

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 503**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012** **E 12712049 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2694547**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a TGF-alfa y Epiregulina**

30 Prioridad:

06.04.2011 US 201161472338 P

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

01.07.2015

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

BEIDLER, CATHERINE BRAUTIGAM;
HEUER, JOSEF GEORGE y
PETROVAN, RAMONA JUDITA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 539 503 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 que se unen a TGF-alfa y epiregulina

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a TGF-alfa y Epiregulina y a usos de los mismos.

5 TGF-alfa y Epiregulina son dos entre siete ligandos del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico ("EGFR") que normalmente funciona en la cicatrización de heridas tras lesión. La nefropatía diabética ("DN") es una complicación diabética principal y es la causa que conduce a una enfermedad renal de etapa final ("ESRD"). La proteinuria es un marcador clínico de la disminución de la función renal que acompaña a DN y que se asocia a la evolución de la enfermedad y a un mayor riesgo cardiovascular, tal como insuficiencia cardíaca, enfermedad vascular, arritmia. El patrón de vigilancia de DN incluye los inhibidores ACE y los agentes de bloqueo del receptor de angiotensina ("ARBs") que únicamente ralentizan la evolución de la enfermedad y dejan un riesgo residual considerable.

10 El bloqueo de EGFR atenúa no solo la proteinuria, sino también la patología renal en modelos animales preclínicos de enfermedad renal. No obstante, los inhibidores de EGFR, tales como ERBITUX®, aunque están aprobados para el cáncer, se asocian a efectos secundarios, tales como exantema cutáneo grave sobre la cara y hombros asociado a la inhibición diana en la piel. De este modo, todavía son necesarias terapias alternativas para DN. Además, es necesaria una terapia de tratamiento más eficaz para DN.

15 Se han descrito los anticuerpos que se unen a TGF-alfa (por ejemplo, véase el documento US 5190858). Además, se han descrito los anticuerpos que se unen a Epiregulina (por ejemplo, véase el documento US 2009/0324491). El documento WO 2010137654 divulga el tratamiento de cáncer con anticuerpos que se unen por un lado a TGF-alfa y por otro, a Epiregulina. U. PANCHAPAKESAN y col., CLINEXPERIMENTPHARMACOLPHYSIOL, 2011, 38; 84-88, divulga el tratamiento de nefropatía diabética con inhibidores de EGFR.

20 La presente invención proporciona anticuerpos frente a TGF-alfa y Epiregulina para el tratamiento de DN. Además, la presente invención proporciona anticuerpos frente a TGF-alfa y Epiregulina que se unen a la diana *in vivo* y que posteriormente provocan una reducción de la proteinuria con una reducción concomitante de la evolución de la enfermedad y el riesgo cardiovascular.

25 La presente invención proporciona anticuerpos terapéuticamente útiles que se unen por un lado a TGF-alfa y por otro, a Epiregulina, que poseen un número de propiedades deseadas. Los anticuerpos de la presente invención tienen elevada afinidad y son selectivos con una actividad de neutralización completa frente a TGF-alfa humana y Epiregulina humana. Cuando se administran, los anticuerpos de la presente invención también tienen como resultado una disminución de la albuminuria y en patología renal para proteína tubular, fibrosis intersticial, expansión de matriz mesangial y dilatación pélvica *ex vivo*. Además, los anticuerpos preferidos de la presente invención no provocan toxicidad cutánea observada asociada a la inhibición completa de EGFR.

30 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en la que LCVR comprende secuencias de amino ácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y HCVR comprende secuencias de amino ácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en las que LCDR1 es SEQ N° ID: 4, LCDR2 es SEQ N° ID: 5, LCDR3 es SEQ N° ID:6, HCDR1 es SEQ N° ID: 1, HCDR2 es N° ID: 2 y HCDR3 es SEQ N° ID: 3.

35 La presente invención también proporciona una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 La presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética.

45 A través de la presente divulgación, un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, se une a TGF-alfa y Epiregulina y comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en la que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que LCVR comprende secuencias de amino ácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y HCVR comprende secuencias de amino ácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en las que LCDR1 es SEQ N° ID: 4, LCDR2 es SEQ N° ID: 5, LCDR3 es SEQ N° ID:6, HCDR1 es SEQ N° ID: 1, HCDR2 es N° ID: 2 y HCDR3 es SEQ N° ID: 3.

50 La presente invención proporciona un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo es selectivo frente a TGF-alfa humana y Epiregulina humana. Además, la presente invención proporciona un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo tiene una actividad de neutralización completa frente a TGF-alfa humana y Epiregulina humana. De forma más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo es selectivo y tiene una actividad de neutralización completa frente a TGF-alfa humana y Epiregulina humana.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo tiene una constante de equilibrio de disociación, K_d , entre $0,01 \times 10^{-9}$ M y $1,0 \times 10^{-9}$ M para TGF-alfa (SEQ N° ID: 18). De forma más preferida, un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, tiene una constante de equilibrio de disociación, K_d , entre $0,05 \times 10^{-9}$ M y $0,8 \times 10^{-9}$ M para TGF-alfa. Los valores de K_d se establecen por medio de equilibrio de unión a 25 °C como se describe en el Ejemplo 2.

10 La presente invención también proporciona un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo tiene una constante de equilibrio de disociación, K_d , entre $0,1 \times 10^{-9}$ M y 30×10^{-9} M para Epiregulinamet-humana (SEQ N° ID: 22). De forma más preferida, un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, tiene una constante de equilibrio de disociación, K_d , entre $0,5 \times 10^{-9}$ M y 10×10^{-9} M para Epiregulina humana. Los valores de K_d se establecen por medio de equilibrio de unión a 25 °C como se describe en el Ejemplo 2.

