monoclonales.

En resumen, el protocolo que emplea inmunizaciones en las almohadillas de las patas acopladas con fusiones de los nódulos linfáticos en drenaje fue llevado a cabo después de múltiples intentos no exitosos para romper la tolerancia a rTGF-beta1 utilizando una variedad de procedimientos de inmunización y programaciones de dosificación en ratones Balb/c y C3H con adyuvante de Freund completo e incompleto. En general, este procedimiento se encontró útil para generar una respuesta rápida con afinidad muy alta a estos inmunogenos débiles, en contraste con la experiencia de Dasch et al., supra, quien generó un anticuerpo monoclonal que neutraliza TGF-beta1 y TGF-beta2 utilizando TGF-beta2 derivado de hueso bovino purificado en el adyuvante de Freund como inmunogeno en ratones Balb/c.

Todos los tres anticuerpos monoclonales se unieron a rTGF-beta1 en los ensayos de inmunotransferencia, ELISA, bloqueo cruzado e inmunoprecipitación. Dos de los anticuerpos anti-rTGF-beta neutralizaron la actividad de rTGF-beta1 *in vitro*, mientras que solamente uno de los dos neutralizó la actividad tanto de TGF-beta2 como de TGF-beta3 en el ensayo con células de fibroblasto de pulmones de mink. Los anticuerpos neutralizadores de TGF-beta1 también bloquearon el enlazamiento de rTGF-beta1 radioyodado en un ensayo de radioreceptor, indicando que la neutralización *in vitro* de la actividad de rTGF-beta1 puede ser debida al bloqueo del receptor.

### Ejemplo 2

#### Anticuerpos 2G7 humanizados

Los dominios variables del anticuerpo 2G7 monoclonal murínico fueron clonados inicialmente en un vector que permite la producción de un fragmento Fab quimérico ratón/humano. El ARN total fue aislado de las células de hibridoma usando un kit de extracción de ARN STRAGEN<sup>TM</sup> siguiendo los protocolos del fabricante. Los dominios variables fueron amplificados por RT-PCR, purificados por gel, e insertados en un derivado de un plásmido basado en pUC119 que contenía un dominio constante kappa humano y un dominio C<sub>H</sub>1 humano como se describió previamente (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89: 4285 (1992) y la Patente de los Estados Unidos No. 5, 821,337). El plásmido resultante fue transformado en la cepa 16C9 de *E. coli* para la expresión del fragmento Fab. El crecimiento de los cultivos, la inducción de la expresión de las proteínas y la purificación del fragmento Fab fueron como se describió previamente (Werther et al., J. Immunol., 157: 4986-4995 (1996); Presta et al., Cancer Research, 57: 4593-4599 (1997)).

La secuenciación de ADN del clon quimérico permitió la identificación de los residuos de CDR (Kabat et al., supra). Utilizando la mutagénesis de oligonucleótidos dirigida al sitio, todas las seis de estas regiones CDR fueron introducidas en un marco humano completo (subgrupo I V<sub>L</sub> kappa y subgrupo III V<sub>H</sub>) contenidos en el plásmido VX4 como se describió previamente (Presta et al., Cancer Research, 57: 4593-4599 (1997)). La proteína resultante del " trueque de CDR" fue expresada y purificada como se indicó anteriormente. Se llevaron a cabo estudios de enlazamiento para comparar las dos versiones. En resumen, una placa NUNC MAXISORP<sup>TM</sup> fue recubierta con 1 microgramo per ml de dominio extracelular de TGF-beta (ECD; producido como se describe en WO 1990/14357) en 50 mM de regulador de carbonato, pH 9.6, durante la noche a 4° C, y luego se bloqueo con diluyente de ELISA (BSA al 0.5%, POLYSORBATE<sup>TM</sup> 20 al 0.05% no iónico como surfactante, PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las diluciones seriadas de las muestras en diluyente de ELISA fueron incubadas sobre las placas durante 2 horas. Después del lavado, se detectó el fragmento Fab enlazado con anticuerpo kappa antihumano biotinilado (ICN 634771) seguido por peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (Sigma) y utilizando 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como sustrato. La absorbancia fue leída a 450 nm. El enlazamiento del Fab de trueque de CDR fue reducido significativamente en comparación con el enlazamiento del fragmento de Fab quimérico.

Para restaurar el enlazamiento del Fab humanizado, se construyeron mutantes utilizando ADN de los trueques de CDR como patrón. Utilizando un modelo generado por ordenador, estas mutaciones fueron diseñadas para cambiar los residuos de la región marco humana a sus contrapartes murínicas en las posiciones donde el cambio podría afectar las conformaciones CDR o la interfase anticuerpo-antígeno. En la Tabla 2 se muestran los mutantes. (nótese que toda la numeración de aminoácidos es expresada como en Kabat et al., supra.) Para secuencias, véanse las figuras 1 - 4.

Tabla 2

Designación de mutaciones de 2G7 FR humanizadas	
Mutante no.	Sustituciones en la región marco (FR) en comparación con la secuencia de consenso anti-TGF-beta humana (SEQ ID NO:6)
Versión 3	ArgH72Ala
Versión 4	ArgH72Ala, AlaH49Gly,

Designación de mutaciones de 2G7 FR humanizadas	
Mutante no.	Sustituciones en la región marco (FR) en comparación con la secuencia de consenso anti-TGF-beta humana (SEQ ID NO:6)
Versión 5	ArgH72Ala, AlaH49Gly, PheH68Ala
Versión 6	ArgH72Ala, AlaH49Gly, LeuH79Ala
Versión 709	ArgH72Ala, AlaH49Gly, ValH48Ile
Versión 710	ArgH72Ala, AlaH49Gly, IleH70Leu
Versión 11	ArgH72Ala, AlaH49Gly, AsnH74Lys
Versión 712	ArgH72Ala, AlaH49Gly, Ile70Leu, AsnH74Lys

Las versiones 3 y 4 fueron utilizadas como intermediarios para obtener las versiones de Fab humanizadas que portan números posteriores. La versión 5, con los cambios AlaH49Gly, PheH68Ala y ArgH72Ala, parece tener enlazamiento restaurado a la del fragmento Fab 2G7 quimérico original, como sucede con las versiones 709 y 11 (figura 5). Se espera que las versiones 710 y 712 tengan similar enlazamiento al fragmento quimérico, pero la versión 712 tiene una mutación de marco adicional que podía no ser deseable debido a la posibilidad de inmunogenicidad incrementada. Residuos adicionales de FR o CDR, tales como L3, L24, L54, y/o H35, podrían ser modificados (por ejemplo, sustituidos como sigue: GlnL3Met, ArgL24Lys, ArgL54Leu, GluH35Ser). Las sustituciones que podrían ser deseables para potenciar la estabilidad son la sustitución de leucina o isoleucina por metionina para disminuir la oxidación, o el cambio de asparaginas en los CDR a otros residuos para disminuir la posibilidad de desaminación. Alternativamente, o adicionalmente, el anticuerpo humanizado puede ser madurado por afinidad (véase más arriba) para mejorar o refinar adicionalmente su afinidad y/o otras actividades biológicas.

Los plásmidos para expresión de IgG de longitud completa fueron construidos subclonando los dominios VL y VH de Fab 2G7 quimérico así como Fab humanizado versiones 5, 709 y 11 en vectores pRK descritos previamente para expresión en células de mamíferos (Gorman et al, ADN Prot. Eng. Tech., 2:3-10 (1990)). En resumen, cada constructo de Fab fue digerido con EcoRV y BlnI para escindir un fragmento VL, el cual fue clonado en los sitios EcoRV/BlnI del plásmido pDR1 (véase Figura 6) para la expresión de la cadena liviana completa (dominios VL-CL). Adicionalmente, cada constructo de Fab fue digerido con PvuII y ApaI para escindir un fragmento de VH, el cual fue clonado en los sitios PvuII/ApaI del plásmido pDR2 (véase Figura 7) para la expresión de la cadena pesada completa (dominios VH-CH1-CH2-CH3).

Para cada variante de IgG, se llevaron a cabo transfecciones transientes por cotransfección de un plásmido que expresan una cadena liviana y un plásmido que expresa una cadena pesada en una línea celular de riñón embrionario humano transformado por adenovirus, 293 (Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59-74 (1977)). En resumen, se dividieron las células 293 en el día anterior a la transfección y se sembraron en medio que contenía suero. Al día siguiente, se preparo un precipitado con fosfato de calcio a partir de ADN de doble cadena de las cadenas liviana y pesada, junto con el vector de ADN pADVANTAGE™ (Promega, Madison, WI), y se agregó gota a gota a las placas. Las células fueron incubadas durante la noche a 37° C, luego se lavaron con PBS y cultivaron en medio libre de suero durante 4 días tiempo después del cual se recolecto el medio acondicionado. Los anticuerpos fueron purificados a partir de los sobrenadantes del cultivo utilizando agarosa de proteína A-SEPHAROSE CL-4B™, luego se intercambio con regulador en succinato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, pH 6.0, y se concentró utilizando un microconcentrador CENTRICON-10™ (Amicon). Las concentraciones de proteína fueron determinadas midiendo la absorbancia a 280 nm o por análisis cuantitativo de aminoácidos.

Se hicieron modificaciones adicionales a la hu2G7 Versión 5 IgG con el fin de clarificar cuales CDR contribuían al enlazamiento, cual CDR podrían ser revertidas a las secuencias de los loci kappa de la línea germinal humana sin pérdida de actividad, o para estabilización del anticuerpo. Estos se citan como se muestran en la Tabla 3, y se dan las diferencias en aminoácidos entre la versión 5 y estas versiones.

Tabla 3

Designación de mutaciones de 2G7 CDR humanizadas	
Mutante no.	Sustituciones en CDR en comparación con anti-TGF-beta humana versión 5
Versión 5 (V5H.V5L)	
H2N1.V5L	Lo mismo que en la versión 5 excepto que Asn51 se cambia a lle en la CDR H2
V5H.g1L2	Lo mismo que en la versión 5 excepto que CDR L2 es revertido a la secuencia de locus kappa de línea germinal humana L8/L9/L14/L15: YASSLQS (SEQ ID NO: 8)
V5H.g1L1g1L2	Lo mismo que en la versión 5 excepto que la CDR L1 es revertida a la secuencia de locus kappa de línea germinal humana L8/L9: RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 7) y la CDR L2 es revertida a la secuencia de locus kappa de línea germinal humana L8/L9/L14/L15: YASSLQS (SEQ ID NO: 8)
H2NI.g1L1g1L2	Lo mismo que en la versión 5 excepto que la CDR L1 es revertida a la secuencia de locus kappa de línea germinal humana L8/L9: RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 7) y la CDR L2 es revertida a la secuencia de locus kappa de línea germinal humana L8/L9/L14/L15: YASSLQS (SEQ ID NO: 8), y Asn51 es cambiado a lle en CDR H2.

5 El nombre para la secuencia de línea germinal utilizada para CDR L1 es L8/L9, como se define en la figura 4 de Cox et al., Eur. J. Immunol., 24: 827-836 (1994) y en la figura 2e de Schable y Zachau, Biol. Chem. Hoop-Seyler, 374: 1001-1022 (1993). Para CDRL2, la secuencia de línea germinal es denominada L8/L9/L14/L15 (véase Cox et al., supra, y Schable y Zachau, supra).

10 Las reversiones a las secuencias del locus kappa de la línea germinal humana (gl) se hicieron en todos los CDR, pero solamente los agentes de reversión de línea germinal definidas anteriormente mostraron enlazamiento (véase figura 8). Puede verse de esta figura que V5H.g1L2, con CDR L2 revertida a la secuencia del locus kappa de la línea germinal humana, se enlaza todavía a TGF-beta así como V5H.V5L. En las dos versiones V5H.g1L1g1L2 y H2NI.g1L1g1L2, así como H2NI.V5L, no se enlazan tan bien como la quimera.

Se utilizó un ensayo de proliferación celular mesangial de ratón para probar un anticuerpo de control y varios anticuerpos humanizados (V5H.V5L, V5H.g1 L2, H2NI.V5L, V5H.g1L1g1L2, y H2N1.g1L1g1L2). El protocolo es como sigue:

15 En el día 1: Se sembraron células mesangiales de ratón sobre una placa de 96 pozos en medios (una mezcla 3:1 de medio Eagle modificado de Dulbecco y medio Ham F12 – suero bovino fetal al 95% - suplementado al 5% con regulador HEPES 14 mM) y se cultivo durante la noche.

20 En el día 2: TGF-beta con tres diferentes concentraciones (100 ng, 10 ng y 1 ng) y cinco tipos diferentes de anticuerpo TGF humanizado (20 µg/ml) fueron diluidos en medio libre de suero y agregados a las células. Se utilizó un anticuerpo TGF de ratón, como control (2G7).

En el día 4: Después de 48 horas de incubación, se agregaron 20 µl de regulador de reacción (regulador CELLTITER 96 AQUEOUS ONE SOLUTION REAGENT™ (Promega Inc. Cat number G3580)) a cada pozo de la placa y se dejó incubar durante 2 horas. Se midió la absorbancia (OD) a 490 nm.

25 El H2NI.V5L (20 µg/ml) bloqueo completamente la inhibición celular inducida por TGF-beta a un nivel de 1 ng/ml, el cual es el mismo resultado que al usar el control de ratón quimérico (véase Figura 9). La versión 5 (V5H.V5L) también bloqueo la inhibición celular de manera similar al control.

30 Se probaron diversos anticuerpos humanizados en cuanto a su actividad en la neutralización de diversos TGF-betas versus 2G7 usando la línea celular 3T3 de fibroblastos de embriones de ratón Suizo desagregados estimulados con uno de tres TGF-betas *in vitro* y luego se midió su proliferación como actividad. Los resultados se muestran en las figuras 10 – 14. Estas figuras indican que el anticuerpo humanizado H2NI.V5L fue bastante superior en la actividad de bloqueo que el anticuerpo de control 2G7. Los otros anticuerpos humanizados probados, H2NI.g1L2 (CDR L2

revertido a la secuencia del locus kappa de la línea germinal humana) y V5H.g1L2 (CDR L2 revertido a la secuencia del locus kappa de línea germinal humana), mostraron actividad inhibitora comparable, siendo el V5H.g1L2 el menos efectivo de todos los TGF-beta1 hasta -beta3.

5 En resumen, los anticuerpos humanizados V5H.V5L, V5H.g1L2, H2NI.V5L, H2NI.g1L2, y las versiones 709, 710, y 711 son las versiones humanizadas más preferidas puesto que enlazan a TGF-beta de manera comparable al anticuerpo quimérico (chimH.chimL; fragmento Fab 2G7) y/o neutralizan TGF-beta o bloquean la inhibición celular inducida por TGF-betas *in vitro* y tienen cambios de marco menores de todos los anticuerpos humanizados probados, lo cual minimizaría el riesgo de una respuesta inmune en pacientes. Además, el H2NI.V5L es un anticuerpo particularmente preferido, puesto que parece ser superior en la actividad de neutralización de todas las tres isoformas de TGF-beta (TGF-beta 1, 2, 3) y podría tener estabilidad mejorada debido a los cambios en CDR H2. Adicionalmente, esos anticuerpos son humanizados presentes que exhiben capacidad mejorada para bloquear la actividad de todos los tres ligandos TGF-beta *in vitro* en comparación con el anticuerpo 2G7 monoclonal de ratón se espera que trabajen mejor que el 2G7 en las diversas indicaciones que siguen en virtud de su capacidad superior para inhibir los efectos inducidos por pan-TGF-beta, como se muestra en el ensayo para la proliferación de fibroblastos inducida por TGF-beta (Figuras 10-14).

### Ejemplo 3

Terapia de cáncer de próstata recidivo o refractario

20 El anticuerpo presente es un anticuerpo monoclonal humanizado, de longitud completa (producido en células CHO) dirigido contra TGF-beta. Está indicado como un agente individual para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas (independiente de andrógenos). Los puntos finales primarios para la eficacia incluyen supervivencia global en comparación con el mejor tratamiento disponible (Mitoxantrona/prednisona), cuando se usa como un agente individual, y la seguridad. Los puntos finales de eficacia secundaria incluyen: progresión tiempo a enfermedad, rata de respuesta, calidad de vida, dolor y/o duración de la respuesta. El anticuerpo es administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiple (20 mL llenados a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

30 El anticuerpo también está indicado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata refractario a las hormonas (independiente de andrógenos). Los puntos finales primarios para la eficacia incluyen supervivencia completa en comparación con la quimioterapia, y seguridad. Puntos finales de eficacia secundarios incluyen: progresión tiempo enfermedad, rata de respuesta, calidad de vida, dolor y/o duración de la respuesta. El anticuerpo se administra por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida en dosis múltiples (20 mL llenados a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

35 Ejemplos de fármacos que pueden ser combinados con el anticuerpo anti-TGF-beta humanizado para tratar cáncer de próstata (por ejemplo cáncer de próstata independiente de andrógenos) incluye un inhibidor de la farnesil transferasa; un agente antiangiogénico (por ejemplo un anticuerpo anti-VEGF); un fármaco dirigido a EGFR (por ejemplo C225 o ZD1839); anticuerpo HERCEPTIN<sup>®</sup> anti-HER-2, o un anticuerpo anti-ErbB que induce la apoptosis tal como 7C2 o 7C3, incluyendo variantes humanizadas o maduras por afinidad de los mismos; 2C4 o 2C4 humanizado; otro anticuerpo anti-TGF-beta (por ejemplo un anticuerpo de TGF-beta monoclonal); una citoquina (por ejemplo IL-2, IL-12, G-CSF o GM-CSF); un antiandrógeno (tal como flutamida o acetato de ciproterona); leuprolide, suramina; un agente quimioterapéutico tal como vinblastina, estramustina, mitoxantrona, liarozol (un agente bloqueador del metabolismo del ácido retinoico), ciclofosfamida, antibióticos de antraciclina tales como doxorubicina, un taxano (por ejemplo, paclitaxel o docetaxel), o metotrexato, o cualquier combinación de los anteriores tal como vinblastina/estramustina o ciclofosfamida/doxorubicina/metotrexato; prednisona; hidrocortisona; 45 o combinaciones de los mismos. Dosis estándar para estos diversos fármacos pueden ser administradas, por ejemplo, 40 mg/m<sup>2</sup>/semana de docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>); 6 (AUC) de carboplatino; y 200 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>).

50 Puesto que la TGF-beta también ha sido implicada en el cáncer de próstata (Sha et al., Cancer Research, 62: 7135-138 (2002)), el anticuerpo puede ser probado en modelos de cáncer de próstata (por ejemplo, ratones transgénicos TRAMP así como células PC-3 trasplantadas) con una expectativa de éxito.

### Ejemplo 4

Terapia de cáncer de seno

55 El anticuerpo presente es indicado como un agente individual para el tratamiento de pacientes con cáncer de seno, especialmente pero no limitándose en pacientes metastásicos. Los puntos finales primarios para la eficacia incluyen rata de respuesta y seguridad. Los puntos finales de eficacia secundaria incluyen: supervivencia global, progresión tiempo enfermedad, calidad de vida, y/o duración de la respuesta. El anticuerpo humanizado presente es

administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiples (20 mL llenando a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

5 El anticuerpo humanizado presente también está indicado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer de seno. Puntos finales primarios para eficacia incluyen supervivencia global en comparación con la quimioterapia sola, y seguridad. Puntos finales de eficacia secundarios incluyen: progresión tiempo enfermedad, tasa de respuesta, calidad de vida, y/o duración de la respuesta. El anticuerpo humanizado es administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiples (20 mL llenando a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

10 Ejemplos de fármacos que pueden ser combinados con el anticuerpo anti-TGF-beta presente para tratar cáncer de seno (por ejemplo, cáncer de seno metastásico que no está caracterizado por sobreexpresión de TGF-beta) incluyen agentes quimioterapéuticos tales como antibióticos de antraciclina (por ejemplo doxorubicina), ciclofosfamida, un taxano (por ejemplo paclitaxel o docetaxel), navelbine, xeloda, mitomicina C, un compuesto de platino, oxaliplatino, gemcitabina, o combinaciones de dos o más de estos tales como doxorubicina/ciclofosfomida; anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2, o un anticuerpo anti-ErbB que induce apoptosis tal como 7C2 o 7F3, incluyendo variantes humanizadas o maduras por afinidad de los mismos; 2C4 o 2C4 humanizado; otro anticuerpo anti-TGF-beta (por ejemplo un anticuerpo de TGF-beta monoclonal); un antiestrógeno (por ejemplo tamoxifen); un inhibidor de la aromatasa (por ejemplo anastrozol); un inhibidor de la farnesil transferasa; un agente antiangiogénico (un anticuerpo anti-VEGF); un fármaco dirigido a EGFR (por ejemplo C225 o ZD1839); una citoquina (por ejemplo IL-2, IL-12, G-CSF o GM-CSF); o combinaciones de los anteriores. Pueden utilizarse dosificaciones estándar para tales fármacos adicionales.

15 El anticuerpo humanizado presente está indicado adicionalmente en combinación con el anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2 o rhuMAb 2C4 para el tratamiento de pacientes con cáncer de seno, especialmente aquellos con metástasis. Los puntos finales primarios para eficacia incluyen tasa de respuesta y seguridad. Los puntos de eficacia secundarios incluyen: progresión tiempo a enfermedad, supervivencia global en comparación con el anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2 o rhuMAb 2C4 solo, calidad de vida y/o duración de la respuesta. El RhuMAb 2C4 se administra por vía venosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta progresión de la enfermedad. El anticuerpo de rhuMAb 2C4 es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiple (20 mL llenado a una concentración de 20mg/mL o concentración superior). El anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2 es administrado IV como una dosis de carga inicial de 4 mg/kg seguida por una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg. El anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2 es suministrado como un polvo liofilizado. Cada vial del anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2 contiene 440 mg del anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2, 9.9 mg de L-histidina HCl, 6.4 mg de L-histidina, 400 mg de  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalosa dihidrato, y 1.8 mg de POLYSORBATE 20™ como surfactante. La reconstitución con 20 mL de agua bacteriostática para inyecciones (BWFI), que contiene 1.1% de alcohol bencílico como conservante, producen 21 mL de una solución de dosis múltiple que contiene 21 mg/mL de anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER-2, a un pH de aproximadamente 6.0.