15 La presente invención proporciona un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, en el que el anticuerpo tiene una constante de equilibrio de disociación, K_d , entre, $0,01 \times 10^{-9}$ y $1,0 \times 10^{-9}$ para TGF-alfa humana (SEQ N° ID: 18) y un valor de K_d entre $0,1 \times 10^{-9}$ M y 30×10^{-9} M para Epiregulinamet-humana (SEQ N° ID: 22). De forma más preferida, un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, tiene una constante de equilibrio de disociación, K_d , entre $0,05 \times 10^{-9}$ M y $0,8 \times 10^{-9}$ para TGF-alfa humana y un valor de K_d entre $0,5 \times 10^{-9}$ y 10×10^{-9} para Epiregulina humana. Los valores de K_d se establecen por medio de equilibrio de unión a 25 °C como se describe en el Ejemplo 2.

20 La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TGF-alfa humana y Epiregulina, y provocan una disminución de albuminuria dependiente de la dosis, reducción de la creatinina en suero y nitrógeno de urea en sangre ("BUN") *in vivo* en un modelo residual de riñón de ratón y un modelo db/db de uninefroctomía de ratón como se describe en el Ejemplo 5 y Ejemplo 6, respectivamente.

25 La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TGF-alfa humana y Epiregulina, y provocan una reducción de la patología renal para proteína tubular y fibrosis intersticial y una disminución de la expansión de la matriz mesangial y dilatación pélvica *in vivo* en un modelo residual de riñón de ratón y un modelo db/db de uninefroctomía de ratón como se describe en el Ejemplo 5 y Ejemplo 6, respectivamente.

30 La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TGF-alfa humana y Epiregulina, y se piensa que provocan una reducción de la proteinuria con una reducción concomitante de la evolución de la enfermedad y el riesgo cardiovascular en humanos. Además, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TGF-alfa humana y Epiregulina, y se piensa que son eficaces en el tratamiento de nefropatía diabética en humanos.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a TGF-alfa humana y Epiregulina, y no provocan toxicidad cutánea observada en un estudio de toxicidad en macacos de Java como se describe en el Ejemplo 7.

35 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa humana y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en la que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en la que LCVR comprende secuencias de amino ácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y HCVR comprende secuencias de amino ácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en los que LCDR1 es SEQ N° ID: 4, LCDR2 es SEQ N° ID: 5, LCDR3 es SEQ N° ID:6, HCDR1 es SEQ N° ID: 1, HCDR2 es N° ID: 2 y HCDR3 es SEQ N° ID: 3.

40 Además, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa humana y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la secuencia de amino ácidos de LCVR es SEQ N° ID: 9 o SEQ N° ID: 10.

45 La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la secuencia de amino ácidos de HCVR es SEQ N° ID: 7.

50 La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la secuencia de amino ácidos de LCVR y una secuencia de amino ácidos de HCVR están seleccionados entre el grupo que consiste en:

(i) LCVR es SEQ N° ID: 9 y HCVR es SEQ N° ID: 7; y

(ii) LCVR es SEQ N° ID: 10 y HCVR es SEQ N° ID: 7.

55 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina. que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la

cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la secuencia de amino ácidos de LCVR es SEQ N° ID: 9 y la secuencia de amino ácidos de HCVR es SEQ N° ID:7.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la secuencia de amino ácidos de LCVR es SEQ N° ID: 10 y la secuencia de amino ácidos de HCVR es SEQ N° ID:7.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la secuencia de amino ácidos de la cadena ligera es SEQ N° ID: 13 o SEQ N° ID: 14.

10 La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la secuencia de amino ácidos de la cadena pesada es SEQ N° ID: 12.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la secuencia de amino ácidos de la cadena pesada y la secuencia de amino ácidos de la cadena ligera están seleccionadas entre el grupo que consiste en:

- 15 (i) la cadena pesada es SEQ N° ID: 12 y la cadena ligera es SEQ N° ID:13, y
(ii) la cadena pesada es SEQ N° ID: 12 y la cadena ligera es SEQ N° ID:14.

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende dos cadenas ligeras en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena ligera es SEQ N° ID: 13, y dos cadenas pesadas en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena pesada es SEQ N° ID: 12.

20 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epiregulina, que comprende dos cadenas pesadas en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena ligera es SEQ N° ID: 14, y dos cadenas pesadas en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena pesada es SEQ N° ID: 12.

Además, la presente invención proporciona un fragmento de unión-antígeno de un anticuerpo, como se describe en la presente memoria.

25 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en un método de tratamiento de nefropatía diabética en un paciente que comprende la administración a un paciente del anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria.

35 Además, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en terapia. Preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética.

Además, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de nefropatía diabética.

40 La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en un método de tratamiento de nefropatía diabética en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia.

45 Además, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en terapia, en el que el anticuerpo se administra en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia. Preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética, en el que el anticuerpo se administra en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de nefropatía diabética, en el que el anticuerpo se administra en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia.

50 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, y al menos un

vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el fragmento de unión-antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

- 5 La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en un método de tratamiento de nefropatía diabética en un paciente que comprende administrar al paciente el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria.

Además, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en terapia. Preferentemente, la presente invención
10 proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética.

Además, la presente invención proporciona el uso de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de nefropatía diabética.

- 15 La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en un método de tratamiento de nefropatía diabética en un paciente que comprende administrar al paciente un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia.

Además, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en terapia, en el que el fragmento de unión a antígeno se administra en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia. Preferentemente, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética, en el que el fragmento de unión a antígeno se administra en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia.

- 25 Además, la presente invención proporciona el uso de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención, como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de nefropatía diabética, en el que el fragmento de unión a antígeno se administra en combinación simultánea o secuencial con un patrón de asistencia.

El patrón de asistencia para DN incluye, pero sin limitarse a, inhibidores de ACE y agentes de bloqueo de receptor de angiotensina (ARBs).
30

La estructura general de un "anticuerpo" se conoce muy bien en la técnica. Para un anticuerpo de tipo IgG, existen cuatro cadenas de amino ácido (dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras") que están reticuladas por medio de enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios. Cuando se exponen en determinados sistemas biológicos, los anticuerpos que tienen secuencias de Fc humano no modificado se someten a glicosilación en la región Fc. Los anticuerpos se pueden someter también a glicosilación en otras posiciones. Las estructuras de subunidad y las configuraciones de tres dimensiones de los anticuerpos se conocen bien en la técnica. Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada N-terminal ("HCVR") y una región constante de cadena pesada ("HCCR"). La región constante de cadena pesada está formada por tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para IgG, IgD e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE. Cada dominio está formado por una región variable de cadena ligera ("LCVR") y una región constante de cadena ligera ("LCCR").
35
40

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas de forma complementaria regiones de determinación ("CDRs"), interdispersadas con regiones que se conservan más, denominadas regiones marco ("FR"). Cada HCVR y LCVR están formadas por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el término-carbono hasta el término-carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En la presente memoria, los 3 CDRs de la cadena pesada se denominan "CDRH1, CDRH2 y CDRH3", y los 3 CDRs de la cadena ligera se denominan "CDRL1, CDRL2 y CDRL3". Los CDRs contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La asignación de amino ácidos de cada dominio es de acuerdo con convenciones bien conocidas [por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)].
45
50

Un anticuerpo de la presente invención puede tener una región constante de cadena pesada seleccionada entre cualquiera de las clases de inmunoglobulina (IgA, IgD, IgG, IgM e IgE). Además, un anticuerpo de la presente invención contiene una parte Fc que procede de la región IgG4 Fc humano debido a su reducida capacidad para unirse a factores complementarios en comparación con otros sub-tipos de IgG.

- 55 Una anticuerpo puede proceder de un clon o copia individual, incluyendo por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fago. Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención existe en una población homogénea o

sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpos. Un anticuerpo de longitud completa comprende regiones constantes de longitud completa o sustancialmente completa, incluyendo la región Fc. Un "fragmento de unión-antígeno" de dicho anticuerpo es cualquiera acortado de un anticuerpo de longitud completa que comprenda la parte de unión a antígeno y conserve la capacidad de unión a antígeno. Dichas formas acortadas incluyen, por ejemplo, un fragmento Fa, fragmento Fab' o fragmento F(ab')₂ que incluye los CDR o las regiones variables de los anticuerpos divulgados. Además, dichas formas de anticuerpo acortadas pueden ser un fragmento Fv de cadena individual que se pueden producir por medio de unión de ADN que codifica LCVR y HCVR con una secuencia de agente de enlazador. (Véase, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp 269-315, 1994). El término "anticuerpo" no incluye dichos fragmentos a menos que se indique lo contrario. Un anticuerpo de la presente invención se puede producir usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación de fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica.

Un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo sometido a estudio técnico que se ha diseñado para tener regiones marco, regiones de articulación y regiones constantes de origen humano que son idénticas o sustancialmente idénticas (sustancialmente humanas) con regiones marco y regiones constantes procedentes de secuencias genómicas humanas. Las regiones marco completamente humanas, regiones de articulación y las regiones constantes son las secuencias germinales humanas así como secuencias con mutaciones somáticas de origen natural y aquellas con mutaciones sometidas a estudio técnico. Un anticuerpo de la presente invención puede comprender regiones marco, de articulación o constantes, procedentes de una región marco completamente humana, región de articulación o región constante que contiene una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de amino ácidos en la misma. Además, un anticuerpo de la presente invención es sustancialmente no inmunógeno en seres humanos.

Se puede usar una variedad de diferentes secuencias marco humanas de forma sencilla o en combinación como base para un anticuerpo de la presente invención. Preferentemente, las regiones marco de un anticuerpo de la presente invención son de origen humano o sustancialmente humano (al menos 95 %, 97 % o 99 % de origen humano). Las secuencias de las regiones marco de origen humano se pueden obtener a partir de *The Immunoglobulin Factsbook*, por Marie-Paule Lafranc, Gerard Lefranc, Academic Press 2001, ISBN 012441351.

La secuencia marco de un anticuerpo de la presente invención sirve como región marco variable "donadora" y se puede usar para crear anticuerpos adicionales con los mismos CDR especificados en la misma usando una metodología conocida en la técnica. Además, la secuencia marco para un anticuerpo de la presente invención se puede comparar con otras secuencias marco humanas conocidas para generar anticuerpos adicionales. De este modo, esta información se puede usar para "retro mutar" otra región marco humana homóloga seleccionada hasta el residuo de amino ácido donador en estas posiciones. Además, se puede detectar cualquier amino ácido "raro" en las cadenas principales humanas adicionales de forma que se pueda usar el consenso o el residuo de amino ácido donador en la posición relevante.

"TGF-alfa" o "TGF-alfa humano" se refiere a proteína TGF-alfa (SEQ N° ID: 18).

"Epiregulina" o "Epiregulina humana" se refiere a una proteína de Epiregulina (SEQ N° ID: 33). Se usa Met-Epiregulina humana (SEQ N° ID: 22) en los experimentos *in vivo* en la presente memoria. Las referencias a la capacidad de los anticuerpos de la presente invención, como se describe en la presente memoria, para unir o neutralizar Epiregulina humana pertenecen también a su capacidad para unir y neutralizar met-Epiregulina en experimentos *in vitro*.

Un "paciente" es un mamífero, preferentemente un ser humano.

El término "tratar" (o "tratamiento") significa mostrar, detener, reducir o revertir la evolución o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de dosis de un anticuerpo de la presente invención que, tras administración de dosis individual o múltiple a un paciente, proporciona el tratamiento deseado.