20 Utilizando el anticuerpo 2G7 murínico en las células epiteliales 4T1 de un modelo de tumor mamario en ratón espontáneo de cáncer de seno, se inyectaron células ( $1.5 \times 10^5$ ) en la grasa mamaria de ratones (día 0). En este modelo, un tumor primario palpable aparece en una semana; la metástasis secundaria aparece en los pulmones a la semana 2, en el hígado a la semana 3 y en el hueso entre las semanas 4 y 5. Se recolectan tejidos en la semana 5. El anticuerpo 2G7 y dos anticuerpos de control IgG fueron inyectados intraperitonealmente en ratones a 25 mg/kg 3x/semana y se midió la producción de TGF-beta en suero por parte de las células 4T1 en el medio de cultivo de tejidos (o en sangre para los estudios *in vivo*) mediante un ELISA comercial de R&D Systems.

25 La figura 15A muestra la producción de TGF-beta por las células 4T1 y células C57 epiteliales de ratón normales como control por ELISA *in vitro*. La figure 15B muestra el efecto de la producción de TGF-beta en suero por células 4T1 *in vivo* del anticuerpo 2G7 en ratones con tumores (+ anti-TGF-beta) versus ratones sin tumores (- Con) tratados con anticuerpos de control (Con) (IgG con comparación de isotipos, el cual es un anticuerpo antiambrosía), y versus ratones con tumores (+ Con) tratados con anticuerpos de control. Estos resultados muestran que las células de tumor epitelial 4T1 produjeron más TGF-beta que las células epiteliales de control C57 *in vitro* (Figura 15A), y que el anticuerpo 2G7 presente hace disminuir la cantidad de TGF-beta libre en la circulación con respecto a ratones con tumores tratados con anticuerpos de control (Figura 15B).

30 Los niveles en suero de la TGF-beta libre fueron reducidos en ratones tratados con el anticuerpo anti-TGF-beta 2G7, consistente con los resultados previos de que los anticuerpos anti-TGF-beta pueden alterar la disponibilidad de TGF-beta *in vivo* (Wojtowicz-Praga et al., Immunother Emphasis Tumor Immunol., 19(3):169-75 (1996). Erratum in: J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 19(5):386 (1996), Verma UM (corrected to Verma UN)). Además, el anticuerpo usado aquí (2G7) no interfirió en los ensayos de ELISA como lo evidencia el hecho de que las lecturas de ELISA no fueron afectadas por la adición de 2G7 al plasma de control en diluciones de 1:10, 1:100, y 1:1000 en comparación con el vehículo. Ziyadeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 8015-20 (2000).

5 La figure 16A muestra los resultados de histología y la figura 16B muestra los pesos de tejidos para tumores de pulmón secundarios producidos por el modelo de células tumorales usados para la figure 15 con el IgG de control anti-ambrosía y 2G7 anti-TGF-beta tal como fue aplicado a los ratones según la descripción de la figura 15, indicando que el anti-TGF-beta hizo disminuir el grado, el número de lóbulos afectados, el peso del tejido en gramos, y los pesos de los pulmones como porcentaje del peso corporal versus el control. Se detectaron tumores de pulmón secundarios por tomografía de barrido computarizada *ex vivo*.

10 La figure 17 muestra la cuantificación de los tumores pulmonares de los modelos de ratón anteriores por uCT indicando volumen del tumor y número, siendo el 2G7 anti-TGF-beta el de menor volumen tumoral que el IgG de control, siendo tanto 2G7 como el control dados a los ratones según la descripción para la figura 15 (esto es, 25mg/kg 3x/semana intraperitonealmente).

15 La figure 18A muestra el volumen tumoral en modelo de ratón anterior como función del tiempo en días después de la inyección de células utilizando 25mg/kg 3x/semanas intraperitonealmente de la IgG de control con solución salina o con taxol, y 25mg/kg 3x/semana intraperitonealmente de 2G7 anti-TGF-beta con taxol, indicando que este último era más efectivo en la reducción del volumen tumoral. La figura 18B muestra que el anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta con quimioterapia redujo el peso corporal –pulmón, bazo y tumores- tanto en el control de IgG/solución salina y los controles de IgG/ quimioterapia.

20 Adicionalmente, el anticuerpo 2G7 hizo disminuir los niveles sistémicos del factor de crecimiento en el material vascular (VEGF) versus el control de IgG en este modelo de ratón. La figure 19 muestra que los niveles de VEGF en plasma (pg/ml) en ratones sin tumores (normales), o en ratones con tumores mamarios 4T1 tratados bien sea con la IgG de control (control) o con el 2G7 anti-TGF-beta (aTGF-b) (25 kg/kg 3x/semana intraperitonealmente para el control y el anti-TGF-beta). Cada punto representa un ratón individual. La barra indica la media para el grupo.

25 En resumen, en el modelo de cáncer de seno de células epiteliales derivado de tumores mamarios espontáneos en ratones Balb C (4T1) que son inyectados en las almohadillas de grasa mamaria de ratones sinérgicos, se encontró que el anticuerpo 2G7 hacia disminuir los niveles circulantes de TGF-beta1 libre y los niveles de VEGF sistémicos y tenía una pequeña pero significativa capacidad transitoria de hacer disminuir el crecimiento de tumores primarios versus los controles. El tratamiento temprano con 2G7 hizo disminuir los tumores de pulmón secundarios.

30 Adicionalmente, el tratamiento temprano con los anticuerpos 2G7 supero mucha de la destrucción ósea inducida por el tumor de seno que se presenta en este modelo utilizando el mismo barrido que para los pulmones. Véase la Tabla 4. En esta Tabla, el número trabecular se refiere al número de trabéculas (pequeñas espículas de hueso que se extienden hacia la cavidad de la médula), y el espesor trabecular se refiere al espesor promedio de estas trabéculas. Ambos parámetros indican la cantidad de hueso y fueron determinados utilizando tomografía microcomputada y un algoritmo para cuantificar diversos parámetros óseos. (Tabla 4).

Tabla 4

Medición de la regeneración ósea					
	Número trabecular	Espesor trabecular	Volumen óseo (BV)/volumen total	Superficie ósea/BV	Densidad mineral
2G7 sin tumor primario	-2.8%	No establecido	-4,8%	No establecido	No establecido
Con tumor primario	-7.2%	-22.5%	-28.3%	+28.6%	-15.9%
2G7 con tumor primario	+6.5%	+7.2%	+14.3%	-6.6%	+6.3
Nótese que los porcentajes se refieren a:					
1) con respecto a ratones normales (esto es sin tumores) para el "2G7 sin tumor primario" y "con tumor primario" muestras					
2) con respecto a ratones con tumores tratados con anticuerpos de control IgG y para la muestra "2G7 con tumor primario"					

5 El anticuerpo 2G7 también fue probado en un modelo de cáncer de seno (PymT), como se describe en Maglione et al., Transgenic Polyoma middle-T mice model premalignant mammary disease, *Cancer Res.*, 61(22):8298-305 (2001) y Lin et al., Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases, *Am J Pathol.*, 163(5):2113-26 (2003). Ambos anticuerpos (IgG de control (anticuerpo antiambrosía) y 2G7 anti-TGF-beta) fueron dosificados iguales: 25mg/kg 3x/semana intraperitonealmente. La figura 20A muestra el efecto del 2G7 anti-TGF-beta versus el IgG de control sobre volumen tumoral como función de los días de crecimiento del tumor en el modelo PymT, indicando que el anticuerpo 2G7 redujo el volumen del tumor con el tiempo versus el control de IgG. La figure 20B muestra que el peso del tumor también se redujo con el anticuerpo 2G7 de TGF-beta versus la IgG de control. También se encontró que hay niveles de VEGF disminuidos en tumores PyMT con respecto a los tumores Her2.

10 A la vista de estos datos, se espera que las versiones humanizadas de los anticuerpos 2G7 presentes actuaran de la misma forma al 2G7 en términos de crecimiento del tumor y metástasis.

15 A diferencia de las células epiteliales 4T1, las células epiteliales Her+ no sintetizan altos niveles de TGF-beta *in vitro*, fueron cultivadas inhibidas por TGF-beta *in vitro* (Siegel et al., Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14):8430-5 (2003)), y no fueron cultivadas inhibidas por el tratamiento con anti-TGF-beta *in vivo*. Adicionalmente, los niveles de VEGF fueron incrementados en este modelo cuando se dio el anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta versus una IgG de control.

20 La tinción de tres de los modelos de tumor de seno (4T1, PyMt y Her2) para la membrana de base (colágeno IV), células endoteliales (CD31) o células soportadora de vasos llamadas pericitos (SMA o NG2) reveló diferencias en estos sistemas modelo en términos de estos tres componentes. Estos componentes, sin estar limitados a ninguna teoría, pueden ser predictivos con respecto a la sensibilidad de los tumores a un tratamiento anti-TGF-beta.

25 Dada la naturaleza bifuncional propuesta del papel del TGF-beta en el cáncer, el uso de un diagnóstico para determinar cómo/si el paciente responderá puede probar ser útil en la aplicación de estrategias inhibitoras de TGF-beta para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la determinación de si unas células cancerosas de un paciente dado permanecen sensibles a los efectos inhibidores del crecimiento de TGF-beta puede ser importante.

Sin estar limitados a ninguna teoría, se da una lista abajo de marcadores diagnóstico potenciales para seleccionar pacientes/tumores que lo más probablemente respondan al tratamiento anti-TGF-beta, lista que no es limitante:

30 1) Expresión de una o más de las tres isoformas de TGF-beta, TGF-beta1, -2, y/o -3, especialmente aquellos con altos niveles de expresión, con un enfoque particular sobre TGF-beta1.

a. Este cubriría un cierto número de diferentes tipos de cáncer, incluyendo, pero no limitándose a: seno, páncreas, próstata, riñón, pulmón y piel (melanoma). Se encontró que había una sobreexpresión significativa en estos tipos de tumor de TGF-beta1 en comparación con muestras de tejido normal comparadas del mismo tipo de tejido.

35 b. Cánceres de seno negativos a Her2 en oposición a cánceres de seno positivos a Her2, puesto que el primero puede responder mejor al tratamiento con anticuerpos según lo indica una expresión más alta de TGF-beta1. En este aspecto, se encontró que una sobreexpresión significativa en estos tipos de tumor de TGF-beta1 en comparación con muestras de tejido normales comparadas del mismo tipo de tejido.

2) Como corolario al # 1, la producción de células tumorales, independiente de si TGF-beta también está hecho en el estroma/ambiente.

40 3) Mutación en, y expresión disminuida de, uno o más receptores de TGF-beta, especialmente, pero no limitándose a, TGFbeta1 RI o TGF-betaRII (tipo IIR).

4) Mutaciones o cambios en los niveles o localización de las moléculas en la ruta de señalización de TGF-beta, incluyendo, pero no limitándose a: SMADs/fosfoSMADs, c-myc, CDC25A, p15INK4B, p21WAF1/Cip1, y p27K1P1.

45 5) Alteraciones en otras rutas de señalización conocidas por impactar la actividad de TGF-b, incluyendo, pero no limitándose a:

FoxG1, serrado/muesca, CDK2, y CDK4, y especialmente Her2/neu, niveles de receptor de estrógeno, actividad Ras, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), actividad AKT y MAPK, así como estatus p53.

50 Además de los marcadores de diagnóstico listados anteriormente para determinar cuáles tumores tratar, pueden utilizarse varios marcadores para evaluar (dentro del tumor y/o en la periferia) la actividad biológica de anticuerpos anti-TGF-beta en pacientes antes y después del tratamiento, incluyendo, pero no limitándose a:

- 1) Niveles de TGF-beta, en el tumor o en la circulación (como se muestra en la figura 15B así como por datos de inmunohistoquímica (IHC) mostrando la expresión de la proteína de TGF-beta1 en secciones de tejido teñidas de xenoinjertos de tumores Colo205 y tumores Calu6, tumores HPAC, y una muestra de tumor humano de adenocarcinoma de seno ductal).
- 5 2) Niveles de VEGF, en el pulmón o en la circulación (como se muestra en la figura 19, y también por los datos que muestran que los niveles de VEGF se incrementan en el modelo positivo a Her2 cuando se provee 2G7 versus el control).
- 3) Niveles de moléculas tales como SMADs/fosfoSMADs dentro de la ruta de señalización de TGF-b, en células tumorales y/o periféricas tales como células mononucleares de sangre (BMCs).
- 10 4) Indicadores de la función celular inmune, especialmente la actividad de NK, células T y macrófagos.

**Ejemplo 5**

Terapia de cáncer de pulmón

15 El anticuerpo humanizado presente está indicado como un agente individual para el tratamiento de la etapa IIIb o IV de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Los puntos finales primarios para eficacia incluían rata de respuesta y seguridad. Los puntos finales de eficacia secundarios incluyen: supervivencia global, progresión tiempo enfermedad, calidad de vida y/o duración de la respuesta. El anticuerpo humanizado es administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiple (20 mL llenado a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

20 El anticuerpo humanizado también está indicado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásicos. Los puntos finales primarios para eficacia incluyen supervivencia global en comparación con terapia estándar, y seguridad. Los puntos finales de eficacia secundarios incluyen: progresión tiempo enfermedad, rata de respuesta, calidad de vida y/o duración de la respuesta. El anticuerpo humanizado es administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiple (20 mL llenado a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

25 Ejemplos de fármacos adicionales que pueden ser combinados con el anticuerpo presente para tratar cáncer de pulmón incluyen agentes quimioterapéuticos tales como carboplatino, un taxano (por ejemplo, paclitaxel o docetaxel), gemcitabina, navelbina, cisplatino, oxaliplatino, o combinaciones de cualquiera de estos tales como carboplatino/docetaxel; anticuerpo HERCEPTIN<sup>®</sup> anti-HER-2, o un anticuerpo anti-ErbB que induce apoptosis tal como 7C2 o 7F3, incluyendo variantes humanizadas o maduradas por la afinidad de los mismos; 2C4 o 2C4 humanizado, otro anticuerpo anti-TGF-beta (por ejemplo, un anticuerpo de TGF-beta monoclonal); un inhibidor de la farnesil transferasa; un agente antiangiogénico (por ejemplo un anticuerpo anti-VEGF); un fármaco dirigido a EGFR (por ejemplo, C225 o ZD1839); una citoquina (por ejemplo IL-2, IL-12, G-CSF o GM-CSF); o combinaciones de los anteriores.

**Ejemplo 6**

Terapia de cáncer colorrectal

40 El anticuerpo humanizado presente está indicado como un agente individual para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. Los puntos finales primarios para eficacia incluyen rata de respuesta y seguridad. Los puntos finales para eficacia secundarios incluyen: supervivencia global, progresión tiempo enfermedad, calidad de vida y/o duración de la respuesta. El anticuerpo humanizado es administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiple (20 mL llenado a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

45 El anticuerpo humanizado también está indicado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásicos. Los puntos finales primarios para eficacia incluyen supervivencia global en comparación con la terapia estándar, y seguridad. Los puntos finales para eficacia secundarios incluyen: progresión tiempo enfermedad, rata de respuesta, calidad de vida y/o duración de la respuesta. El anticuerpo humanizado es administrado por vía intravenosa (IV) semanalmente o cada tres semanas a 2 o 4 mg/kg, respectivamente, hasta la progresión de la enfermedad. El anticuerpo es suministrado como una formulación líquida de dosis múltiple (20 mL llenado a una concentración de 20 mg/mL o concentración superior).

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos utilizados para tratar cáncer colorrectal que pueden ser combinados con el anticuerpo humanizado que se enlaza a TGF-beta incluye 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV), CPT-11,

levamisol, o combinaciones de cualquiera dos o más de estos, por ejemplo 5-FU/LV/CPT-11. Pueden administrarse dosificaciones estándares de tales agentes quimioterapéuticos. Otros fármacos que pueden ser combinados con el anticuerpo anti-TGF-beta para tratar cáncer colorrectal incluyen un inhibidor de farnesil transferasa; un agente antiangiogénico (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF); un fármaco dirigido a EGFR (por ejemplo C225 o ZD1839); una citoquina (por ejemplo IL-2, IL-12, G-CSF o GM-CSF); anticuerpo HERCEPTIN<sup>®</sup> anti-HER-2, o un anticuerpo anti-ErbB que induce la apoptosis tal como 7C2 o 7F3, incluyendo variantes humanizadas o maduras por afinidad de los mismos; 2C4 o 2C4 humanizado; otro anticuerpo anti-TGF-beta (por ejemplo un anticuerpo de TGF-beta monoclonal); o combinaciones de los anteriores.

Dado el papel posible de TGF-beta en el cáncer de colon, el anticuerpo puede ser probado en modelos de cáncer de colon (por ejemplo HT29 y HCT116) y esperarse que trabaje.

### Ejemplo 7

#### Terapia de melanoma

Los resultados con el anticuerpo monoclonal 2G7 en este ejemplo sugiere que los anticuerpos humanizados presentes serían útiles para el tratamiento de melanoma maligno. El anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta1 murínico fue probado en modelos animales de melanoma. Específicamente, en ratones singenéticos C57negros6 inyectados subcutáneamente con células de melanoma de ratón (B16F10 o B16B16), el tratamiento con anti-TGF-beta (2G7) a 25 mg/kg 3x/semana por vía intraperitoneal hizo disminuir el tamaño del tumor primario con respecto al tratamiento con la IgG de control de isotipo comparable (anticuerpo antiambrosía) (a 25 mg/kg 3x/semana por vía intraperitoneal) (Figuras 22, 24, y 25). En este modelo B16, el tratamiento con 2G7 anti-TGF-beta también redujo el porcentaje de ratones con tumores de pulmón (esto es, incidencia de tumor pulmonar) (Figura 21A) y el número de tumores pulmonares (Figura 21B) con respecto al control, para cada método de cuantificación tumoral, esto es, recuento de superficie ("superficie"), examen histológico ("patología"), cuantificación de todos los tumores visibles después de hacer el tejido transparente ("aclarado") o a través del uso de tomografía microcomputada ("CT"). Véanse también las figuras 23 y 26).

Las células tumorales Calu-6 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas) (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) se encontró que producían TGF-beta *in vitro*. Las células Calu-6 CM indujeron la expresión de VEGF y SMA en fibroblastos *in vitro*, un efecto que fue inhibido por el tratamiento con el anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta murínico. Estos resultados sugieren, sin estar limitados por ninguna teoría, que la TGF-beta puede estar involucrada en la activación de células estromales en el ambiente tumoral. Los xenotrasplantes de estas células fueron hechas en ratones lampiños (véase, por ejemplo, Gourdeau et al., Mol Cancer Ther., 3:1375-1384 (2004)) y el volumen tumoral fue probado después de tratamiento con el anticuerpo de control IgG2b usado en el experimento B16 anterior (a 25 mg/kg 3x/semana por vía intraperitoneal), junto con un anticuerpo anti-VEGF (A461) (a 5 mg/kg 3x/semana por vía intraperitoneal), anticuerpo 2G7 anti-TGF-beta murínico (a 25 mg/kg 3x/semana por vía intraperitoneal), y la combinación de 2G7 y A461 (dosificación como se indico anteriormente). Los resultados de volumen tumoral y peso tumoral, mostrados en las figuras 27 y 28, respectivamente, indican que la combinación de 2G7 y del anticuerpo anti-VEGF fue el tratamiento más superior, seguido por el anticuerpo 2G7. Los resultados muestran que los dos anticuerpos (anti-TGF-beta y anti-VEGF) son adictivos y/o sinérgicos uno con otro.

Con base en estos datos, se espera que los anticuerpos humanizados presentes también reduzcan tumores primarios y secundarios involucrados en melanoma maligno. Específicamente, el anticuerpo humanizado H2NI.V5L puede ser probado en dos modelos en los cuales ha mostrado eficacia con el anticuerpo 2G7 murínico:

- 1) células de melanoma de ratón (B16) en ratones singenéticos y
- 2) células tumorales Calu-6 (NSCLC humano) como xenotrasplantes en ratones lampiños.

En el modelo B 16, las células son implantadas por vía subcutánea en ratones. En ambos modelos, el tratamiento con diversos anticuerpos anti-TGF-beta incluyendo H2NI.V5L (25 mg/kg 3x/semana) o anticuerpos de control (25 mg/kg 3x/semanas) comienza cuando se presenta un tumor palpable. Los tumores se miden 2 - 3 veces por semana.

Antes de probar cualquier anticuerpo, se establece la capacidad del H2NI.V5L para inhibir el crecimiento celular de fibroblastos inducidos por TGF-beta (NIH3T3).

Si la parte Fc del ratón de H2NI.V5L no es requerida para la actividad en ratones, se espera entonces que el H2NI.V5L tenga la misma actividad que, o mejor actividad que, el 2G7 monoclonal de ratón original en ratones. Si la parte Fc de ratón del anticuerpo es requerida para la actividad en ratones, entonces no se espera que el H2NI.V5L sea tan efectivo como el 2G7 monoclonal de ratón original en estudios en ratones. Sin embargo, se espera que el H2NI.V5L (y los otros anticuerpo humanizados como se reivindica aquí) permanezcan efectivos en humanos, puesto que el Fc humano será activo en los mismos.