Se pueden llevar a cabo los siguientes ejemplos esencialmente como se describe a continuación.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Producción de Anticuerpos

Se pueden preparar y purificar los anticuerpos I y II como se muestra a continuación. Se somete a transfección, de forma transitoria o estable, una célula de hospedador apropiada, tal como HEK 293 o CHO, con un sistema de expresión para segregar anticuerpos usando una proporción de vector HC:LC predeterminada óptima o un sistema de vector individual que codifica tanto para HC, tal como SEQ N° ID: 15, como para LC, tal como SEQ N° ID: 16 o SEQ N° ID: 17. Se purifica el medio aclarado, en el cual se ha segregado el anticuerpo, usando cualquiera de las

técnicas comúnmente empleadas. Por ejemplo, se puede aplicar de manera apropiada el medio a una columna de Proteína A o G que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como una disolución salina de tampón de fosfato (pH 7,4). Se lava la columna para retirar los componentes de unión no específicos. Se eluye el anticuerpo ligado, por ejemplo, por medio de gradiente de pH (tal como un tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8 hasta un tampón de citrato de sodio 0,1 M pH 2,5). Se detectan las fracciones de anticuerpos, tal como por medio de SDD-PAGE y posteriormente se agrupan. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso deseado. Se puede concentrar el anticuerpo y/o se puede filtrar de forma estéril usando técnicas comunes. Se pueden retirar de forma eficaz el agregado soluble y los multímeros por medio de técnicas comunes, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, interacción hidrófoba, intercambio iónico o hidroxiapatita. La pureza de este anticuerpo tras estas etapas de cromatografía es mayor de 99 %. Se puede congelar el producto de forma inmediata a -70 °C o se puede liofilizar. A continuación, se proporcionan las secuencias de amino ácidos para estos anticuerpos.

SEQ Nos ID

| Anticuerpo | Cadena pesada | Cadena ligera | HCVR | LCVR |
|------------|---------------|---------------|------|------|
| I | 12 | 13 | 7 | 9 |
| II | 12 | 14 | 7 | 10 |
| III | 31 | 32 | 8 | 11 |

15

| Anticuerpo | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| II | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| III | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

Ejemplo 2: Medición de Unión por Afinidad por medio de Resonancia de Plasmón Superficial (BIAcore) para el Anticuerpo I

Se usa un instrumento Biacore T2000 (BIAcore® AB, Upsala, Suecia), reactivos y un soporte lógico de Evaluación T2000 Ver 4.1 para el análisis de Resonancia de Plasmón Superficial. Se prepara una microplaca CM5 usando el método de acoplamiento de amina EDC/NHS del fabricante. Se activan las superficies de las cuatro células de flujo por medio de la inyección de una mezcla 1:1 de EDC/NHS durante 7 minutos a 10 µl/min. Se diluye un anticuerpo específico Fc y antihumano de cabra hasta 50 µg/ml en acetato 10 M, tampón de pH 4,0 y se inmoviliza durante aproximadamente 10000 RU sobre las cuatro células de flujo por medio de inyección durante 7 minutos a un caudal de 10 µl/min. Se bloquean los sitios que no hayan reaccionado con una inyección de 7 minutos de etanolamina a 10 µl/min. Se usan inyecciones de 3 x 20 segundos de glicina a pH 1,5 a 30 µl/min para retirar la proteína asociada de forma no covalente. El tampón de operación es HBS-EP [HEPES 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, Polisorbato 20 0,005 %].

En el estudio 1, se diluye el Anticuerpo I hasta 50 µg/ml en el tampón de operación, y se capturan aproximadamente 400-600 RU en la célula de flujo 2. Se diluyen TGF-alfa humana (SEQ N° ID: 18), TGF-alfa de rata (SEQ N° ID: 20), met-Epiregulina humana (SEQ N° ID: 22) y Epiregulina de macaco de Java (SEQ N° ID: 24) desde 100 µg/ml hasta 200 nM en tampón de operación y posteriormente se diluye dos veces de forma seriada en tampón de operación hasta 6,25 nM. Se diluye la Epiregulina de ratón (SEQ N° ID: 23) desde 100 µg/ml hasta 4 µM en tampón de operación y posteriormente se diluye dos veces de forma seriada en tampón de operación hasta 125 nM. Se llevan a cabo inyecciones por duplicado de cada concentración de ligando a 30 µl/min durante 300 segundos seguido de una fase de disociación. La fase de disociación es de 1800 segundos para TGF-alfa humana y de rata, 1200 segundos para Epiregulina de macaco de Java y humana y 120 segundos para Epiregulina de ratón. Se lleva a cabo la regeneración por medio de inyección de glicina 10 mM pH 1,5 durante 3 x 20 segundos a 30 µl/min sobre todas las células de flujo.

En el estudio 2, se diluye el Anticuerpo III hasta 100 µg/ml en tampón de operación, y se captura aproximadamente 400-600 RU en la célula de flujo 2. Se diluye TGF-alfa de ratón (SEQ N° ID: 19) desde 100 µg/ml hasta 200 nM en tampón de operación y posteriormente se diluye dos veces de forma seriada en tampón de operación hasta 6,25 nM. Se diluye Epiregulina de ratón (SEQ N° ID: 23) desde 100 µg/ml hasta 4 µM en tampón de operación y

posteriormente se diluye dos veces de forma seriada en tampón de operación hasta 125 nM. Se llevan a cabo inyecciones por duplicado de cada concentración de ligando a 30 µl/min durante 300 segundos seguido de una fase de disociación. La fase de disociación es de 1800 segundos para TGF-alfa de ratón, y 120 segundos para Epiregulina de ratón. Se lleva a cabo la regeneración por medio de inyección de glicina 10 mM pH 1,5 durante 30 segundos a 30 µl/min sobre toda célula de flujo.