### Ejemplo 8

Farmacocinética del anticuerpo 2G7 en ratones normales y portadores de tumores

El propósito aquí es evaluar las características farmacocinéticas (PK) del 2G7 anti-TGF-beta murínico en ratones normales versus portadores de tumores.

5 Diseño del estudio:

El modelo animal fue ratones Balb/c que portaban tumores mamarios inducidos por células 4T1. La dosificación fue una dosis individual de 43 mg/kg en cuatro grupos:

- Grp 1: Ratones IV que no portan tumores

- Grp 2: Ratones IV que portan tumores

10 • Grp 3: Ratones IP que portan tumores

- Grp 4: Ratones SC que portan tumores

N = 3 ratones por grupo por punto de tiempo. Cada ratón fue sangrado 3 veces.

Se recolectó el suero para el ELISA de anti-TGF-beta murínico a 5, 15, 30, 60 minutos; 3, 6, 24 horas; 3, 7, 10, 14, 21 días.

15 Resultados:

Los resultados muestran que el perfil de eliminación de anti-TGF-beta murínico parece ser más rápido en ratones portadores de tumor que en ratones normales. Adicionalmente, hay más de 95% de biodisponibilidad del anticuerpo siguiendo tanto las rutas IP como SC de administración. La vida media fue de 2–3 días en los ratones portadores de tumores.

20 Así, el perfil PK para el anticuerpo 2G7 parece ser aceptable. En el ratón normal, la vida media del anticuerpo fue de 4 días lo cual está dentro del rango del observado para otros anticuerpos y proteínas de fusión en ratones normales. En los ratones portadores de tumores, la eliminación del anticuerpo fue aproximadamente 2 veces más rápida, lo cual no es probablemente un factor en este nivel de dosis. La biodisponibilidad de más del 95% indica que la administración IP o SC es una ruta apropiada para terapias. La vida media de 2 – 3 días soporta un régimen de dosificación de 2 – 3 veces a la semana.

25

Listado de secuencias

<110> Genentech, Inc.

<120> Anticuerpos Anti-TGF-Beta Humanizados

<130> G64508PCEP

30 <140> EP 05732737.1

<141> 2005-03-31

<150> US 60/558,290

<151> 2004-03-31

<160> 47

35 <210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 527 292 T3

Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu  
 20 25 30  
 Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 65 70 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala  
 80 85 90  
 Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gly  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 110 115

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> Inseguro

<222> 3, 5

<223> Aminoácido desconocido

10 <400> 2

ES 2 527 292 T3

Gln Val Xaa Leu Xaa Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr  
 20 25 30  
 Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Val Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr  
 50 55 60  
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
 65 70 75  
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp  
 80 85 90  
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp  
 95 100 105  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Gln Ser Pro Ser Pro Gln Pro Lys  
 110 115 120  
 Arg Arg Ala His

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu  
 20 25 30  
 Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 65 70 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 80 85 90  
 Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 110 115

10

<210> 4

ES 2 527 292 T3

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr  
20 25 30  
Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45  
Glu Trp Val Gly Val Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr  
50 55 60

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser  
65 70 75  
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp  
95 100 105  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
110 115 120  
Lys Gly Pro Ser

<210> 5

10 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

15 <400> 5

# ES 2 527 292 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15  
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
20 25 30  
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
35 40 45  
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
65 70 75  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
80 85 90  
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
95 100 105  
Ile Lys Arg Thr

<210> 6

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

10 <221> Inseguro

<222> 102

<223> Aminoácido desconocido

<400> 6





<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> La secuencia es sintetizada  
5 <400> 13  
caccagtatc tgagctctga caca 24  
<210> 14  
<211> 30  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> La secuencia es sintetizada  
<400> 14  
ggctacgcat tcaccaacta tctgatcgag 30  
15 <210> 15  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
20 <223> La secuencia es sintetizada  
<400> 15  
g ttaacaatc ctggatccgg aggctccaac tataacgaga agttcaaggg 50  
g 51  
<210> 16  
<211> 24  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> La secuencia es sintetizada  
<400> 16  
30 tccggaggct tctactcga ctac 24  
<210> 17  
<211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 17

aagtccagtc aaagtgttt atacagttca aatcagaaga actactggc 50

5 c 51

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr  
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 19

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

20 <400> 19

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 20

His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr  
1 5

30 <210> 21

ES 2 527 292 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 21

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu  
1 5 10

<210> 22

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

15 <400> 22

Val Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 23

Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

25 <210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

ES 2 527 292 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr  
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 25

<211> 667

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

<221> Inseguro

10 <222> 220

<223> Aminoácido desconocido

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu  
 20 25 30  
 Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 65 70 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 80 85 90  
 Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
 110 115 120  
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 125 130 135  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

ES 2 527 292 T3

	140								145					150
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	155								160					165
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
	170								175					180
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
	185								190					195
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
	200								205					210
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Xaa	Glu	Val	Gln	Leu	Val
	215								220					225
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu
	230								235					240
Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Glu
	245								250					255
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val
	260								265					270
Asn	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
	275								280					285
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	290								295					300
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
	305								310					315
Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Gly	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
	320								325					330
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	335								340					345
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	350								355					360
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	365								370					375
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
	380								385					390
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
	395								400					405
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
	410								415					420
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
	425								430					435
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
	440								445					450
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	455								460					465
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
	470								475					480
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe

ES 2 527 292 T3

				485						490					495
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 500	Gly	Val	Glu	Val	His 505	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 510	
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 515	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 520	Arg	Val	Val	Ser	Val 525	
Leu	Thr	Val	Leu	His 530	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 535	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 540	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn 545	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 550	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 555	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 560	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 565	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 570	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 575	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 580	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 585	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys 590	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 595	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 600	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 605	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 610	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 615	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser 620	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 625	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 630	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser 635	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 640	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 645	
Ser	Val	Met	His	Glu 650	Ala	Leu	His	Asn	His 655	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 660	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 665	Gly	Lys									

<210> 26

<211> 695

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

<221> Inseguro

10 <222> 220, 668, 673

<223> Aminoácido desconocido

<400> 26

ES 2 527 292 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15  
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu  
20 25 30  
Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
35 40 45  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
50 55 60  
Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
65 70 75  
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
80 85 90

ES 2 527 292 T3

Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
 110 115 120  
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 125 130 135  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 140 145 150  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 155 160 165  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 170 175 180  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 185 190 195  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 200 205 210  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val  
 215 220 225  
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 230 235 240  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu  
 245 250 255  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val  
 260 265 270  
 Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 275 280 285  
 Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 290 295 300  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 305 310 315  
 Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 320 325 330  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 335 340 345  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 350 355 360  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 365 370 375  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 380 385 390  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 395 400 405  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 410 415 420  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 425 430 435

ES 2 527 292 T3

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 440 445  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 455 460  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 470 475  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 485 490  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 500 505  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 515 520  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 530 535  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 545 550  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 560 565  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 575 580  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 590 595  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 605 610  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 620 625  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 635 640  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 650 655  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Xaa Val Arg Arg Pro Xaa Ser Arg  
 665 670  
 Pro Ala Glu Ala Trp Pro Pro Trp Pro Asn Leu Phe Ile Ala Ala  
 680 685 690  
 Tyr Asn Gly Tyr Lys  
 695

<210> 27

<211> 666

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 27

ES 2 527 292 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15  
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln ser Val Leu  
20 25 30

ES 2 527 292 T3

Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 65 70 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 80 85 90  
 Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
 110 115 120  
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 125 130 135  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 140 145 150  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 155 160 165  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 170 175 180  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 185 190 195  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 200 205 210  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu  
 215 220 225  
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
 230 235 240  
 Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp  
 245 250 255  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Asn  
 260 265 270  
 Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly  
 275 280 285  
 Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 290 295 300  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 305 310 315  
 Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 320 325 330  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 335 340 345  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 350 355 360  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 365 370 375

ES 2 527 292 T3

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 380 385 390  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 395 400 405  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 410 415 420  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 425 430 435  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 440 445 450  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 455 460 465  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 470 475 480  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 485 490 495  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 500 505 510  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 515 520 525  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 530 535 540  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 545 550 555  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 560 565 570  
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 575 580 585  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 590 595 600  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 605 610 615  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 620 625 630  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 635 640 645  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 650 655 660  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 665

<210> 28

<211> 667

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

<221> Inseguro

<222> 220

5 <223> Aminoácido desconocido

<400> 28

ES 2 527 292 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu  
 20 25 30  
 Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 35 40 45  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 50 55 60  
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 65 70 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 80 85 90  
 Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
 110 115 120  
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 125 130 135  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 140 145 150  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 155 160 165  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 170 175 180  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 185 190 195  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 200 205 210  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val  
 215 220 225  
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 230 235 240  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu  
 245 250 255  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val  
 260 265 270  
 Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 275 280 285  
 Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 290 295 300  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 305 310 315

ES 2 527 292 T3

Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 320 325 330  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 335 340 345  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 350 355 360  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 365 370 375  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 380 385 390  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 395 400 405  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 410 415 420  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 425 430 435  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 440 445 450  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 455 460 465  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 470 475 480  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 485 490 495  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 500 505 510  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 515 520 525  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 530 535 540  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 545 550 555  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 560 565 570  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 575 580 585  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 590 595 600  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 605 610 615  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 620 625 630  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 635 640 645  
 Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 650 655 660

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
665

<210> 29

<211> 667

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

10 <221> Inseguro

<222> 220

<223> Aminoácido desconocido

<400> 29

ES 2 527 292 T3

Asp 1 Ile Met Met Thr 5 Gln Ser Pro Ser Ser 10 Leu Ala Val Ser Ala 15  
 Gly Glu Lys Val Thr 20 Met Ser Cys Lys Ser 25 Ser Gln Ser Val Leu 30  
 Tyr Ser Ser Asn Gln 35 Lys Asn Tyr Leu Ala 40 Trp Tyr Gln Gln Lys 45  
 Pro Gly Gln Ser Pro 50 Lys Leu Leu Ile Tyr 55 Trp Ala Ser Thr Arg 60  
 Glu Ser Gly Val Pro 65 Asp Arg Phe Thr Gly 70 Ser Gly Ser Gly Thr 75  
 Asp Phe Thr Leu Thr 80 Ile Ser Ser Val Gln 85 Ala Glu Asp Leu Ala 90  
 Val Tyr Tyr Cys His 95 Gln Tyr Leu Ser Ser 100 Asp Thr Phe Gly Gly 105  
 Gly Thr Lys Leu Glu 110 Ile Lys Arg Thr Val 115 Ala Ala Pro Ser Val 120  
 Phe Ile Phe Pro Pro 125 Ser Asp Glu Gln Leu 130 Lys Ser Gly Thr Ala 135  
 Ser Val Val Cys Leu 140 Leu Asn Asn Phe Tyr 145 Pro Arg Glu Ala Lys 150  
 Val Gln Trp Lys Val 155 Asp Asn Ala Leu Gln 160 Ser Gly Asn Ser Gln 165  
 Glu Ser Val Thr Glu 170 Gln Asp Ser Lys Asp 175 Ser Thr Tyr Ser Leu 180  
 Ser Ser Thr Leu Thr 185 Leu Ser Lys Ala Asp 190 Tyr Glu Lys His Lys 195  
 Val Tyr Ala Cys Glu 200 Val Thr His Gln Gly 205 Leu Ser Ser Pro Val 210  
 Thr Lys Ser Phe Asn 215 Arg Gly Glu Cys Xaa 220 Glu Val Gln Leu Gln 225  
 Gln Ser Gly Ala Glu 230 Leu Val Arg Pro Gly 235 Thr Ser Val Lys Val 240  
 Ser Cys Lys Ala Ser 245 Gly Tyr Ala Phe Thr 250 Asn Tyr Leu Ile Glu 255  
 Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val

ES 2 527 292 T3

				260					265				270	
Asn	Asn	Pro	Gly	Ser 275	Gly	Gly	Ser	Asn	Tyr 280	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys 285
Gly	Lys	Ala	Thr	Leu 290	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser 295	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr 300
Met	Gln	Leu	Ser	Ser 305	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp 310	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe 315
Cys	Ala	Arg	Ser	Gly 320	Gly	Phe	Tyr	Phe	Asp 325	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly 330
Thr	Ser	Val	Thr	Val 335	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr 340	Thr	Gly	Pro	Ser	Val 345
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro 350	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 355	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala 360
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu 365	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 370	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 375
Val	Ser	Trp	Asn	Ser 380	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 385	Gly	Val	His	Thr	Phe 390
Pro	Ala	Val	Leu	Gln 395	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 400	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 405
Val	Thr	Val	Pro	Ser 410	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr 415	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys 420
Asn	Val	Asn	His	Lys 425	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 430	Val	Asp	Lys	Lys	Val 435
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys 440	Asp	Lys	Thr	His	Thr 445	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 450
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 455	Gly	Gly	Pro	Ser	Val 460	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 465
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 470	Leu	Met	Ile	Ser	Arg 475	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 480
Cys	Val	Val	Val	Asp 485	Val	Ser	His	Glu	Asp 490	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 495
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 500	Gly	Val	Glu	Val	His 505	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 510
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 515	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 520	Arg	Val	Val	Ser	Val 525
Leu	Thr	Val	Leu	His 530	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 535	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 540
Cys	Lys	Val	Ser	Asn 545	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 550	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 555
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 560	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 565	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 570
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 575	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 580	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 585
Thr	Cys	Leu	Val	Lys 590	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 595	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 600
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro

ES 2 527 292 T3

				605					610					615
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				620					625					630
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				635					640					645
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				650					655					660
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				665										

<210> 30

<211> 667

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

10 <221> Inseguro

<222> 220

<223> Aminoácido desconocido

<400> 30

ES 2 527 292 T3

Asp<sub>1</sub> Ile Gln Met Thr<sub>5</sub> Gln Ser Pro Ser Ser<sub>10</sub> Leu Ser Ala Ser Val<sub>15</sub>  
 Gly Asp Arg Val Thr<sub>20</sub> Ile Thr Cys Arg Ala<sub>25</sub> Ser Gln Ser Val Leu<sub>30</sub>  
 Tyr Ser Ser Asn Gln<sub>35</sub> Lys Asn Tyr Leu Ala<sub>40</sub> Trp Tyr Gln Gln Lys<sub>45</sub>  
 Pro Gly Lys Ala Pro<sub>50</sub> Lys Leu Leu Ile Tyr<sub>55</sub> Tyr Ala Ser Ser Leu<sub>60</sub>  
 Gln Ser Gly Val Pro<sub>65</sub> Ser Arg Phe Ser Gly<sub>70</sub> Ser Gly Ser Gly Thr<sub>75</sub>  
 Asp Phe Thr Leu Thr<sub>80</sub> Ile Ser Ser Leu Gln<sub>85</sub> Pro Glu Asp Phe Ala<sub>90</sub>  
 Thr Tyr Tyr Cys His<sub>95</sub> Gln Tyr Leu Ser Ser<sub>100</sub> Asp Thr Phe Gly Gln<sub>105</sub>  
 Gly Thr Lys Val Glu<sub>110</sub> Ile Lys Arg Thr Val<sub>115</sub> Ala Ala Pro Ser Val<sub>120</sub>  
 Phe Ile Phe Pro Pro<sub>125</sub> Ser Asp Glu Gln Leu<sub>130</sub> Lys Ser Gly Thr Ala<sub>135</sub>  
 Ser Val Val Cys Leu<sub>140</sub> Leu Asn Asn Phe Tyr<sub>145</sub> Pro Arg Glu Ala Lys<sub>150</sub>  
 Val Gln Trp Lys Val<sub>155</sub> Asp Asn Ala Leu Gln<sub>160</sub> Ser Gly Asn Ser Gln<sub>165</sub>  
 Glu Ser Val Thr Glu<sub>170</sub> Gln Asp Ser Lys Asp<sub>175</sub> Ser Thr Tyr Ser Leu<sub>180</sub>  
 Ser Ser Thr Leu Thr<sub>185</sub> Leu Ser Lys Ala Asp<sub>190</sub> Tyr Glu Lys His Lys<sub>195</sub>  
 Val Tyr Ala Cys Glu<sub>200</sub> Val Thr His Gln Gly<sub>205</sub> Leu Ser Ser Pro Val<sub>210</sub>

ES 2 527 292 T3

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val  
 215 220 225  
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 230 235 240  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu  
 245 250 255  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val  
 260 265 270  
 Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 275 280 285  
 Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 290 295 300  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 305 310 315  
 Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 320 325 330  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 335 340 345  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 350 355 360  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 365 370 375  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 380 385 390  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 395 400 405  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 410 415 420  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 425 430 435  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 440 445 450  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 455 460 465  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 470 475 480  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 485 490 495  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 500 505 510  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 515 520 525  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 530 535 540  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 545 550 555

ES 2 527 292 T3

Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 560	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 565	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 570
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 575	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 580	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 585
Thr	Cys	Leu	Val	Lys 590	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 595	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 600
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 605	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 610	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 615
Pro	Val	Leu	Asp	Ser 620	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 625	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 630
Thr	Val	Asp	Lys	Ser 635	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 640	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 645
Ser	Val	Met	His	Glu 650	Gly	Leu	His	Asn	His 655	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 660
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 665	Gly	Lys								

<210> 31

<211> 1341

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 31

10

ES 2 527 292 T3

gaagttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc 50  
actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cgcattcacc aactatctga 100  
tcgagtgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg gatcgggtga 150  
aacaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaagggccg 200  
tttactata agtgcagaca attcgaaaa cacattatac ctgcagatga 250  
acagcctgcg tgctgaggac actgcccgtct attattgtgc tcgatccgga 300  
ggcttctact tcgactactg gggcaagga accctgggtca ccgtctcctc 350  
agcctccacc aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga 400  
gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 450  
cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt 500  
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca 550  
gcgtgggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600  
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc 650  
caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac 700  
tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 750  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag 800  
ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 850  
tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900  
  
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 950  
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 1000  
aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1050  
ctgcccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg 1100  
cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 1150  
atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200  
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 1250  
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 1300  
accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 32

<211> 1398

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 32

ES 2 527 292 T3

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt 50  
acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cggtagcctg gtgcagccag 100  
ggggctcact ccgtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac 150  
tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtggat 200  
cgggtgtaaac aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca 250  
agggccgttt cactataagt gcagacaatt cgaaaaacac attatacctg 300  
cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg 350  
atccggaggc ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg 400  
tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 450  
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga 500  
ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca 550  
gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
ctcagcagcg tggtgactgt gccctctagc agcttgggca cccagaccta 650  
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag 700  
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 750  
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa 800  
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg 850  
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900  
gtggaggtgc ataagccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 950  
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga 1000  
atggcaagga gtacaagtgc aaggctcca acaaagccct cccagcccc 1050  
  
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1100  
gtacaccctg ccccatccc ggaagagat gaccaagaac caggctagcc 1150  
tgacctgctt ggtaaaggc ttctatcca gcgacatgc cgtggagtgg 1200  
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1250  
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga 1300  
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1350  
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 33

<211> 1341

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

ES 2 527 292 T3

<400> 33

gaagttcagc tggaggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc 50  
actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cgcattcacc aactatctga 100  
tcgagtgggg ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg ggttgggtgtt 150  
atcaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaaggggagc 200  
cgccactatc agtgcagaca attcgaaaaa cacattatac ctgcagatga 250  
acagcctgag tgctgaggac actgcccgtct attattgtgc tcgatccgga 300  
ggcttctact tcgactactg gggtaagga accctgggtca ccgtctcctc 350  
agcctccacc aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga 400  
gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 450  
cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt 500  
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tcctcagca 550  
gcgtgggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600  
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc 650  
caaactctgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac 700  
tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc 750  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag 800  
ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 850  
tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900  
cgggtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 950  
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 1000  
aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1050  
ctgcccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg 1100  
cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 1150  
  
atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200  
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 1250  
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 1300  
accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 34

<211> 1400

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

ES 2 527 292 T3

<400> 34

atgggatggg catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt 50  
acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cggtggcctg gtgcagccag 100  
ggggctcact ccgtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac 150  
tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtgggt 200  
tggtgttatc aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca 250  
aggggcgcg cactatcagt gcagacaatt cgaaaaacac attatacctg 300  
cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg 350  
atccggaggc ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg 400  
tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 450  
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga 500  
ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca 550  
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
ctcagcagcg tggtgactgt gccctctagc agcttgggca cccagaccta 650  
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag 700  
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 750  
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa 800  
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg 850  
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900  
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 950  
cacgtaccgg gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga 1000  
atggcaagga gtacaagtgc aaggctctca acaaagccct cccagcccc 1050  
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1100  
gtacaccctg ccccatccc ggggaagagat gaccaagaac caggtcagcc 1150  
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200  
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1250  
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga 1300  
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1350  
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg 1400

<210> 35

<211> 1341

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 35

## ES 2 527 292 T3

gaagttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctggtgcagc cagggggctc 50  
actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cgcattcacc aactatctga 100  
tcgagtgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg gatcgggtgta 150  
aacaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaaggggcg 200  
cgccactatc agtgcagaca attcgaaaaa cacattatac ctgcagatga 250  
acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgtgc tcgatccgga 300  
ggcttctact tcgactactg gggcaagga accctgggtca ccgtctcctc 350  
agcctccacc aagggcccat cggcttccc cctggcacc tcctccaaga 400  
gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 450  
cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt 500  
gcacaccttc ccggtgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca 550  
gcggtgtgac tgtgccctct agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600  
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc 650  
caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac 700  
tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 750  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag 800  
ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 850  
tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900  
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 950  
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 1000  
aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1050  
ctgcccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg 1100  
cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 1150  
atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgccctcccgt gctggactcc 1200  
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg 1250  
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 1300  
accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 36

<211> 1398

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 36

# ES 2 527 292 T3

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt 50  
acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag 100  
ggggctcact ccgtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac 150  
tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtggat 200  
cggtgtaaac aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca 250  
aggggcgcg cactatcagt gcagacaatt cgaaaaacac attatacctg 300  
cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt atttgctcgc 350  
atccggaggc ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg 400  
tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 450  
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga 500  
ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc gccctgacca 550  
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
ctcagcagcg tggtgactgt gccctctagc agcttgggca cccagacctc 650  
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag 700  
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 750  
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa 800  
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggtg 850  
acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900  
gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 950  
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga 1000  
atggcaagga gtacaagtgc aaggctcca acaaagccct cccagcccc 1050  
atcgagaaaa ccactccta agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1100  
gtacaccctg ccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc 1150  
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200  
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1250  
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga 1300  
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1350  
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 37

<211> 1341

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 37

ES 2 527 292 T3

gaagttcagc tggaggagtc tggcggaggc ctgggtgcagc cagggggctc 50  
actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cgcattcacc aactatctga 100  
tcgagtgagg ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg ggttggtggt 150  
aacaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaaggggagc 200  
cgccactatc agtgcagaca attcgaaaaa cacattatac ctgcagatga 250  
acagcctgag tgctgaggac actgccgtct attattgtgc tcgatccgga 300  
ggcttctact tcgactactg gggtaagga accctgggtca ccgtctctc 350  
agcctccacc aaggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga 400  
gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 450  
cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt 500  
gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca 550  
gcgtgggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600  
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc 650  
caaatcttgt gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac 700  
tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttc cccaaaacc caaggacacc 750  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag 800  
ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 850  
tgataaatgc caagacaaag ccgaggagg agcagtacaa cagcacgtac 900  
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 950  
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 1000  
aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1050  
ctgccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg 1100  
cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 1150  
atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200  
gacggctcct tcttctctc cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 1250  
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag ggtctgcaca 1300  
accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 38

<211> 1398

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 38

atgggatggg catgtatcat ctttttctc gtagcaactg caactggagt 50

ES 2 527 292 T3

acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag 100  
ggggctcact ccgtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac 150  
tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtgggt 200  
tgggtgtaac aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca 250  
aggggcgcg cactatcagt gcagacaatt cgaaaaacac attatacctg 300  
cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg 350  
atccggaggc ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg 400  
tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 450  
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga 500  
ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc gccctgacca 550  
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
ctcagcagcg tggtgactgt gccctctagc agcttgggca cccagaccta 650  
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag 700  
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 750  
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa 800  
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggtg 850  
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900  
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 950  
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactgggtga 1000  
atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1050  
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1100  
gtacaccctg cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc 1150  
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200  
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1250  
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga 1300  
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggg 1350  
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 39

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 39

## ES 2 527 292 T3

gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcca 50  
tagggtcacc atcacctgca gagccagtca gagcgtgctg tatagttcga 100  
atcagaagaa ctacctggcc tggatatcaac agaaaccagg aaaagctccg 150  
  
aaactactga tttactgggc tagtactcgc gagtctggag tcccttctcg 200  
cttctctgga tccggttctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc 250  
tgcagccaga agacttcgca acttattact gtcaccagta tctgagctct 300  
gacacatttg gacagggtag caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc 350  
accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 400  
ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 450  
gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag 500  
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 550  
tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600  
gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 650  
agagtgt 657

<210> 40

<211> 714

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 40

ES 2 527 292 T3

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt 50  
acattcagat atccagatga cccagtcccc gagctccctg tccgcctctg 100  
tgggcgatag ggtcaccatc acctgcagag ccagtcagag cgtgctgtat 150  
agttcgaatc agaagaacta cctggcctgg tatcaacaga aaccaggaaa 200  
agctccgaaa ctactgattt actgggctag tactcgcgag tctggagtcc 250  
cttctcgctt ctctggatcc ggttctggga cggatttcac tctgaccatc 300  
agcagtctgc agccagaaga cttcgcaact tattactgtc accagtatct 350  
gagctctgac acatttgac aggtaccaaa ggtggagatc aaacgaactg 400  
tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 450  
tctggaactg cttctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga 500  
ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc 550  
aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc 650  
ctgcaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca 700  
acaggggaga gtgt 714

<210> 41

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 41

gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggca 50  
tagggtcacc atcacctgca gagccagtca gagcgtgctg tatagttcga 100  
atcagaagaa ctacctggcc tggatcaac agaaaccagg aaaagctccg 150  
aaactactga ttactatgc tagcagtctc cagtctggag tcccttctcg 200  
cttctctgga tccggttctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc 250  
tgcagccaga agacttcgca acttattact gtcaccagta tctgagctct 300  
gacacatttg gacagggtac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc 350  
accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 400  
ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 450  
gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag 500  
tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 550  
tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcaaa 600  
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 650  
agagtgt 657

10 <210> 42

ES 2 527 292 T3

<211> 714

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 42

```
atgggatggt catgtatcat ctttttcta gtagcaactg caactggagt 50
acattcagat atccagatga cccagtcccc gagctccctg tccgcctctg 100
tgggcgatag ggtcaccatc acctgcagag ccagtcagag cgtgctgtat 150
agttcgaatc agaagaacta cctggcctgg tatcaacaga aaccaggaaa 200
agctccgaaa ctactgattt actatgctag cagtctccag tctggagtcc 250
cttctcgctt ctctggatcc ggttctggga cggatttcac tctgaccatc 300
agcagtctgc agccagaaga cttcgaact tattactgtc accagtatct 350
gagctctgac acatttggac agggtaccaa ggtggagatc aaacgaactg 400
tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 450
tctggaactg cttctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga 500
ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc 550
aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc 650
ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca 700
acaggggaga gtgt 714
```

<210> 43

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 43

```
Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
  1           5           10           15
```

15 Lys Gly

<210> 44

<211> 5391

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 527 292 T3

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 44

```
ttcgagctcg cccgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 50
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 100
ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgacct ccgcccattg 150
acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca 200
ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 250
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg 300
aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 350
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc 400
ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga 450
tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca 500
aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 550
aaatgggchg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt 600
ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct 650
ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcgcccgga gaacggtgca 700
ttggaacgch gattccccgt gcccaagagt acgtaagtac cgcctataga 750
gtctataggc ccacccccct ggcttcgtta gaacgcggct acaattaata 800
cataacctta tgtatcatac acatacgatt taggtgacac tatagaataa 850
catccacttt gcctttctct ccacaggtgt ccaactcccag gtccaactgc 900
acctcggttc tatcgattga attccacat gggatgggtca tgtatcatcc 950
tttttctagt agcaactgca actggagtac attcagatat ccagatgacc 1000
cagtccccga gctccctgtc cgctctgtg ggcgataggg tcaccatcac 1050
ctgccgtgcc agtcaggaca tccgtaatta tttgaactgg tatcaacaga 1100
aaccaggaaa agctccgaaa ctactgattt actatacctc ccgcctggag 1150
```

ES 2 527 292 T3

tctggagtcc cttctcgctt ctctggttct ggttctggga cggattacac 1200  
tctgaccatc agtagtctgc aaccggagga cttcgcaact tattactgtc 1250  
agcaaggtaa tactctgccg tggacgttcg gacagggcac caagggtggag 1300  
atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcattcttc cgccatctga 1350  
tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact 1400  
tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 1450  
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac 1500  
ctacagcctc agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac 1550  
acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc 1600  
acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa gcttggccgc catggcccaa 1650  
cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia 1700  
atctcacia taaagcattt ttttactgc attctagtgt tggtttgtcc 1750  
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcgatcggg aattaattcg 1800  
gcgcagcacc atggcctgaa ataacctctg aaagaggaac ttggttaggt 1850  
accttctgag gcgaaagaa ccagctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg 1900  
tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac 1950  
tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 2000  
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc 2050  
cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc 2100  
cgccccatgg ctgactaatt tttttattt atgcagaggc cgaggccgcc 2150  
tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 2200  
aggcttttgc aaaaagctgt taacagcttg gcactggccg tcgttttaca 2250  
acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaactaat cgccttgacg 2300  
cacatcccc cttcgccagc tggcgttaata gcgaagaggc ccgcaccgat 2350  
cgcccttccc aacagttgcg tagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgag 2400  
gtatcttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atacgtcaaa 2450  
gcaaccatag tacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg 2500  
tggttacgag cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcggccgct 2550  
cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg 2600  
tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgctttac 2650  
ggcacctcga ccccaaaaaa cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg 2700  
ccatcgcctt gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacggt 2750  
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 2800  
cgggctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg 2850

ES 2 527 292 T3

ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattht aacgcgaatt ttaacaaaat 2900  
 attaacgtht acaatthttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 2950  
 ccgcatagtt aagccaactc cgctatcgct acgtgactgg gtcattggctg 3000  
 cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgctctg 3050  
 ctccccgcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat 3100  
 gtgtcagagg thttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagtattctt 3150  
 gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat thttataggt taatgtcatg 3200  
 ataataatgg thttcttagac gtcaggthggc actthttcggg gaaatgtgcg 3250  
 cggaaccctt atthgtthttat thttctaaat acattcaaat atgtatccgc 3300  
 tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag 3350  
 agtatgagta thcaacattht ccgtgctgcc cttattccct thtttgccg 3400  
 atthtgctt cctgthtttg ctcaccaga aacgctggthg aaagtaaaag 3450  
 atgctgaaga tcagthgggt gcacgagthg gttacatcga actggatctc 3500  
 aacagcggta agatccttga gagthttcgc cccgaagaac gthttccaat 3550  
 gatgagcact thtaagtht tgctatgthg cgcggtatta tcccgtgatg 3600  
 acgccgggca agagcaactc ggtcgcgca tacactattc tcagaatgac 3650  
 thggthgagth actcaccagth cacagaaaag catcttacgg atggcatgac 3700  
 agtaagagaa thtatgagth ctgccataac catgagthgat aacactgccc 3750  
 ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgcttht 3800  
 thgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaaccgga 3850  
 gctgaatgaa gccataccea acgacgagcg tgacaccacg atgccagcag 3900  
 caatggcaac aacgthtgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta 3950  
 gctthcccggc aacaattht agactggatg gaggcggata aagthtgcag 4000  
 accactthctg cgtcggccc thccggctgg ctggthttatt gctgataaat 4050  
 ctggagccgg tgagcgtggg thctcgcggta tcattgcagc actggggcca 4100  
 gatggtaagc cthcccgtat cgtagthtatc tacacgacgg ggagtcaggc 4150  
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 4200  
 thtaagcattg gtaactgtca gaccaagtht actcatatat actthtagatt 4250  
 gattthaaaac thcaththttat atthtaaaag atctaggtga agatccttht 4300  
 tgataatctc atgacaaaa thcccttaacg tgagthttcgc thccactgag 4350  
 cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cthcttgaga thcctthttt 4400  
 ctgctgctaa thctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg 4450  
 ggthttgtht cggatcaag agctaccaac thctthttccg aaggtaactg 4500  
 gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg thcctctagth gtagccgtag 4550  
 thtagccacc actthcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtct 4600

ES 2 527 292 T3

gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 4650  
ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 4700  
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 4750  
cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg 4800  
aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga 4850  
gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc 4900  
tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 4950  
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 5000  
ttctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc 5050  
ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataaccg 5100  
ctcgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg 5150  
gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca 5200  
ttaatccagc tggcacgaca ggtttccga ctggaaagcg ggcagtgagc 5250  
gcaacgcaat taatgtgagt tacctcactc attaggcacc ccaggcttta 5300  
cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca 5350  
atttcacaca ggaaacagct atgacatga ttacgaatta a 5391

<210> 45

<211> 6135

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<400> 45

## ES 2 527 292 T3

attcgagctc gcccgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa 50  
ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 100  
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 150  
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 200  
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta 250  
catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 300  
taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 350  
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 400  
cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 450  
atccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 500  
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg 550  
caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctcg 600  
tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc 650  
tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc 700

ES 2 527 292 T3

attggaacgc ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag 750  
 agtctatagg cccaccccct tggcttcggt agaacgcggc tacaattaat 800  
 acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca ctatagaata 850  
 acatccactt tgcctttctc tccacaggtg tccactcca ggtccaactg 900  
 cacctcgggt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc 950  
 ctttttctag tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctggt 1000  
 ggagtctggc ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc cgtttgcct 1050  
 gtgcagcttc tggctactcc tttaccggct aactatgaa ctgggtgcgt 1100  
 caggccccag gtaagggcct ggaatgggtt gactgatta atcctataa 1150  
 aggtgttact acctatgccg atagcgtcaa gggccgtttc actataagcg 1200  
 tagataaatc caaaaacaca gcctacctgc aatgaacag cctgcgtgct 1250  
 gaggacactg ccgtctatta ttgtgctaga agcggatact acggcgatag 1300  
 cgactgggat tttgacgtct ggggtcaagg aaccctggtc accgtctcct 1350  
 cggcctccac caagggcca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 1400  
 agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgctgggtca aggactactt 1450  
 ccccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg 1500  
 tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 1550  
 agcgtgggtg ctgtgccctc tagcagcttg ggacccaga cctacatctg 1600  
 caacgtgaat cacaagcca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc 1650  
 ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 1700  
 ctctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac 1750  
 cctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga 1800  
 gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1850  
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta 1900  
 ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca 1950  
 aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 2000  
 aaaaccatct ccaaagcca agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac 2050  
 cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 2100  
 gcctgggtcaa aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 2150  
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 2200  
 cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt 2250  
 ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2300  
 aaccactaca cgagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg 2350  
 acggccctag agtcgacctg cagaagcttg gccgccatgg cccaacttgt 2400

ES 2 527 292 T3

ttattgcagc ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaaatttc 2450  
 acaataaag catttttttc actgcattct agttgtgggt tgtccaaact 2500  
 catcaatgta tcttatcatg tctggatcga tcgggaatta attcggcgca 2550  
 gcaccatggc ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttgggt taggtacctt 2600  
 ctgaggcgga aagaaccatc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa 2650  
 agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat 2700  
 tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccc ggctccccag caggcagaag 2750  
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 2800  
 ctccgcccac cccgccccta actccgccc gttccgccc ttctccgcc 2850  
 catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc 2900  
 ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct 2950  
 tttgcaaaaa gctgttaaca gcttggcact ggccgtcgtt ttacaacgtc 3000  
 gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagcacat 3050  
 ccccccttcg ccagttggcg taatagcgaa gaggcccga ccgatcgccc 3100  
 ttccaacag ttgcgtagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt 3150  
 ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatacg tcaaagcaac 3200  
 catagtacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtgggt 3250  
 acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt 3300  
 cgctttcttc ctttccttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag 3350  
 ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac 3400  
 ctcgacccca aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc 3450  
 gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta 3500  
 atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcgggc 3550  
 tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaa 3600  
 aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa 3650  
 cgtttacaat tttatggtgc actctcagta caatctgctc tgatccgca 3700  
 tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat ggctgcgccc 3750  
 cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 3800  
 ggcacccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc 3850  
 agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagta ttcttgaaga 3900  
 cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat 3950  
 aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgvcggaa 4000  
 cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 4050  
 agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 4100  
 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 4150

ES 2 527 292 T3

gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 4200  
 gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 4250  
 cggtaaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 4300  
 gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tgatgacgcc 4350  
 gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 4400  
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa 4450  
 gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac 4500  
 ttactttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 4550  
 caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcggtgggaa ccggagctga 4600  
 atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc agcagcaatg 4650  
 gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc 4700  
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 4750  
 ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 4800  
 gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg 4850  
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 4900  
 tggatgaacg aatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag 4950  
 cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 5000  
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5050  
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 5100  
 gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcy 5150  
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtgggtt 5200  
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggc aactggcttc 5250  
 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 5300  
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa 5350  
 tcctgttacc agtggctgct gccagtgcg ataagtcgtg tcttaccggg 5400  
 ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgagcggc cgggctgaac 5450  
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac 5500  
 tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 5550  
 agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 5600  
 cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 5650  
 ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgctcagg 5700  
 gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 5750  
 ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttcctgcy ttatcccctg 5800  
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 5850

# ES 2 527 292 T3

cgagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 5900  
gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcggtggccg attcattaat 5950  
ccaactggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggag tgagcgcaac 6000  
gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg ctttacctt 6050  
tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 6100  
acacaggaaa cagctatgac catgattacg aatta 6135

<210> 46

<211> 6

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

10 <221> Inseguro

<222> 2

<223> Base desconocida

<400> 46

cncaat 6

15 <210> 47

<211> 6

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> La secuencia es sintetizada

<400> 47

aataaa 6

1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo humanizado que se enlaza a TGF-beta que comprende un dominio variable pesado ( $V_H$ ) que comprende residuos de una región hipervariable no humana incorporados en un dominio  $V_H$  humano, comprendiendo dicho dominio variable regiones marco (FR) de hIII como se muestra en la figura 1B (SEQ ID NO: 6) con sustitución en la posición 49 y posición 72, y adicionalmente en la posición 68, 48, 70, 74, o 79; en donde
- a) en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 68 la fenilalanina es cambiada a una alanina, y en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina;
- 10 b) en la posición 48 la valina es cambiada a una isoleucina, en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, y en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina;
- c) en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 70 la isoleucina es cambiada a una leucina, y en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina;
- d) en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina, y en la posición 74 la asparagina es cambiada a una lisina; o
- 15 e) en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina, y en la posición 79 la leucina es cambiada a una alanina; y
- a) que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio  $V_L$  huxTGFB como se muestra en la figura 1A (SEQ ID NO: 3); y
- 20 b) que comprende los residuos de región determinante de la complementareidad (CDR) del dominio  $V_H$  GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 21); VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 22); y SGGFYFDY (SEQ ID NO: 23), o que comprende los residuos de la región determinante de la complementareidad (CDR) del dominio  $V_H$  GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 21); VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO: 43); y SGGFYFDY (SEQ ID NO: 23); o
- que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio  $V_H$  en SEQ ID NO: 4.
- 25 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 70 la isoleucina es cambiada a una leucina, y en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina, en donde una sustitución en FR adicional es en la posición 74 en SEQ ID NO: 6, especialmente en donde en la posición 74 la asparagina es cambiada a una lisina.
3. El anticuerpo humanizado en las reivindicaciones 1 o 2
- a) que es un anticuerpo IgG1 intacto o un fragmento de anticuerpo, particularmente un fragmento Fab; y/o
- 30 b) que no está conjugado con un agente citotóxico o que está conjugado con un agente citotóxico.
4. El anticuerpo humanizado en la reivindicación 1 en donde en la posición 49 la alanina es cambiada a una glicina, en la posición 68 la fenilalanina es cambiada a una alanina, y en la posición 72 la arginina es cambiada a una alanina, en donde el anticuerpo
- 35 (i) comprende adicionalmente una sustitución en la posición 51 en el FR de SEQ ID NO: 6, en donde la asparagina es cambiada a una isoleucina.
5. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo se enlaza a una o más de las siguientes: TGF-beta1 y TGF-beta2.
6. Una composición que comprende el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo.
- 40 7. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
8. Un vector o una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Un proceso para producir un anticuerpo humanizado que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 8 de tal manera que el ácido nucleico sea expresado y el anticuerpo sea producido, que comprende

opcionalmente de manera adicional la recuperación del anticuerpo del cultivo de la célula anfitriona preferiblemente del medio de cultivo de la célula anfitriona.

- 5 10. El proceso de la reivindicación 9 en donde, antes de cultivarla, la célula anfitriona es cotransfectada con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable.
- 10 11. El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en un método para tratar un trastorno por TGF-beta en un mamífero, en donde se va a administrar una cantidad efectiva del anticuerpo humanizado al mamífero, y en donde el trastorno es fibrosis, una lesión arterial, una infección, artritis reumatoide, o cáncer, particularmente donde el cáncer es cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de seno, cáncer de ovarios o melanoma maligno.
12. El anticuerpo humanizado para uso en un método para tratar un trastorno por TGF-beta de la reivindicación 11,
- a) en donde el mamífero es un primate;
- b) en donde el mamífero es un humano; y/o
- 15 c) en donde una cantidad efectiva de un agente terapéutico diferente al anticuerpo humanizado va a ser administrada adicionalmente al mamífero, particularmente en donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antiangiogénico, o un anticuerpo, especialmente en donde el agente terapéutico es un agente antiangiogénico.
13. El anticuerpo humanizado para uso en un método para tratar un trastorno por TGF-beta de la reivindicación 12 c),
- 20 a) en donde el agente terapéutico es un anticuerpo, particularmente
- (i) en donde el anticuerpo se enlaza a un factor de crecimiento endotelial vascular, o
- (ii) en donde el anticuerpo se enlaza al antígeno Her-2;
- b) en donde el anticuerpo es un anticuerpo intacto, o un fragmento de un anticuerpo, particularmente un fragmento Fab; y/o
- 25 c) en donde el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico o no está conjugado con un agente citotóxico.
14. Uso del anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la manufactura de un medicamento para tratar un trastorno por TGF-beta en un mamífero, en donde una cantidad efectiva del medicamento va a ser administrada al mamífero, y en donde el trastorno es fibrosis, una lesión arterial, una infección, artritis reumatoide, o cáncer, particularmente en donde el cáncer es cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de seno, cáncer de ovarios, o melanoma maligno, particularmente en donde el anticuerpo puede ser como se define en la reivindicación 12 o 13.
- 30 15. El anticuerpo humanizado para uso en un método para tratar un trastorno por TGF-beta de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el anticuerpo se enlaza a uno cualquiera o más de las siguientes: TGF-beta1 y TGF-beta2.
- 35 16. Un método para detectar una TGF-beta en una muestra corporal que comprende poner en contacto el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con la muestra corporal y determinar si ha ocurrido el enlazamiento del anticuerpo a la TGF-beta.
- 40 17. Un artículo de manufactura que comprende un contenedor que contiene el anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 e instrucciones que dirigen a un usuario para tratar un trastorno por TGF-beta en un mamífero con el anticuerpo en una cantidad efectiva, comprendiendo de manera adicional particularmente un contenedor que contiene un agente terapéutico diferente al anticuerpo humanizado, en donde las instrucciones dirigen al usuario para tratar el trastorno con el anticuerpo en combinación con el agente en cantidades efectivas, y/o particularmente en donde el mamífero es un humano.
- 45 18. Un anticuerpo de TGF-beta de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 y un anticuerpo que se enlaza al factor de crecimiento endotelial vascular para uso en un método para tratar cáncer en un mamífero en donde una cantidad efectiva del anticuerpo de TGF-beta y un anticuerpo que se enlaza al factor de crecimiento endotelial vascular se van a administrar al mamífero.