Se recogen los datos con referencia sustraída como Fc2-Fc1. Las mediciones se obtienen a 25 °C. Se evalúan las velocidades de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) de cada ligando usando un modelo de unión "Unión 1:1 (Langmuir)". Se calcula la afinidad (K_D) a partir de los parámetros cinéticos de acuerdo con la relación: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Tabla 1

| Parámetro de Unión para el Anticuerpo I | | | | |
|---|----------------|---|---|----------------------------------|
| Ligando | Especie | Velocidad de asociación (k_{on}) ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm DE) | Velocidad de disociación (k_{off}) ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm DE) | Afinidad (K_D^a) (\pm DE) |
| TGF-alfa | Humano | $4,18 \pm 0,28 \times 10^5$ | $4,09 \pm 0,96 \times 10^{-5}$ | $97,6 \pm 20,6$ pM |
| | Rata | $3,78 \pm 0,39 \times 10^5$ | $2,66 \pm 0,74 \times 10^{-5}$ | $70,5 \pm 19,4$ pM |
| Epiregulina | Humano | $4,91 \pm 0,42 \times 10^5$ | $6,31 \pm 0,55 \times 10^{-4}$ | $1,29 \pm 0,03$ nM |
| | Macaco de Java | $6,73 \pm 0,71 \times 10^5$ | $7,05 \pm 0,23 \times 10^{-4}$ | $1,05 \pm 0,09$ nM |
| | Ratón | $4,10 \pm 1,15 \times 10^4$ | $1,33 \pm 0,16 \times 10^{-2}$ | 342 ± 136 nM |

^a Calculado como $K_D = k_{off}/k_{on}$

10

Tabla 2

| Parámetro de Unión para el Anticuerpo III | | | |
|---|---|---|----------------------------------|
| Ligando | Velocidad de asociación (k_{on}) ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm DE) | Velocidad de disociación (k_{off}) ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm DE) | Afinidad (K_D^a) (\pm DE) |
| TGF-alfa de ratón | $5,41 \pm 0,50 \times 10^5$ | $2,02 \pm 0,54 \times 10^{-5}$ | $38,0 \pm 13,6$ pM |
| Epiregulina de ratón | $6,55 \pm 0,38 \times 10^4$ | $1,41 \pm 0,09 \times 10^{-2}$ | 215 ± 15 nM |

^a Calculado como $K_D = k_{off}/k_{on}$

El Anticuerpo I se une a TGF-alfa humana y Epiregulina humana con afinidades de aproximadamente 98 pM y 1,3 nM, respectivamente. El Anticuerpo I también se une a TGF-alfa de rata y Epiregulina de ratón con afinidades de aproximadamente 70 pM y 340 nM, respectivamente. Adicionalmente, el Anticuerpo I se une a Epiregulina de macaco de Java con una afinidad de aproximadamente 1 nM. El Anticuerpo III se une a TGF-alfa de ratón y Epiregulina de ratón con afinidades de aproximadamente 38 pM y 220 nM, respectivamente. De este modo, el Anticuerpo I y el Anticuerpo III de la presente invención tiene afinidad elevada frente a TGF-alfa humana y Epiregulina humana.

15

20 Ejemplo 3: Internalización de los Ligandos Diana EGF en la Estirpe Celular HT-29 de Carcinoma de Colon Humano

Conjugación de Alexa Fluor® 488 con anticuerpos

Se conjugua Alexa Fluor®488 con el Anticuerpo I e IgG de Control de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se diluye la proteína hasta 2 mg/ml en PBS. Se añaden 50 µl de bicarbonato de sodio 1 M a 0,5 ml de esta disolución de 2 mg/ml. Posteriormente, se transfiere la disolución de proteínas a un vial de colorante y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Se purifica la proteína marcada usando una resina Bio-Rad BioGel P-30 con un estuche de marcaje.

25

Ensayo de internalización in vitro

En el estudio 1, se sembraron 10.000 células HT-29, una estirpe celular de adenocarcinoma de colon para expresar TGF-alfa y Epiregulina, por pocillo de una placa de 96 pocillos, y se permitió la incubación durante la noche en medio completo [Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (Ham) Medio (1:1) ("DMEM/F12") que contenía L-glutamina, 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente ("FBS"), 1x antibiótico y 2,438 g/l de bicarbonato de sodio]. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS que contenía 0,1 % de BSA y posteriormente se incubaron con Anticuerpo I conjugado Alexa Fluor® 488 o IgG de Control en PBS con 0,1 % de BSA a concentraciones que variaron de 0 a 88 ug/ml durante 2 horas a 37° C en un incubador de cultivos tisulares. Tras el período de incubación, se lavaron las células con PBS con 0,1 % de BSA varias veces y posteriormente se fijaron con formaldehído de 4 % para el análisis. La cuantificación de la internalización se lleva a cabo como se muestra a continuación: se recogen 500 células/pocillo con un Cellomics Arrayscan VTI (Thermo Scientific). Se lleva a cabo el análisis de imágenes con Bioaplicaciones "análisis del compartimiento al" del sistema. Se identifican los núcleos celulares con tinción de Hoechts (azul). Se exponen dos regiones de interés (ROI) para recoger dos señales fluorescentes a partir de los puntos intracelulares (rojos) y la fluorescencia total verde (tanto azul como roja) obtenida a partir de la imagen enmascarada. Se calculan el número, área y intensidad fluorescente para cada punto y célula. Se escoge la intensidad total media de los puntos intracelulares (rojo) para medir la internalización inducida por el Anticuerpo I.