19. El anticuerpo de TGF-beta y un anticuerpo que se enlaza al factor de crecimiento endotelial vascular para uso en un método para tratar cáncer de la reivindicación 18,

a) en donde el mamífero es humano;

b) en donde el anticuerpo de TGF-beta se enlaza a una o más de las siguientes: TGF-beta1 y TGF-beta2;

5 c) en donde el anticuerpo se enlaza a TGF-beta1; y/o

d) en donde el anticuerpo se enlaza a TGF-beta 1 y TGF-beta2.

20. Uso de un anticuerpo de TGF-beta de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 y un anticuerpo que se enlaza a un factor de crecimiento endotelial vascular para la manufactura de un medicamento para tratar cáncer en un mamífero, en donde una cantidad efectiva del medicamento va a ser administrada al mamífero, particularmente en donde el anticuerpo puede ser definido como en la reivindicación 19.

10

**FIG. 1A**

Liviano Variable

	10	20	30	40
			CDR-L1	
2G7	D <u>I</u> M <u>M</u> TQSPSSLA <u>V</u> SAGEKVTMS <u>C</u> K <u>S</u> S <u>S</u> QSVLYSSNOKNYLAWYQQKPGQS			
	*	* * * *	* * *	**
huxTGFB	D <u>I</u> Q <u>M</u> TQSPSSLSASV <u>G</u> DRVTIT <u>C</u> RAS <u>S</u> QSVLYSSNOKNYLAWYQQKPGKA			
			*****	
huK1	D <u>I</u> Q <u>M</u> TQSPSSLSASV <u>G</u> DRVTIT <u>C</u> RAS <u>S</u> ISIS-----NYLAWYQQKPGKA			
huCDR			RASQGIS-----SYLA	
	50	60	70	80
		CDR-L2		
2G7	P <u>K</u> LLIY <u>W</u> AST <u>R</u> ES <u>G</u> VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC			
		* *	* * * *	
huxTGFB	P <u>K</u> LLIY <u>W</u> AST <u>R</u> ES <u>G</u> VPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC			
	* *			
huK1	P <u>K</u> LLIY <u>A</u> ASS <u>L</u> ES <u>G</u> VPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC			
huCDR	YASSLQS			
	90	100		
		CDR-L3		
2G7	<u>H</u> QYL- <u>S</u> SDT <u>F</u> GGG <u>T</u> KLEIKRTVA			
		* *		
huxTGFB	<u>H</u> QYL- <u>S</u> SDT <u>F</u> GGG <u>T</u> KVEIKRTVA			
	*	*****		
huK1	<u>Q</u> QYNSL <u>P</u> WT <u>F</u> GQGT <u>K</u> VEIKRT			
huCDR	QQYNSYPYT			

**FIG. 1B**

Pesado Variable

	10	20	30	40			
			CDR-H1				
2G7	<u>QVxLxQSGAELV</u> RPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPQGLEWIG						
	* *						
huxTGFB	<u>EVQLVESGGGLV</u> QPGGSLRLSCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWVG						
	* *						
huIII	<u>EVQLVESGGGLV</u> QPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA						
huCDR	GFTFSSYAMH						
	50	a	60	70	80	abc	90
		CDR-H2					
2G7	<u>VNNPGSGGSNY</u> NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR						
	* *						
huxTGFB	<u>VNNPGSGGSNY</u> NEKFKGRATISADNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR						
	***** *						
huIII	<u>VISGDGGSTY</u> YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR						
		100	110				
		CDR-H3					
2G7H	<u>SGGFYFDY</u> WGQGTQSPSPQPKRAH						
	* *						
huxTGFB	<u>SGGFYFDY</u> WGQGLVTVSSASTKGPS						
	* *						
huIII	<u>GRGxSFDY</u> WGQGLVTVSS						

**FIG. 2**

2G7 CDR Humanizadas (V5)

CDR L1 [RASQSVLYSSNQKNYLA]

5' -  
AGA GCCAGTCAGAGCGTGTGTATAGTT CGAATCAGAAGAACTACCTGGCC-3'

CDR L2 [WASTRES]

5' -TGGGCTAGTACTCGCGAGTCT-3'

CDR L3 [HQYL-SSDT]

5' -CACCCAGTATCTGAGCTCTGACACA-3'

CDR H1 [GYAFTNYLIE]

5' -GGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAG-3'

CDR H2 [VNNPGSGGSNYNEKFKG]

5' -GTTAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACATAACGAGAAGTTCAAGGGG-  
3'

CDR H3 [SGGFYFDY]

5' -TCCGGAGGCTTCTACTTCGACTAC-3'

Para el precursor de murina, los CDR son los mismos como en la versión humanizada, excepto para L1 que aquí es:

CDR L1 [KSSQSVLYSSNQKNYLA]

5' AAGTCCAGTCAAAGTGT TTTATACAGTTCAAATCAGAAGAACTACTTGGCC-3'

FIG. 3

```

: : : : : : : : : : : :
p1.xTGFb.709.LandH.IgG1.RK
: : : : : : : : : : : :
< Mon Apr 2 11:49:24 2001
< /tmp_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.709.IgG1.LandH.RK (2676
bases)

```

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECOEVLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWIGVNNPSSGGSNYNEKFKGRFTISADNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT
CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

```

```

<666 residuos, 1 detención; peso molecular: 72869.74
: : : : : : : : : : : :
p1.xTGFb.H2-N1.V5L.RK.theo
: : : : : : : : : : : :
< Tue May 22 20:20:57 2001
< /tmp_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.H2-N1.V5L.RK.theo (2518
bases)

```

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECOEVLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWIGVNNPSSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT
CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKOVRRPOSRAEAWPPWPNLFIAAYNGYK

```

```

<692 residuos, 3 detenciones; peso molecular: 75854.20
: : : : : : : : : : : :
p1.xTGFb.V11.LandH.IgG1.RK
: : : : : : : : : : : :
< Fri Mar 30 11:33:04 2001
< /tmp_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.V11.LandH.IgG1.RK (2639
bases)

```

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECOEVLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWIGVNNPSSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
KVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
LSLSPGK

```

```

<666 residuos, 0 detenciones; peso molecular: 72775.63

```

FIG. 3 (cont.)

.....:
pl.xTGFb.V5.LandH.IgG1.RK
.....:
< Mon Mar 12 16:08:26 2001
< /tmp\_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.V5.LightandHeavy.RKthe
(3261 bases)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYLSSTDFGQGTKEIKRTVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECOEVLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWVGWVNNPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLY
LQMNLSRAEDTAVVYCARSGGFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEGLHNHYTQKS
LSLSPGK

<666 residuos, 1 detención; peso molecular: 72765.59
.....:
pl.xTGFb.chim.LandH.IgG1.RK
.....:
< Mon Mar 12 16:34:44 2001
< /tmp\_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFbchim.LandH.RKthe (2751
bases)

DIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQAEEDLAVVYCHQYLSSTDFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECOEVLQSGGAELVLRPGTSVKV
SCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVNNPGSGGSNYNEKFKGKATLTADKSSSTAY
MQLSSLTSDSAVYFCARSGGFYFDYWGQGTSTVTVSSAKTTGPSVFPPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

<666 residuos, 1 detención; peso molecular: 72695.56
.....:
pl.xTGFb.g1L2.V5H.RK.theo
.....:
< Wed May 23 18:16:21 2001
< /tmp\_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.g1L2.V5H.RK.theo (2678
bases)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYLSSTDFGQGTKEIKRTVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECOEVLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWVGWVNNPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLY
LQMNLSRAEDTAVVYCARSGGFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEGLHNHYTQKS
LSLSPGK

**FIG. 4**

```

>xTGFb_709_Heavy_Ig_nosig [1341 bases]
GAAGTTTCTAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTT
TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTCAAGCC
CCGGGTAAGGGCCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACAT
AACGAGAAGTTCAAGGGCGCTTCTACTATAAGTGCAGACAATTCGAAAAACACATATAC
CTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA
GGCTTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGCTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCA
GGCGCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAATCACACA TGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAAGTC
TTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGACAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAG
AACCCAGTCAAGCCTGACCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC
GACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGC
CTTCCCTGTCTCCGGGTAAA

>xTGFb_709_Heavy_Ig_sig [1398 bases]
ATGGGATGGTCAATGATATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGAA
TTACAGTCTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC
TGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTCAAGCCCG
GGTAAGGGCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACATATAAC
GAGAAGTTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGTGCAGACAATTCGAAAAACACATATACCTG
CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGAGGC
TTCTACTTCCACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACAAG
GGCCACTCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAATCACACATGC CCACCGTGCACAGCACCTGAATCCTGGGGGGACCGTCACTTCT
CTTCCCCCAAAA CCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGC
GTGGTGGTGGAGCGTGAAGCCAGAACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGG
CAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCTTCTTCTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

>xTGFb_H2-NI_Heavy_Ig_nosig [1341 bases]
GAAGTTTCTAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTT
TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTCAAGCC
CCGGGTAAGGGCCTCGAGTGGGTGGTGTATCAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACAT
AACGAGAAGTTCAAGGGCGGCCACTATCAGTGCAGACAATTCGAAAAACACATATAC
CTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA
GGCTTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGCTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCA
GGCGCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAATCACACA TGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAAGTC
TTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CCGGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG

```

**FIG. 4 (cont.)**

TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA  
 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAG  
 AACCAGGTACGCTGACCTGGCTGGTCAAAGGC'TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC'GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG  
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT'CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC  
 CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

>xTGFb\_H2-NI\_Heavy\_Ig\_sig [1400 bases]

ATGGGATGGTCATGTATCATCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTAGAA  
 GTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC  
 TGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTGAGGCCCG  
 GGTAAGGGCCTCGAGTGGGTGGTGTATCAATCTTGGATCCGGAGGCTCCAACATAAC  
 GAGAAGTTCAAGGGGCGCGCCACTATCAGTGCAGACAATTCGAAAAACACATTATACCTG  
 CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCC'GTCTATTATTGTGCTCGATCCGGAGGC  
 TTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGTCTACCCTCTCCTCAGCCTCCACCAAG  
 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCC'AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC  
 CTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA'CCGGTGCAGGTGTCTGTGAACTCAGGC  
 CCGCTGACAGCGCGTGCACACCTTCCCGCT'GTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTGA'CTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC  
 GTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC  
 AAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCT'GA'ACTCTGGGGGGACCGTCACTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCCCTCATG'ATCTCCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAG'GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGCAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCAG  
 GTGCTCAGCGTCTC'ACCCTCTG'CAACAGGAC'TGGCTGAATGGCAAGGATCAAGTGC  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACCACAGTGTACACCTGCC'CCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTGACCTGACCTGCC'GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC'CTACAAGACACAGCCTCCCGTGTGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC  
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATG

>xTGFb\_V11\_Heavy\_Ig\_nosig [1341 bases]

GAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTG  
 TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTGAGGCC  
 CCGGTAAAGGCGCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAAGTAT  
 AACGAGAAGTTCAAGGGGCGCGCCACTATCAGTGCAGACAATTCGAAAAACACATTATAC  
 CTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCC'GTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA  
 GGCTTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCT'GGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC  
 AAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCT'CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG  
 GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA'ACTCA  
 GCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC  
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGA'CTGTGCCCTTAGCAAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT  
 GACAAAAC'TCACATGCCCACCGTGC'CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAAGT  
 TTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCT'CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACA  
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC  
 GCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC  
 CGTGTGGTGCAGCGTCTC'ACCCTCTG'CAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG  
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCA'TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA  
 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC'CCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAG  
 AACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCT'TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC'CTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG  
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC  
 CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

>xTGFb\_V11\_Heavy\_Ig\_sig [1398 bases]

ATGGGATGGTCATGTATCATCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTAGAA  
 GTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC  
 TGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTGAGGCCCG  
 GGTAAGGGCCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAATCTTGGATCCGGAGGCTCCAACATAAC  
 GAGAAGTTCAAGGGGCGCGCCACTATCAGTGCAGACAATTCGAAAAACACATTATACCTG  
 CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCC'GTCTATTATTGTGCTCGATCCGGAGGC  
 TTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGTCTACCCTCTCCTCAGCCTCCACCAAG  
 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCC'AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC  
 CTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA'CCGGTGCAGGTGTCTGTGAACTCAGGC  
 CCGCTGACAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC  
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGA'CTGTGCCCTTAGCAAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT  
 GACAAAAC'TCACATGCCCACCGTGC'CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAAGT  
 TTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCT'CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACA  
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC  
 GCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC  
 CGTGTGGTGCAGCGTCTC'ACCCTCTG'CAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG  
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCA'TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA  
 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC'CCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAG  
 AACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCT'TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC'CTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG  
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC  
 CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

**FIG. 4 (cont.)**

GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTTAGCA\_GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC  
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC  
 AAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC CTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCA TGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT  
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCA TCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGC CCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG  
 GAGGCAATGGGAGCCGGAGAACACTACA AGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGACAACCACTACACGCAGAAGAGCTC  
 TCCTGTCTCCGGTAAA

>xTGFb\_V5\_Heavy\_Ig\_nosig [1341 bases]

GAAGTT\_CAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCC TGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTG  
 TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTGAGCC  
 CCGGGTAAGGGCCTCGAGTGGGTGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAATAT  
 AACGAGAAGTTCAAGGGCGCGCACTATCA GTGCAGACAATTGAAAAACACATATAC  
 CTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACA CTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA  
 GGCTTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAA CCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC  
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG  
 GCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCA  
 GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC  
 TCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAATCTTGT  
 GACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCCGTGAGTCT  
 TTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACA  
 TGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC  
 GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC  
 CGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTTGCACC AAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG  
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA  
 GGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTT GCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAG  
 AACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG STTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCAGCCTCCCGTGGTGGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG  
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG STTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC  
 CTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

>xTGFb\_V5\_Heavy\_Ig\_sig [1398 bases]

ATGGGATGGTCAATGATCATCTTTTCTAGTAGCAA CTGCAACTGGAGTACATTCAGAA  
 GTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGT GCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC  
 TGTGAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTA TCTGATCGAGTGGGTCCGTGAGCCCGCG  
 GGTAAGGGCCTCGAGTGGGTGGTGTAAACA TCTGGATCCGGAGGCTCCAATATAAC  
 GAGAAGTTCAAGGGCGCGCCACTATCAGTGCAGACAATTGAAAAACACATATACCTG  
 CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGC CGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGAGGC  
 TTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCTT GGTCAACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAG  
 GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC  
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGC  
 GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTTAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC  
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC  
 AAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT TGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATG ATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT  
 GTGGTCAAGCTCTCACCGTCTTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG  
 CAGCCCCGAAACACAGCTACACCTGCC CCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG  
 GAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACACTACAA GACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG STTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTC  
 TCCTGTCTCCGGTAAA

**FIG. 4 (cont.)**

```

>xTGFb_V5_Light_nosig [657 bases]
GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACC
ATCACCTGCAGAGCCAGTCAGAGCGTGCTGTATAGTTCTGAATCAGAAGAACTACCTGGCC
TGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTGGGCTAGTACTCGC
GAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGA.TCCGGTTCCTGGGACGGATTTCACTCTGACC
ATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTAFACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCT
GACACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAA.GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
>xTGFb_V5_Light_sig [714 bases]
ATGGGATGGTCAATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGAT
ATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATC
ACCTGCAGAGCCAGTCAGAGCGTGCTGTATAGTTCTGAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGG
TATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTGGGCTAGTACTCGCGAG
TCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATC
AGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTAFACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCTGAC
ACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
>xTGFb_gll2_Light_nosig [657 bases]
GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACC
ATCACCTGCAGAGCCAGTCAGAGCGTGCTGTATAGTTCTGAATCAGAAGAACTACCTGGCC
TGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATGCTAGCAGTCTC
CAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGA.TCCGGTTCCTGGGACGGATTTCACTCTGACC
ATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTAFACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCT
GACACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAA.GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
>xTGFb_gll2_Light_sig [714 bases]
ATGGGATGGTCAATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGAT
ATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATC
ACCTGCAGAGCCAGTCAGAGCGTGCTGTATAGTTCTGAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGG
TATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATGCTAGCAGTCTCCAG
TCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATC
AGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTAFACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCTGAC
ACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

```

**FIG. 5**

Enlazamiento de variantes de 2G7 IgG a TGFbeta

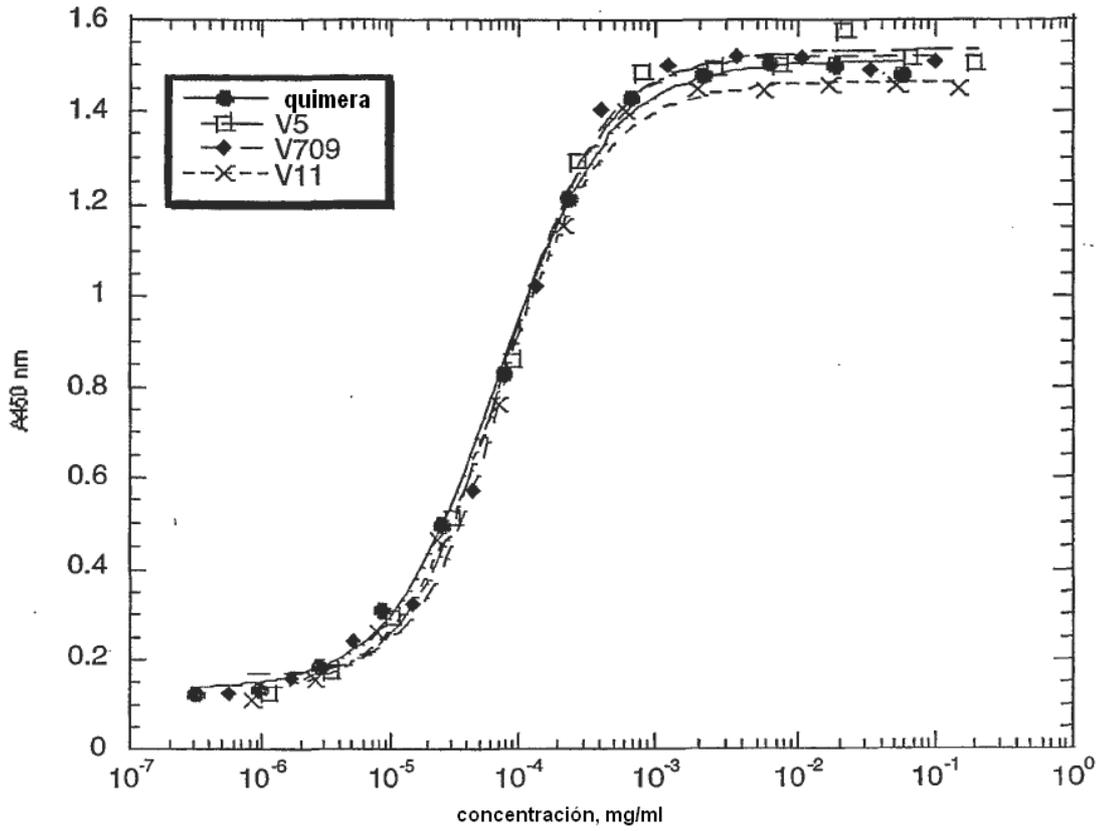


FIG. 6

TFCGAGCTCGCCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA  
 TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT  
 GGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCATAAATGACGTATGTTCCCATAGTA  
 ACGCCAATAGGGACTTTCATGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCAC  
 TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATGACGTCAATGACGGT  
 AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCATTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG  
 TACATCTACGTATTAGTCTACGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAAT  
 GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAAT  
 GGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCGCC  
 CCATTGACGCAAAATGGGCGTAGGGCTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT  
 TTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAGA  
 CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCCGGGAACGGTGCATTGGAAACGGGATTCCCGGT  
 GCAAGAGTGCAGTAAGTACCGCTATAGAGTCTATAGGCCACCCTTGGTGGCTTCTGTTA  
 GAACGCGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATAAGATTAGGTGACAC  
 TATAGAATAACATCCACTTTCCTTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACTGC  
 ACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCTATGTATCATCCTTTTCTAGT  
 AGCAACTGCAACTGGAGTACATTGAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTC  
 CGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCAACATCACCTGCCGTGCCAGTCAAGGACATCCGTAATTA  
 TTTGAACCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATACCTC  
 CCGCTGCGAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGTTCTGTTCTGGGACGGATTACAC  
 TCTGACCATCAGTAGTCTGCAACCGGAGGACTTCGCAACTTATTACTGTCCAGCAAGOTAA  
 TACTCTGCCGTGGACGTTCCGACAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGC  
 ACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTCTGT  
 TGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAAGTGGAGGTGGATAA  
 CGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAAGCAAGGACAGCAC  
 CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA  
 CGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG  
 AGAGTGTAAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTATTATGACGCTTATAATGGTTACAA  
 ATAAGCAATAGCATCAAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCAATCTAGTTG  
 TGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGCTGAGATCGATCGGGAAATAATTG  
 GCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAGAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAG  
 GCGGAAAGAACCCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCC  
 CAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACAGGTGTGGAAAGT  
 CCCAGGCTCCCAGCAGGCAAGATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA  
 TAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCACTTCCGCCCATCTC  
 CGCCCAATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCCGAGGC CGCCTCGGCCCTG  
 AGCTATTCCAGAAGTAGTGGAGGGCTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAGCTGT  
 TAACAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGACTGGGAAACCCCTGGCGTTAC  
 CCAACTTAATCGCCTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAAATAGCGAAGAGGC  
 CCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCG  
 GTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGATACCTCAAAGCAACCATAG  
 TACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCTGACC  
 GCTACACTFGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCC  
 ACGTTCGCGCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTT  
 AGTGCCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTTGGGTGATGTTCAAGTAGTGGG  
 CCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCCCTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGT  
 GGACTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGGCTATTCCTTTGATTTA  
 TAAGGGATTTTCCGATTTCCGCTATTTGGTTAAAAATGAGCTGA TTTAACAAAATTT  
 AACCGAATTTTAAACAAAATTAACGTTTACAATTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATC  
 TGCTCTGATGCCCATAGTTAAGCCACTCCGCTATCGCTACGTGA CTGGGTGATGGCTG  
 CGCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCAT

FIG. 6 (cont)

CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGT  