En el estudio 2, se preparan 20.000 células HT-29 como se ha descrito anteriormente, y se añade Anticuerpo I o Control IgG conjugado con Alexa Fluor®488, en PBS que contenía 0,1 % de BSA, a las células a 40 ug/ml. Se incuban las células a 37 °C en un incubador de cultivos tisulares durante diferentes tiempos que variaron de 0 a 120 minutos, posteriormente se lavaron con PBS que contenía 0,1 % de BSA varias veces y se fijó con formaldehído de 4 % para el análisis. Se lleva a cabo la cuantificación de la señal esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Tabla 3a

| Estudio 1 - Intensidad Media Total de Mancha Anular de Fluorescencia | | | | | |
|---|--------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Dosis (ug/ml) | 88 | 44 | 22 | 11 | 5,5 |
| IgG Control | 2440 ± 199 | 1808 ± 207 | 1763 ± 68 | 1391 ± 76 | 1357 ± 63 |
| Anticuerpo I | 24809 ± 4343 | 17451 ± 217 | 15135 ± 131 | 11516 ± 54 | 8474 ± 269 |
| Media ±SEM | | | | | |

Tabla 3b

| Estudio 1 - Intensidad Media Total de Mancha Anular de Fluorescencia | | | | | |
|---|----------|----------|---------|---------|----------|
| Dosis (ug/ml) | 2,75 | 1,38 | 0,69 | 0,34 | 0 |
| IgG Control | 1570±70 | 1473±7 | 1483±90 | 1407±41 | 1630±155 |
| Anticuerpo I | 6503±262 | 4349±186 | 3440±96 | 2432±62 | 1460±84 |
| Media ±SEM | | | | | |

Los resultados del análisis de imágenes del estudio 1 determinaron que la señal de fluorescencia se internalizó en la célula y fue dependiente de la dosis con el Anticuerpo I, pero no con IgG de Control (Tabla 3a y Tabla 3b).

Tabla 4

| Estudio 2 - Intensidad Media Total de Mancha Anular de Fluorescencia | | | | | | |
|---|------------|-------------|-----------|----------|----------|---------|
| Pos adición en tiempo (min) | 120 | 60 | 30 | 15 | 5 | 0 |
| IgG Control | 177 ± 29 | 167 ± 23 | 124 ± 10 | 126 ± 18 | 116 ± 4 | 94 ± 11 |
| Anticuerpo I | 4449 ± 866 | 4131 ± 1688 | 1494 ± 66 | 717 ± 72 | 261 ± 17 | 89 ± 1 |
| Media ±SEM | | | | | | |

Los resultados del ensayo 2 demostraron que el Anticuerpo I se internalizó de forma rápida y la internalización fue completa en 2 horas posteriores a la adición a las células (Tabla 4). El Anticuerpo I indujo una internalización de la diana sobre células HT-29 in vitro en de forma dependiente del tiempo (Tabla 4).

Ejemplo 4: Medición de la Neutralización de Proliferación Celular Estimulada por Ligando EGFR en Estirpe Celular de Miofibroblastos

Se usa una estirpe celular de miofibroblasto de ratón clonal ("MFC7") para evaluar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para bloquear la actividad de proliferación de los ligandos EGFR. Los siete ligandos que pueden activar EGFR son TGF-alfa (TGFA), Epiregulina (EREG), EGF, EGF de unión de Heparina (HB-EGF), Epigen (EPGN), Anfiregulina (AREG) y Betacelulina (BTC). Los ligandos EGFR comparten motivo estructural, el dominio similar a EGF, caracterizado por que se forman enlaces disulfuro intramoleculares por medio de seis residuos de cisteína conservados separados de forma similar. Se determina la actividad de proliferación por medio de la incorporación de Bromodesoxiuridina ("BrDU") y se mide con un estuche BrDU ELISA colorimétrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se colocan las 2000 células MFC7/pocillo en placas en una microplaca de 96 pocillos tratada con cultivo tisular en 0,1 ml de Medio Dulbecco's Modified Eagle's /Medio F12 (Ham) (1:1) ("DMEM/F12") que contenía L-glutamina, FBS inactivado térmicamente de 10 %, 1 x antibiótico y 2,438 g/l de bicarbonato de sodio. Se permite que las células se unan durante 6 horas, y posteriormente se retira el medio y se sustituye por 0,1 ml de DMEM/F12 libre de suero que contenía BSA de 0,1 % para evaluar la carencia de suero durante la noche. Al día siguiente, se llevan a cabo diluciones seriadas de los ligandos EGFR con medio libre de suero que contenía BSA de 0,1 % en placas de polipropileno de 96 pocillos en un volumen de 0,12 ml/pocillo a partir de concentraciones que varían de 0,001 a 3000 ng/ml. Tras las diluciones, se retira el medio de las células desprovistas de suero y posteriormente se estimula con ligando EGFR durante 24 horas. Tras la estimulación, se pulsan las células con BrDU durante 4 horas y a continuación se analizan con un estuche BrDU ELISA colorimétrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En el ensayo de especificidad del Anticuerpo I frente a los ligandos EGFR, se llevan a cabo diluciones seriadas 2X o 3X del anticuerpo en placas de polipropileno de 96 pocillos en un volumen de 0,06 ml/pocillo desde concentraciones que variaron desde 3000 nM hasta 0,059 nM. Tras las diluciones seriadas del anticuerpo, se añaden 0,06 ml de ligando EGFR por pocillo. A continuación, se incuba la placa a 37 °C en un incubador de cultivo tisular humidificado durante 30 minutos. Tras la incubación, se transfieren 0,1 ml de la disolución por pocillo a las células. Las células se estimulan durante 24 horas. Tras la estimulación, se pulsan las células con BrDU durante 4 horas y posteriormente se analizan con un estuche BrDU ELISA colorimétrico. Se generan los valores de absorbancia (450 nM - 690 nM) sobre un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) y se analizan los datos.