 CATCACCGAAACGCGCGAGGCAGTATPCTTGAAGAGGAAAGGGCCCTCGTGATACGCCAT  
 TTTTATAGGTTAATGTTCATGATAAATAATGGTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG  
 GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAATATGTATCCGC  
 TCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAAGATATGAGTA  
 TTCAACATTTCCGTGTGCCCCCTATTTCCCTTTTTCGGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTG  
 CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG  
 GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCCTGAGAGTTTTTCGCCCCCGAAGAAC  
 GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGATG  
 ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCGCATACACTATPCTCAGAATGACTTGGTTGAGT  
 ACTCACCGAGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGAGTG  
 CTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACCGATCGGAGGAC  
 CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCTTGTATCGTT  
 GGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACCGATGCCAGCAG  
 CRATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC  
 AACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCCTTCTGCGCTCGGCC  
 TTCGGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA  
 TCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG  
 GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA  
 TTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAC  
 TTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA  
 TCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT  
 CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGC  
 TACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTG  
 GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC  
 ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG  
 CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG  
 ATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACCGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA  
 CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCA CGCTTCCCG  
 AAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGA  
 GGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCCGCCACTCT  
 GACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCA  
 GCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCTGGCCCTTTGCTGGCCTTTTGTCTACA TGTCTTTTC  
 CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAACCGCCTTTGAGTGAGCTGTATACCG  
 CTCGCCGACCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGZAGAGCGCC  
 CAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATCCAGCTGGCACGACA  
 GTTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTC  
 ATTAGGCACCCACGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGAAATGTGA  
 GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTAA

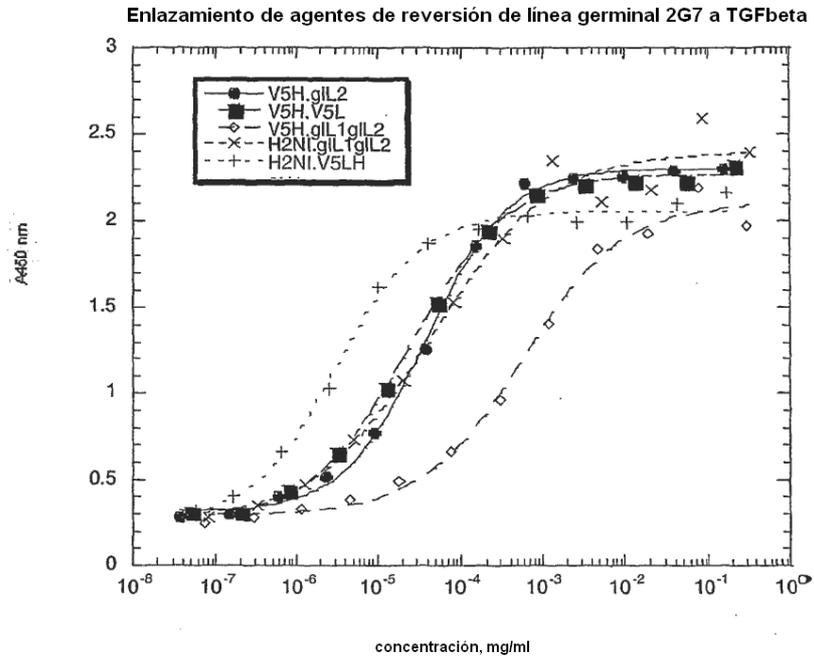
FIG. 7

ATTCGAGCTCGCCGACATFGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGC  
 TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAAATGACGTATGTTCCCATAGT  
 AACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA  
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGG  
 TAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCCCTACTTGGCA  
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA  
 TGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCECATGACGTCAA  
 TGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACTCCGC  
 CCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG  
 TTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAG  
 ACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGGGATTCCCG  
 TGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCCCTGGCTTCGTT  
 AGAACGGCGGTACAATTAATACATAAACCCTATGTATCATAACATACGATTTAGGTGACA  
 CTATAGAATAACATCCACTTTGCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCTCACTG  
 CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCAATGATCATCCTTTTTCTAG  
 TAGCAACTGCAACTGGAGTACATTGAGAGTTGAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGG  
 TGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTACTCCTTTACCGGCT  
 ACACATGAACGGGTGCGTCAGGCCCCAGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCACTGATTA  
 ATCCTTATAAAGGTGTTACTACCTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCG  
 TAGATAAATCCAAAACACAGCCTACCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACTG  
 CCGTCTATTATTGTGCTAGAAGCGGATACTACGGCGATAGCGACTGGTATTTGACGTCCT  
 GGGTCAAGGAACCTGGTCAACGTCCTCCCGCCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC  
 CCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
 AGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCG  
 TGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA  
 CTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGFGAATCACAGCCCA  
 GCAACACCAAGGTGGAACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC  
 CACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAC  
 CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA  
 GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAACCGTGTGGTCAAGCTCCCAACAAG  
 CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCCTCAACAAG  
 CCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACAC  
 AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT  
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC  
 CGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCTCATGCTCCG  
 TGATGCAATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
 AATGAGTGGACGGCCCTAGAGTGCACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGT  
 TTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAATAAAG  
 CATTTTTTTCATGCACTTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCAPCAATGTATCTTATCATG  
 TCTGGATCGATCGGGAATTAATTCGGCGCAGCACCATGGCCCTGAAATAACCTGTGAAAGA  
 GGAACCTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCATCTGTGGAATGTGTGTCAAGTTA  
 GGGTGTGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGGAGGAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT  
 TAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGGACAGAGTATGCAAAGC  
 ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTA  
 ACTCCGCCAGTTCGGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCA  
 GAGGCCGAGGCCGCTCGCCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGGA  
 GGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTGTTAACAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAAAGTC  
 GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCG

FIG 7 (cont)

CCAGTTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGGTAGCC  
 TGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTAGGCATCTGTGCGGTATTTCAC  
 ACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGGGGGCATTAAAGCGCGGCGGG  
 TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT  
 CGCTTTCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG  
 GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGA  
 TTTGGGTGATGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC  
 GTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTGTTCAAAACGGAACAACACTCAACCC  
 TATCTCGGGCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAA  
 AATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAAAT  
 ITTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAACCTCCGCTA  
 TCGCTACGTGACTGGGTCTGGCTGCGCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACCGGCC  
 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGC  
 TGCATGTGTACAGAGTTTTCACCGTCAACCGGAAACCGCGGAGGCAGTATTCTTGAAGA  
 CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGGTTCT  
 TAGACGTCAAGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTC  
 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAA  
 TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCCGCTTATCCCTTTTTC  
 GCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAAAGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT  
 GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGCATC  
 CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTA  
 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGGCATAAC  
 TATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGC  
 ATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC  
 TTAATCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATG-GGG  
 GATCATGTAACCTCGCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC  
 GAGCGTGACACCAGATGCCAGCAGCAATGGCAAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACGGC  
 GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGGCGGATAAAATT  
 GCAGGACCCTTCTGCGCTCCGGCCCTTCCCGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGA  
 GCCGGTGAGCGTGGTCTCCCGGTATCATTCAGCACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCCTCC  
 CGTATCGTATTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA-CAG  
 ATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGCAGACCAAGTTTAC-TCA  
 TATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC  
 CTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTGGTTCCACTGAGCGTCA  
 GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC  
 TGCTTGCAAAACAAAAAACCCAGCTACCCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTA  
 CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACGTCTCTT  
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC  
 GCTCTGCTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACC-GGG  
 TTGSACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCG  
 TGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAACTGAGATACCTACGCGTGAG  
 CATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC  
 AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTAT  
 AGTCTGTGGGTTTTCGCCACCCTGACTTGAGCGTCTGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGG  
 GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGC  
 TGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTCGGTTATCCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATT  
 ACCGCCTTTGAGTGGCTGATACCGCTCCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA  
 GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGGTTGGCCG  
 ATTCATTAATCCAACTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC  
 GCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG  
 GCTCGTATGTTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGAC  
 CATGATTACGAATTA

FIG. 8



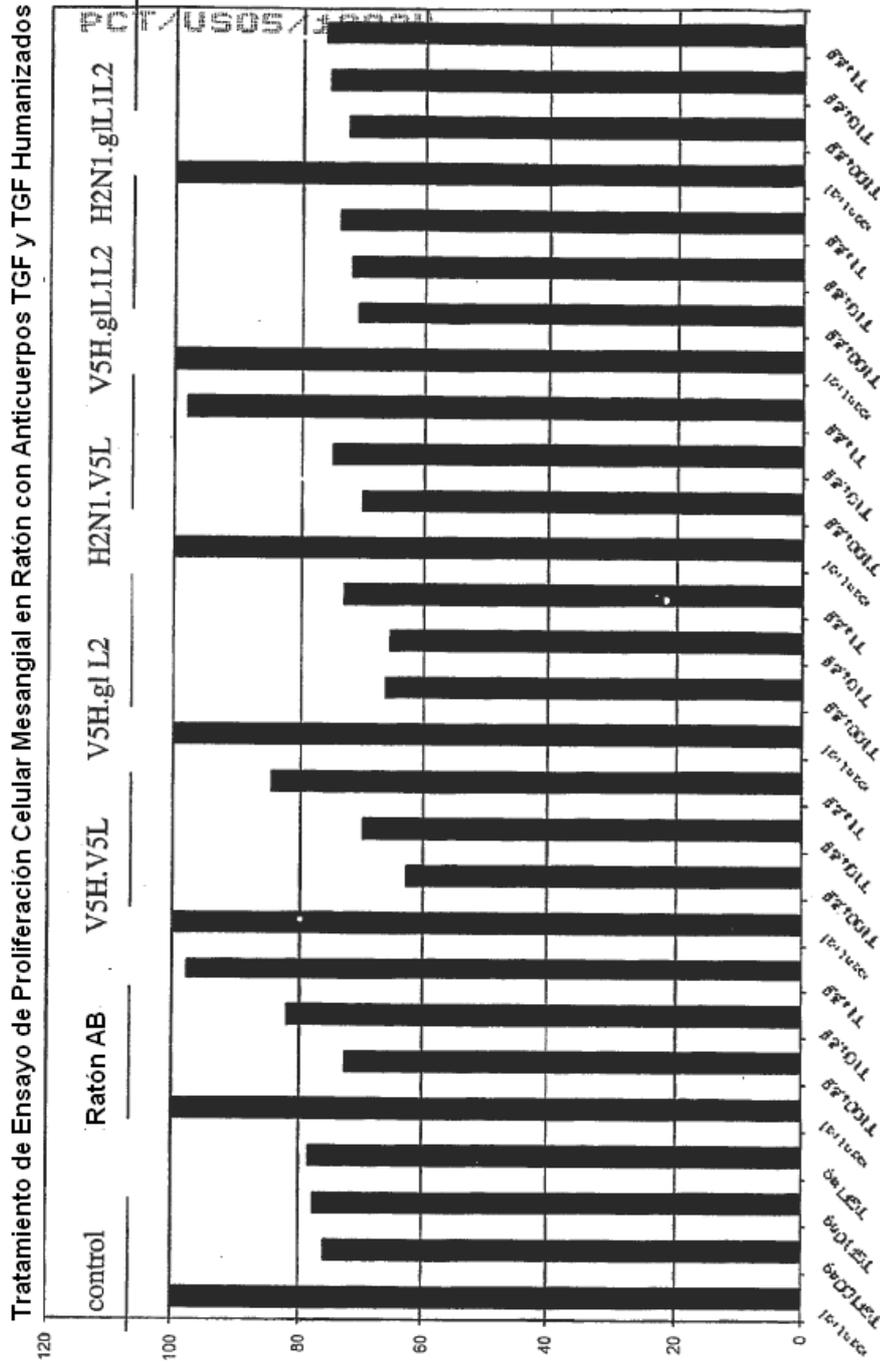


FIG. 9

Neutralización de TGF-β3

FIG. 10A

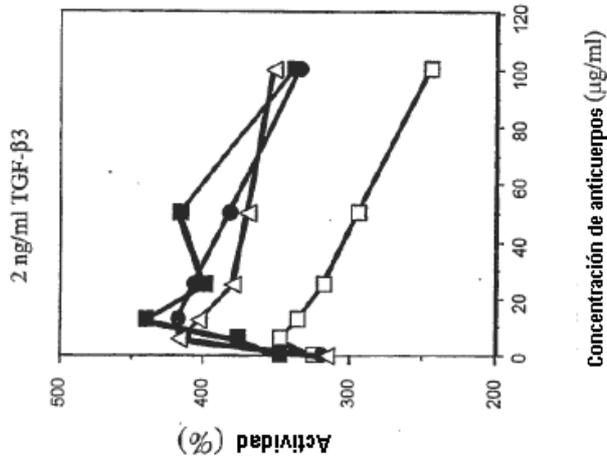


FIG. 10B

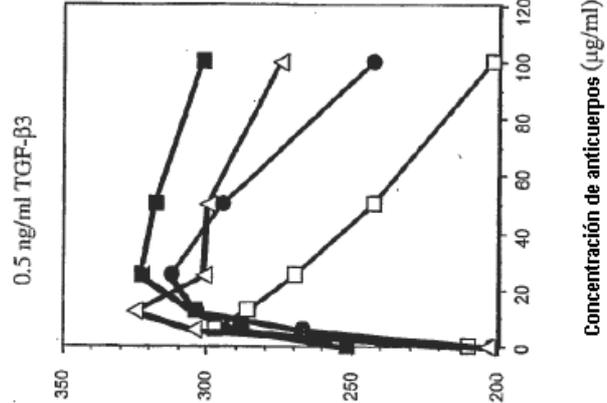
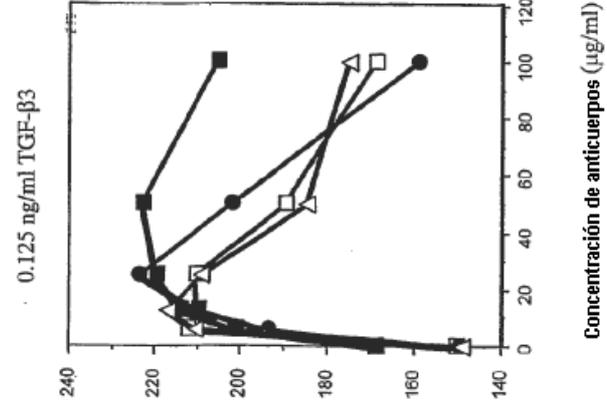


FIG. 10C



- H2NI.V5L
- H2NI.g1L2
- △— 2G7 (Ratón Mab)
- V5H.g1L2

Actividad expresada en relación con 100 (sin TGF-β, sin anticuerpos)

Neutralización de TGF-β2

FIG. 11A

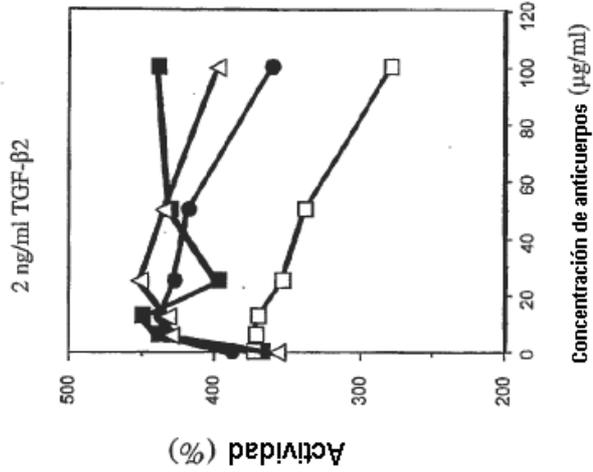


FIG. 11B

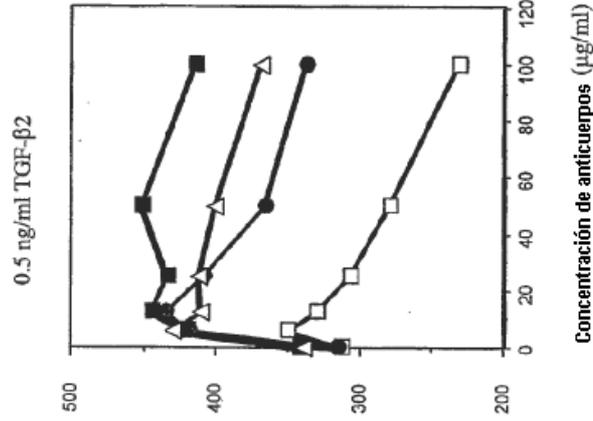
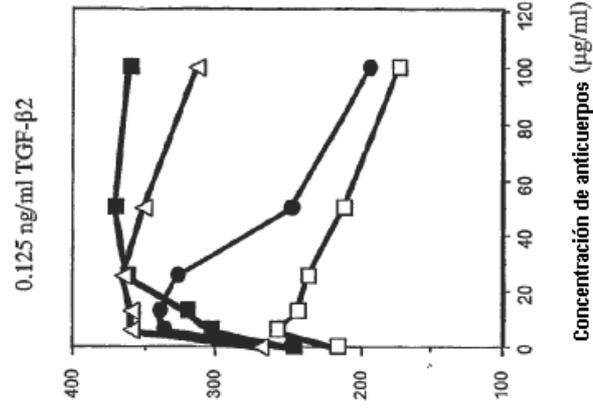


FIG. 11C



- H2NI.V5L
- H2NI.g1L2
- △— 2G7 (Ratón Mab)
- V5H.g1L2

Actividad expresada en relación con 100 (sin TGF-β, sin anticuerpos)

Neutralización de TGF-β1

FIG. 12A

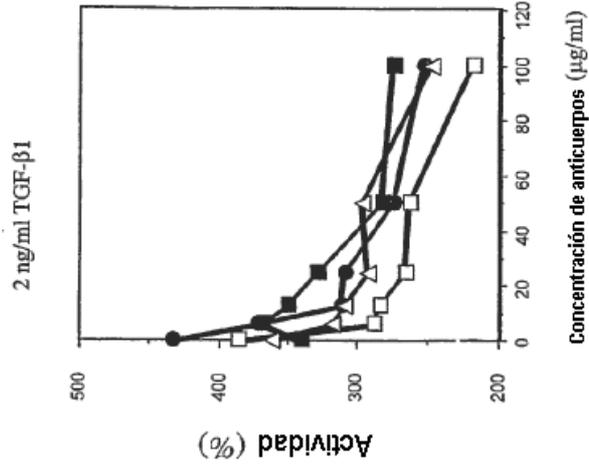


FIG. 12B

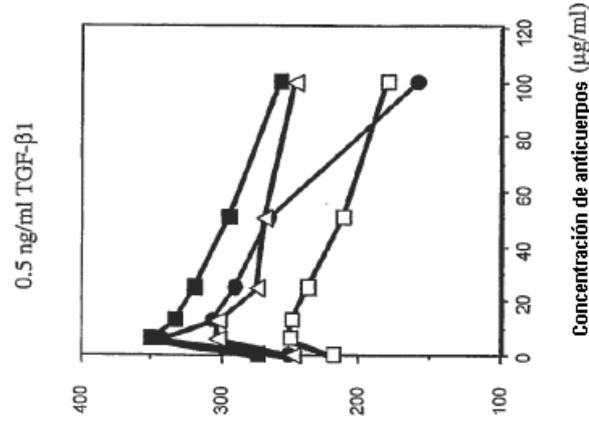
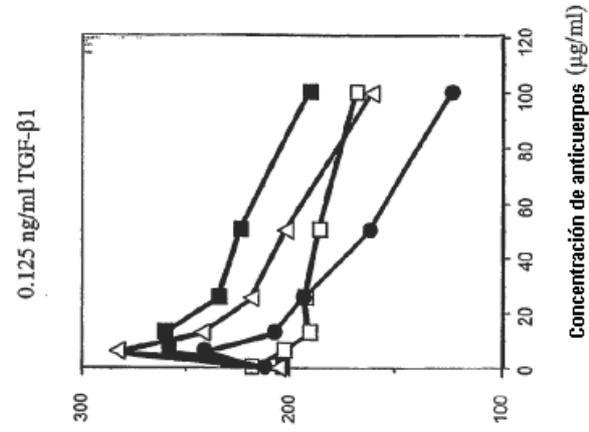


FIG. 12C



- H2NI.V5L
- H2NI.g1L2
- △ 2G7 (Ratón Mab)
- V5H.g1L2

Actividad expresada en relación con 100 (sin TGF-β, sin anticuerpos)

Neutralización de 2 ng/ml de TGF-β

FIG. 13A

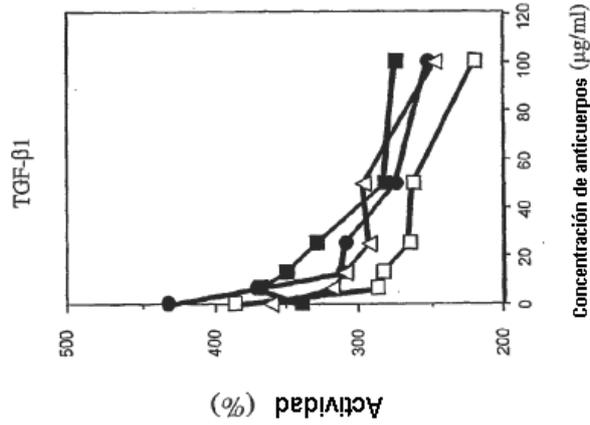


FIG. 13B

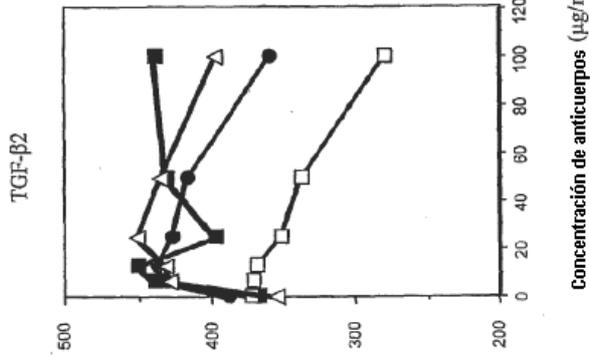
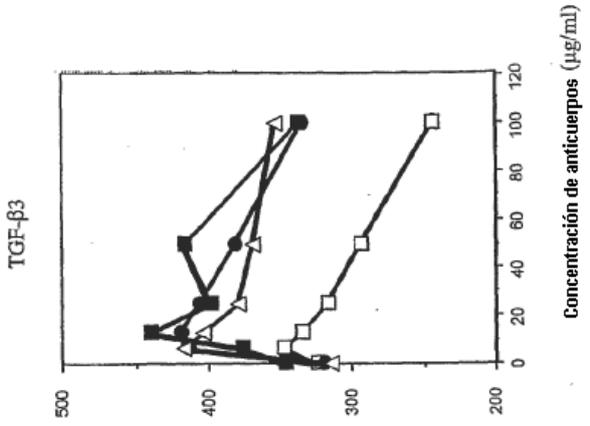


FIG. 13C



- H2NI.V5L
- H2NI.g1L2
- △ 2G7 (Ratón Mab)
- V5H.g1L2

Actividad expresada en relación con 100 (sin TGF-β, sin anticuerpos)

Neutralización de las tres isoformas de TGF-β por los diferentes anticuerpos

FIG. 14A

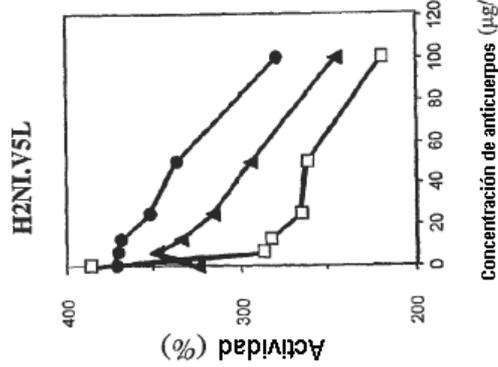


FIG. 14B

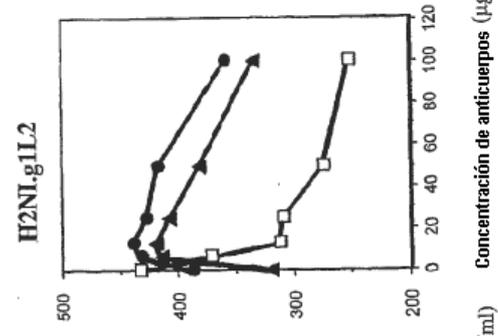


FIG. 14C

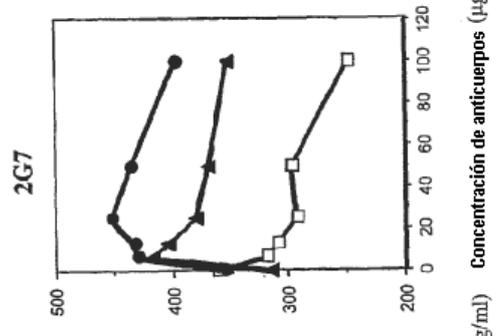
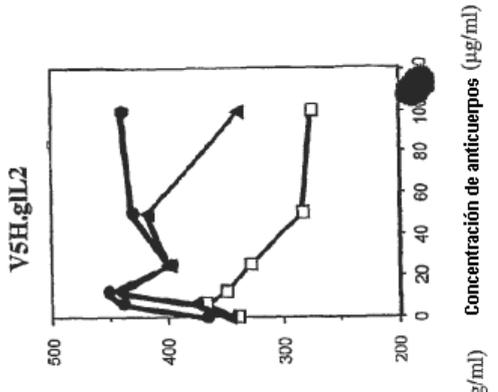


FIG. 14D



TGF-β1
   
 TGF-β2
   
 TGF-β3

Producción de TGF- $\beta$  por células 4T1 (ELISA)

FIG. 15A

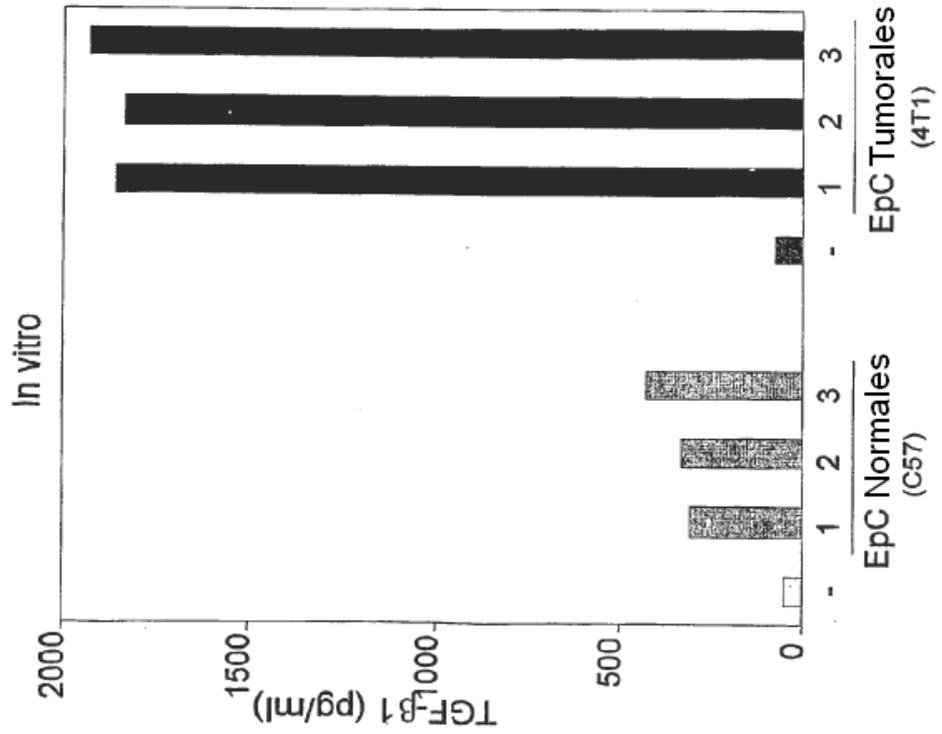
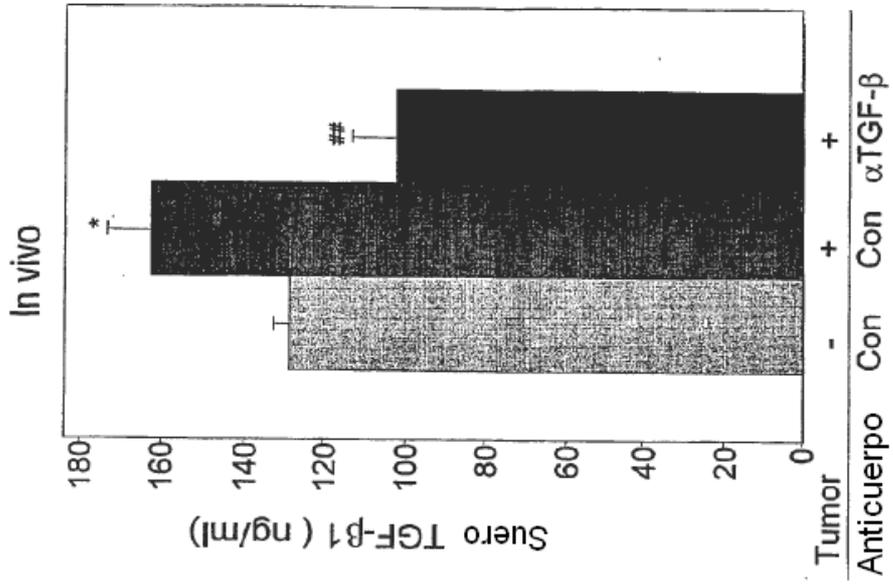
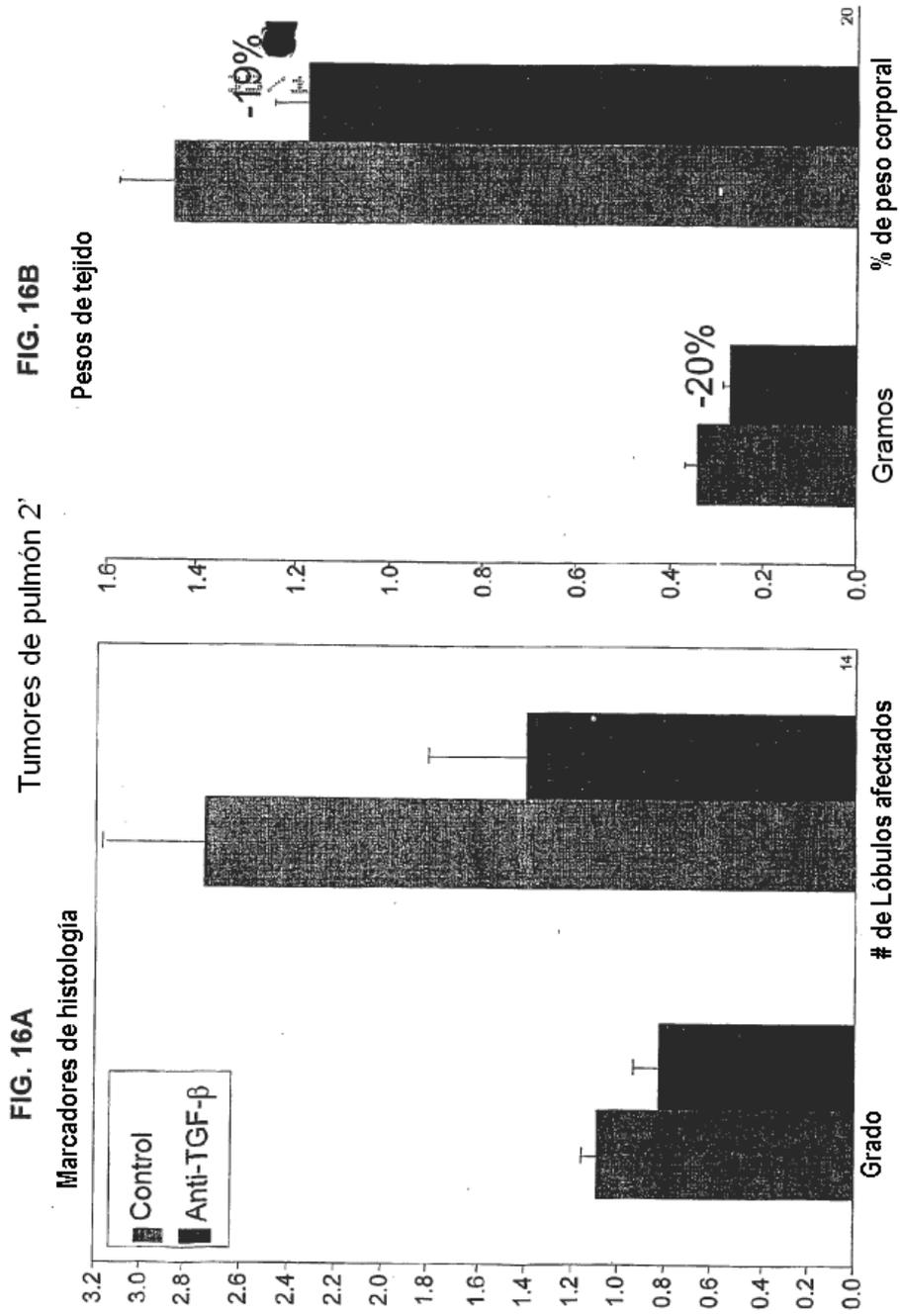
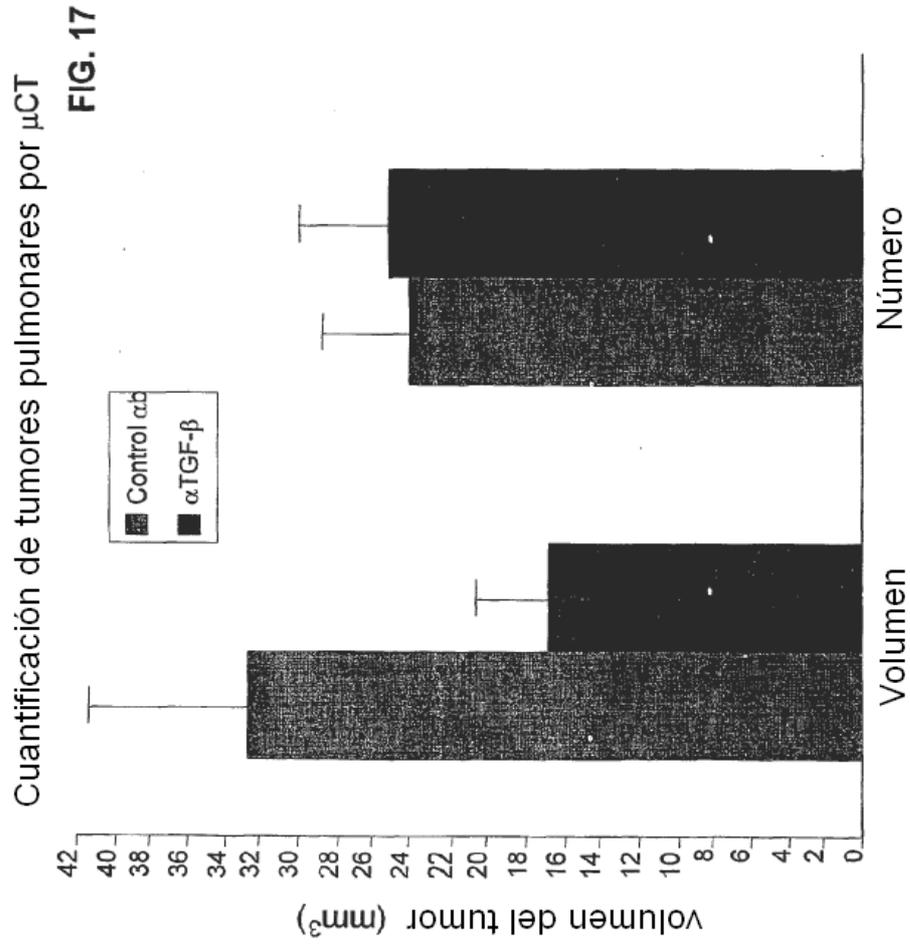
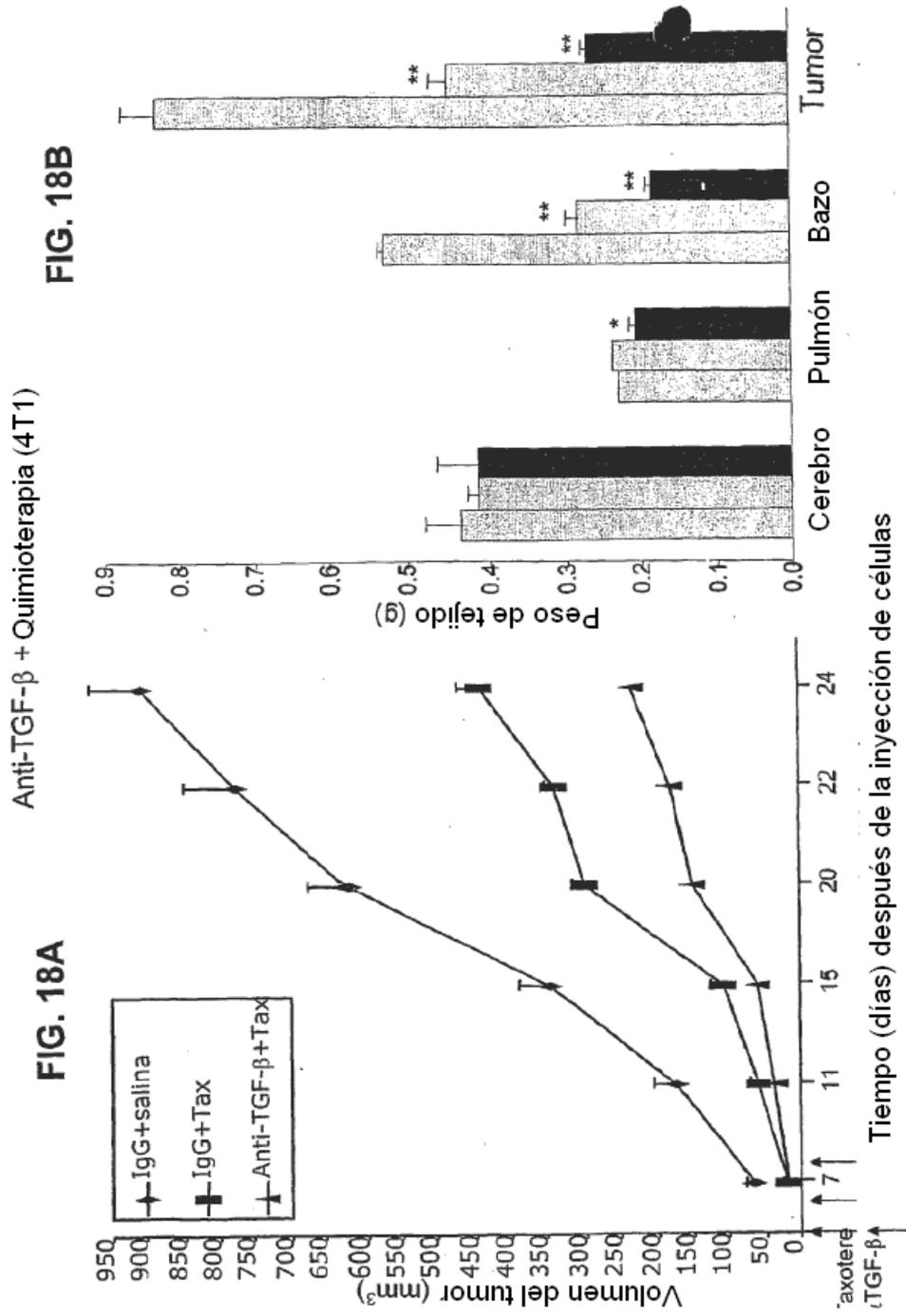


FIG. 15B











Efecto de anti-TGF- $\beta$  en Tumores PymT

FIG. 20B

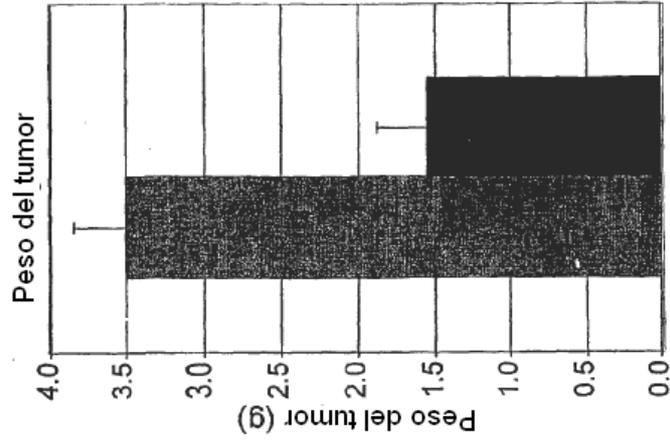
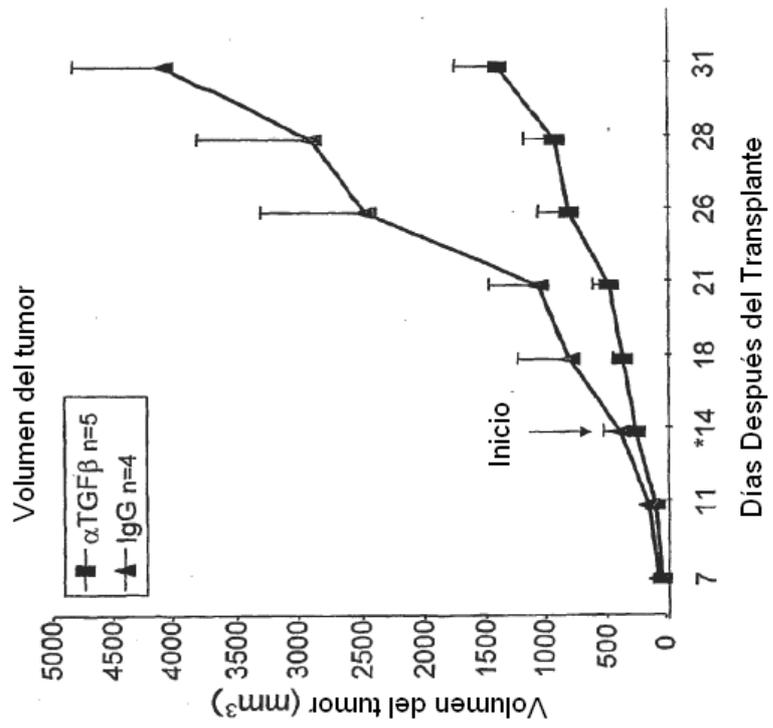


FIG. 20A



Melanoma de ratón

FIG. 21A

Incidencia de Tumores de Pulmón

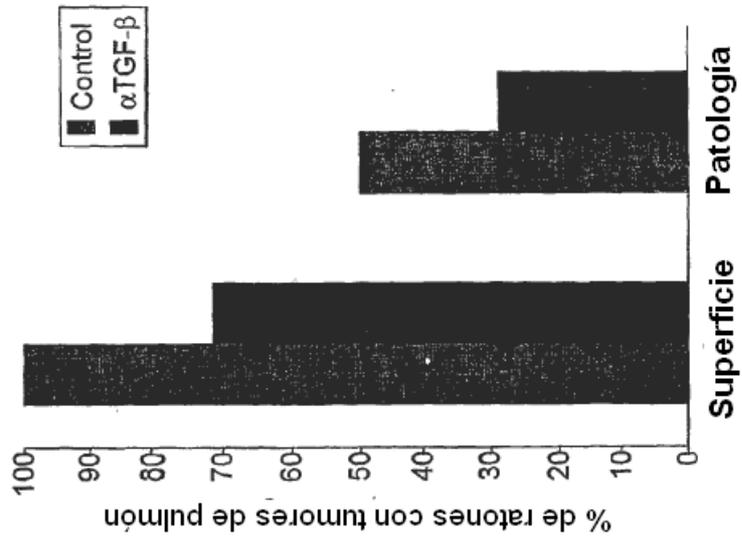
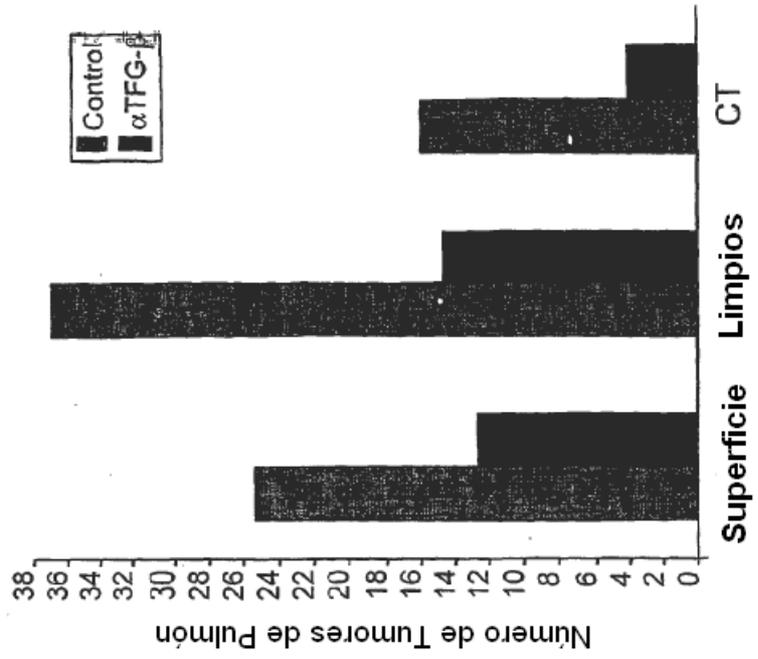


FIG. 21B

Número de Tumores de Pulmón



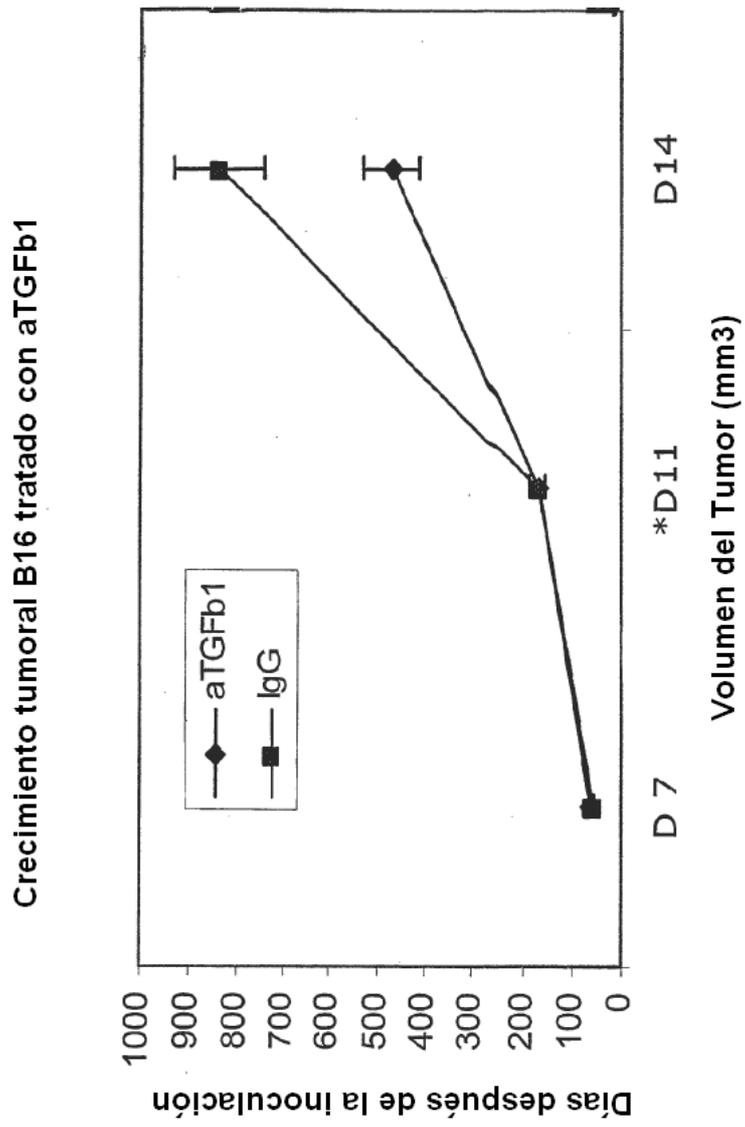
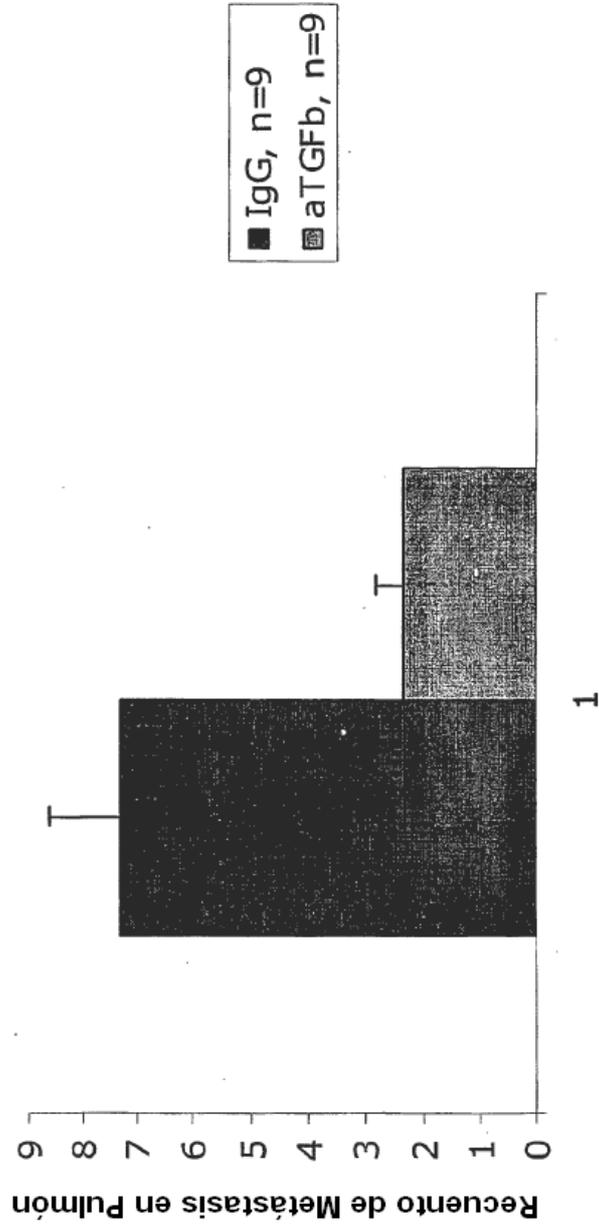


FIG. 22

**Metástasis en pulmón visible E6  
(Recuento crudo) en tratamiento  
posterior Anti-TGFb1**



**FIG. 23**

B16 Exp. 7: Crecimiento tumoral B16 tratado con aTGFb1

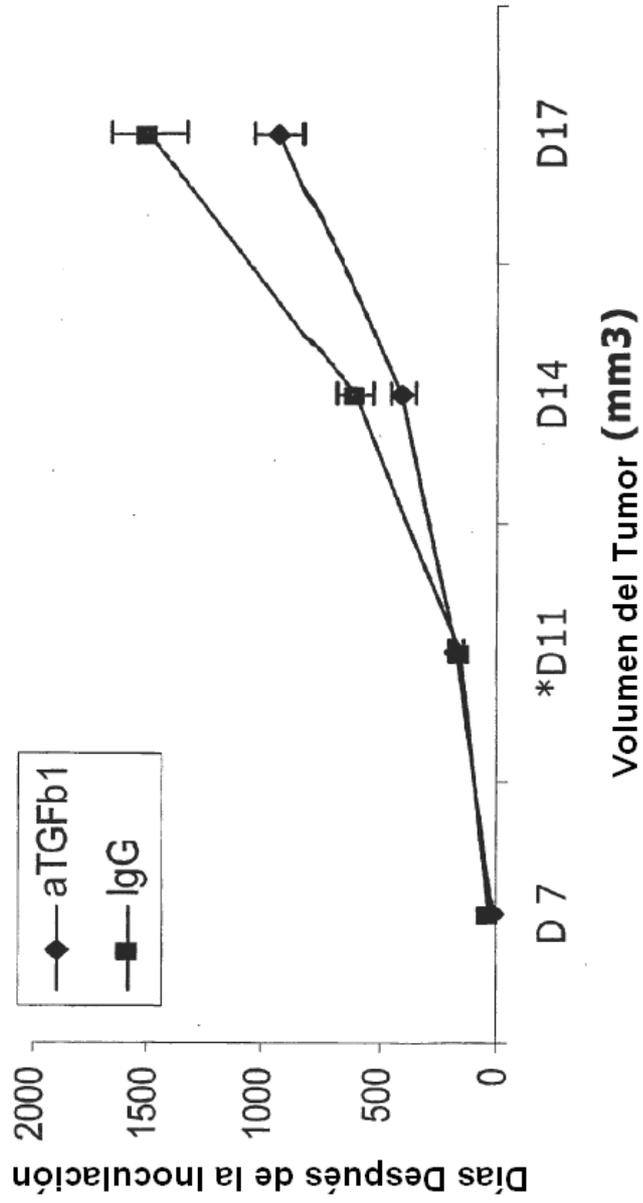


FIG. 24

B16 Exp. 7: Peso del Tumor Primario

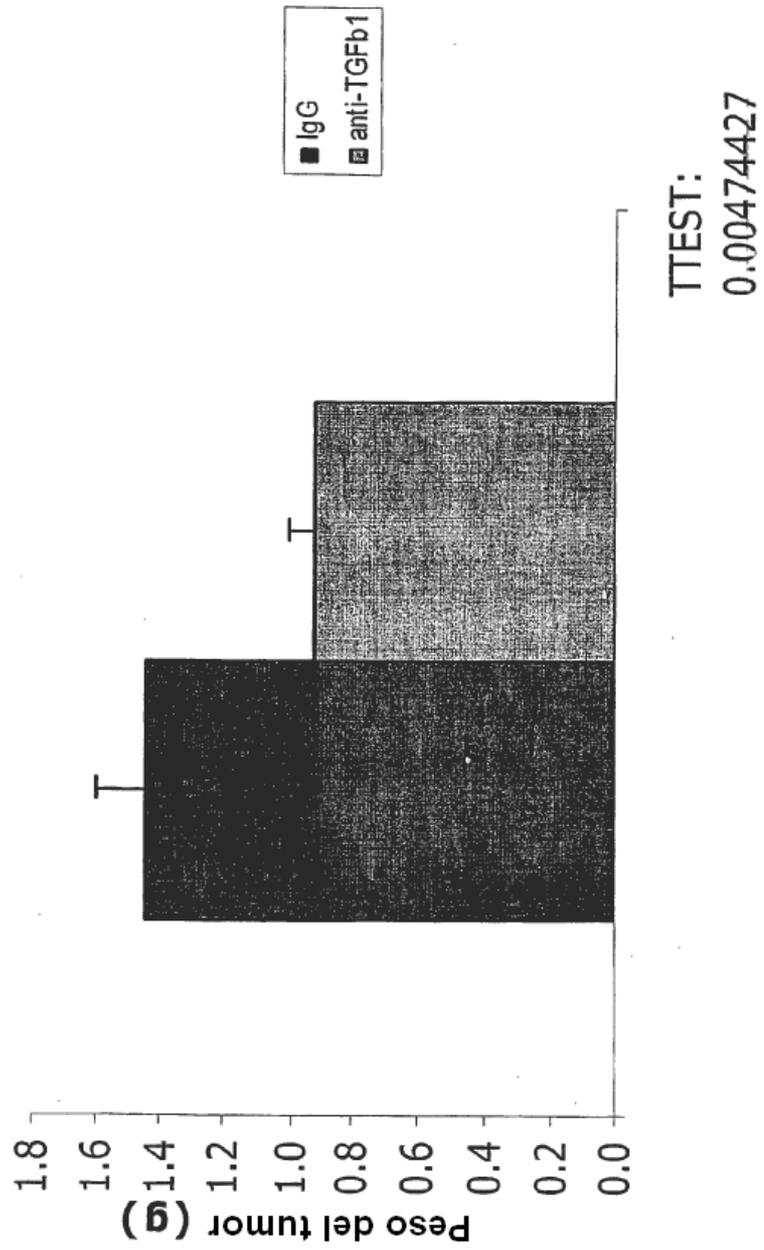
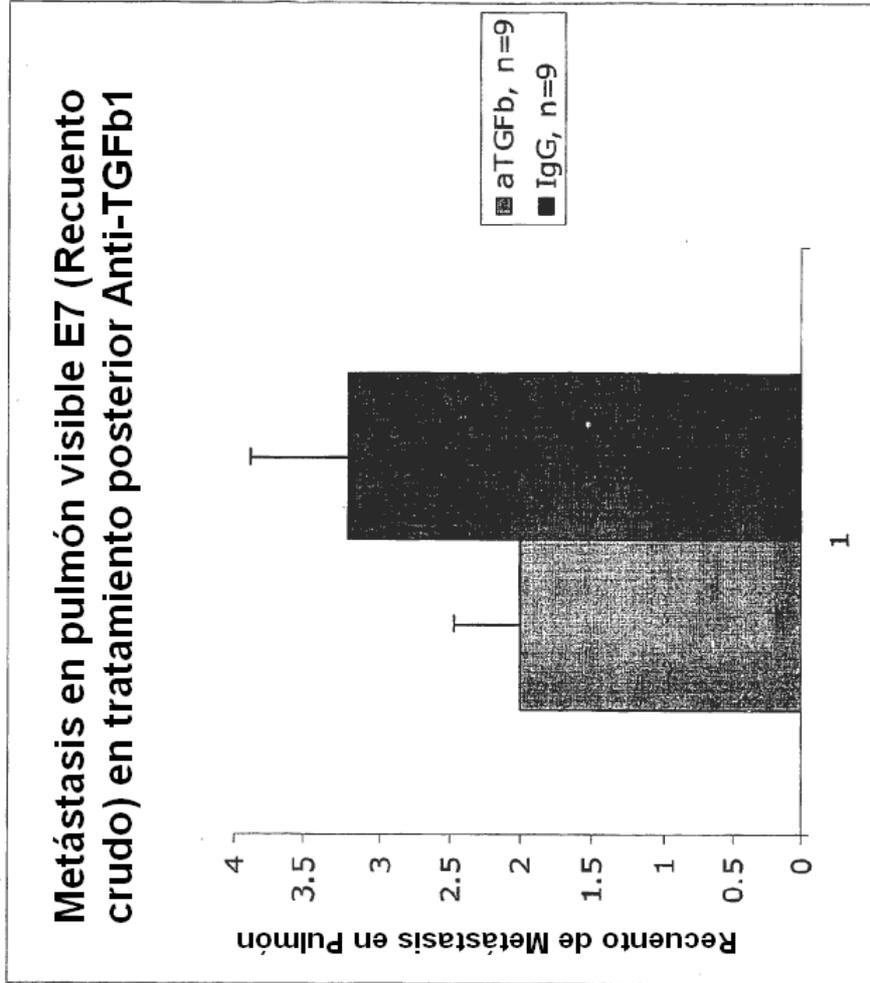


FIG. 25



**FIG. 26**

Figura 27 Experimento con Calu-6

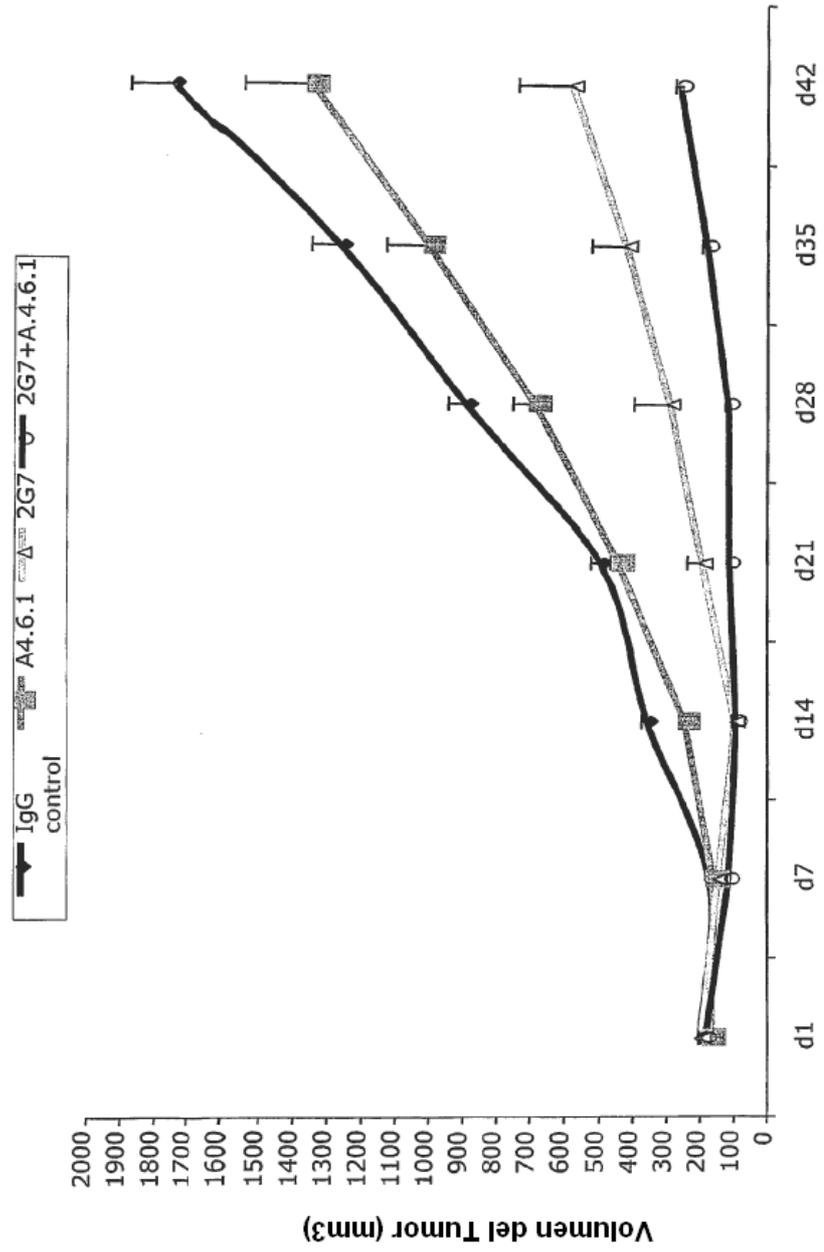


Figura 28 Pesos finales tumorales para Calu-6