Tabla 5

| Ensayo MFC7 | | | |
|--|---------------------|------------------------|--------------------------|
| Ligando EGFR | Intervalo EC50 (pM) | EC50 (nM) Anticuerpo I | EC50 (nM) Anticuerpo III |
| TGF-alfa humana ^a | 11-12 | 0,46 ± 0,03 | 0,52 ± 0,04 |
| Epiregulina humana | 78-282 | 3,15 ± 1,04 | 1,12 ± 0,36 |
| Epigen humano | 3797-18987 | 807 ± 577 | nd ^b |
| EGF humano | 0,3-2,4 | > 2000 | nd ^b |
| HBEGF humano | 30-39 | > 2000 | nd ^b |
| Betacelulina humana | 1,8-3,2 | > 2000 | nd ^b |
| Anfiregulina humana | 273-2727 | > 2000 | nd ^b |
| TGF-alfa de rata | 13-13,8 | 0,19 ± 0,06 | 0,13 ± 0,01 |
| Epiregulina de ratón | 163-320 | 334 ± 41 | 214 ± 49 |
| ^a Los ligandos EGFR humanos estaban a una concentración de 0,5 nM cuando se sometieron a ensayo con Anticuerpo I, excepto para Anfiregulina (60 nM) y Epigen (100 nM) | | | |
| Se usaron TGF-alfa de rata y Epiregulina de ratón a 0,5 nM | | | |
| nd ^b , no determinado | | | |

Se encontró que Epiregulina de ratón y TGF-alfa de rata, así como también todos los ligandos EGFR humanos excepto Epigen y Anfiregulina eran potentes estimuladores de la proliferación celular en el ensayo (Tabla 5). El anticuerpo I y el anticuerpo III tienen elevada afinidad por la actividad de TGF-alfa humana y de rata y Epiregulina humana (Tabla 5).

- 5 La Tabla 5 resume los valores de EC50 calculados para los ligandos EGFR sometidos a ensayo y los valores de IC50 absolutos para los anticuerpos frente a esos ligandos. El valor medio de IC50 calculado para el Anticuerpo I fue de $0,46 \pm 0,03$ nM para TGF-alfa humana y $3,15 \pm 1,04$ nM para Epiregulina humana. El valor medio de IC50 calculado para el Anticuerpo III fue de $0,52 \pm 0,04$ nM para TGF-alfa humana y $1,12 \pm 0,36$ nM para Epiregulina humana. El valor medio de IC50 calculado para el Anticuerpo III fue de $0,13 \pm 0,01$ nM para TGF-alfa de rata y de 214 ± 49 nM para Epiregulina de ratón. De este modo, el Anticuerpo I y el Anticuerpo III tienen elevada afinidad y son selectivos con actividad neutralizante completa frente a TGF-alfa humana y Epiregulina humana.

Ejemplo 5: Función Renal y Patología en un Modelo Residual de Riñón de Ratón de Enfermedad Renal Hipertensora

- 15 Se usa un modelo residual de ratón que implica la reducción quirúrgica de 75 % de la masa renal total como modelo preclínico de enfermedad renal hipertensora. [MaLJ, Fogo AB, KidneyInt. 2003 Jul; 64(1): 350-5]. Se hace la reducción quirúrgica de la masa renal o cirugía sham en ratones macho 129 Svej de 9-10 semanas. Se lleva a cabo la aleatorización en grupos de 12 ratones a las 2 semanas después de la cirugía, por medio de proporción de creatinina/albumina en orina ("ACR") y peso corporal. Se dosifican, por vía subcutánea, el IgG de Control isotópico (10 mg/kg) o el Anticuerpo III (1 y 10 mg/kg) tras la aleatorización y se continuó una vez por semana hasta la semana 16 después de la cirugía. Los puntos finales del estudio son supervivencia, tensión arterial sistólica, albuminuria, creatinina en suero, BUN en suero, TGF-alfa en orina, MIP-2 en orina y patología renal.

Al final del estudio, hubo 3 muertes en el grupo IgG de Control (25 % de mortalidad), sin muertes en los grupos de tratamiento del Anticuerpo III.

Medición de la tensión arterial sistólica

- 25 Se tomó la tensión arterial a las 12 semanas después de la cirugía por medio del método de pletismografía en cola. Se aclimataron ratones escogidos de cada grupo (N = 3-4 por grupo) a la limitación colocándolos en el receptáculo para ratones con el pletismógrafo de cola unido durante 5 minutos al día, 3-5 días antes de la medición real. Se aumenta la temperatura ambiente del equipo hasta 24 °C para proporcionar calor adicional durante el proceso de recogida de la tensión arterial. Se colocan los ratones en un dispositivo moderador de ratones y se coloca sobre la parte superior de la unidad de capa de calentamiento (31-33 °C) para proporcionar un retardo en la vasculatura de la cola. Se coloca la cola a través del pletismógrafo de cola y se establece una limitación en cada ratón durante aproximadamente 30 minutos, no superando los 45 minutos. El tiempo incluye las mediciones de calentamiento inicial y presión seguido de un retorno inmediato al receptáculo general. No se usa anestesia. Se infla el pletismógrafo de cola, comprimiendo la cola de forma bastante firme para interrumpir momentáneamente el flujo de sangre arterial, y posteriormente se libera gradualmente por medio de desinflado para observar el retorno del pulso arterial. Al recuperar al pulso arterial, se desinfla por completo la cola.

Medición de albuminuria

- 40 Se recoge orina cada 4 semanas en unidades de jaula Nalgene Metabolic durante un período de 24 horas. Cada ratón (alojado de forma individual) recibe alimento y agua durante el proceso de recogida de 24 horas. Al final del período de 24 horas, se coloca la orina recogida en hielo, se centrifuga y se somete a análisis de albúmina y creatinina. Se define la albuminuria como la proporción de albúmina con respecto a creatinina en la orina (ug/mg).

Creatinina y BUN en suero

A la conclusión del estudio, se analiza el suero obtenido por medio de punción cardíaca para determinar el contenido de BUN y creatinina.

45 TGF-alfa y MIP-2 ELISA

- Se concentra 5 veces la orina obtenida por medio de una recogida de 24 horas, por vía centrifuga, usando una membrana de valor límite de 3 K MW que gira a 14.000 x g durante 30 minutos. Se establece un ensayo inmunoabsorbente enzimático de tipo sándwich ("ELISA") para TGF-alfa de ratón. Se usa TGF-alfa de rata como patrón. Se revisten placas de poliestireno de 96 pocillos con 3 µg/ml de Anticuerpo III durante la noche a 4 °C. Se lavan las placas, se bloquean con tampón de bloqueo, se lavan de nuevo, y posteriormente se añaden muestras de orina concentrada. Trascorridas 2 horas a temperatura ambiente, se lavan las placas, y se añade posteriormente anti-hTGF alfa policlonal secundaria sometida a tratamiento con biotina. Trascorridas 2 horas a temperatura ambiente, se lavan las placas y se incuban con estreptavidina-HRP durante 30 minutos. Se genera señal con sustrato TMB, y se detiene la reacción con H₂SO₄ 2 N. Se usa un estuche ELISA sándwich comercial Quantikine® para la proteína 2 inflamatoria de macrófago de ratón (MIP-2, el equivalente de IL-8 humano) para detectar MIP-2 en orina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtienen los datos de absorbancia para ambos ensayos de

ELISA en un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) y se analizan los datos.

Patología Renal

5 Se retiran riñones residuales a la conclusión del estudio, se fijan en formalina y se procesan para seccionamiento con parafina de acuerdo con la metodología convencional. Se evalúan las lesiones renales en las secciones de riñón por parte de un patólogo. Se puntúan de forma semi-cuantitativa la proteína tubular, la matriz mesangial aumentada y la fibrosis intersticial, usando la siguiente escala: nada (0), mínima (1), ligera (2), moderada (3), pronunciada (4) y grave (5). Se puntúan la expansión de matriz mesangial glomerular y el engrosamiento de la membrana del basamento, usando secciones teñidas con ácido de Schiff ("PAS") Periódico y hematoxilina y eosina ("H&E"). Se evalúan secciones teñidas con tricromo de Masson para determinar el grado de fibrosis (intersticial y glomerular).

10 **Métodos Estadísticos**

Se analizan todos los datos con un soporte lógico JMP v 8,0 (SAS Institute). Se evalúan estadísticamente las puntuaciones de patología por medio de un análisis de contingencia y un ensayo exacto de Fishers. Se evalúan todos los otros datos por medio de ANOVA con datos transformados con logaritmo y ensayo de t de Student para datos desapareados. Un valor de P < 0,05 se considera estadísticamente significativo.

15 **Tabla 6**

| Evolución de albuminuria con el tiempo | | | | | |
|--|------------|----------|------------------------|-----------------------|-----------|
| Semanas | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 |
| IgG de Control (10 mg/kg) | 1601 ± 269 | 3377±860 | 5201±907 | 6144±1654 | 4863±2170 |
| Anticuerpo III (1 mg/kg) | 1665 ±305 | 3211±343 | 3224±518 | 3790±857 | 5240±2004 |
| Anticuerpo III (10 mg/kg) | 1626 ±273 | 2245±334 | 2399± 261 ^a | 2749±401 ^a | 3254±654 |
| Media aritmética ±SEM para la proporción de albúmina con respecto creatinina en orina (ug/mg) | | | | | |
| ^a Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el IgG de Control (p < 0,05) | | | | | |

20 Hubo una disminución dependiente de la dosis en albuminuria con respecto al grupo IgG de Control con el Anticuerpo III (Tabla 6). El tratamiento de Anticuerpo III a 10 mg/kg tuvo como resultado una reducción significativa en albuminuria en las semanas 8 y 12 después de la cirugía con respecto al grupo IgG de control, pero no en las semanas 2, 4 o 16 (Tabla 6).

Tabla 7

| Tensión arterial sistólica, creatinina y BUN en suero | | | |
|--|---|---------------------------------------|--------------------------------|
| Punto Final | Tensión Arterial Sistólica Semana 12 (mm de Hg) | Semana 16 Creatinina en Suero (mg/dl) | Semana 16 BUN en Suero (mg/dl) |
| Sham | nd | 0,17 ± 0,01 | 31,5 ± 2,5 |
| IgG de Control (10 mg/kg) | 139,6±4,0 | 0,31±0,04 ^a | 64,0±12,5 ^a |
| Anticuerpo III (1 mg/kg) | 147,5±8,2 | 0,29±0,01 ^a | 47,6±1,7 |
| Anticuerpo III (10 mg/kg) | 157,3±4,5 | 0,23±0,01 ^b | 44,8±1,5 ^o |
| Media aritmética ±SEM | | | |

| |
|--|
| ^a Estadísticamente significativo con respecto al grupo sham ($p < 0,05$) |
| ^b Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo IgG de Control ($p < 0,05$) |
| nd, no determinado |

5 El anticuerpo III no demostró efecto alguno sobre la tensión arterial sistólica, ya que todos los grupos demostraron hipertensión a las 12 semanas después de la cirugía (Tabla 7). Además, el tratamiento con Anticuerpo III a 10 mg/kg tuvo como resultado mejoras en la función renal como se muestra por medio de las reducciones significativas de creatinina en suero y BUN con respecto al grupo IgG de Control (Tabla 7).

Tabla 8

| TGA-alfa en orina, MIP-2 en orina y puntuaciones de patología renal | | | | | |
|--|--|--|--|--|---|
| Punto Final | Proporción de TGF-alfa con respecto a creatinina en orina Semana 8 (pg/mg) | Proporción de MIP-2 con respecto a creatinina en orina Semana 12 (pg/mg) | Puntuación de Proteína Tubular Patología Semana 12 (1-5) | Puntuación de Matriz Mesangial Patología Semana 16 (1-5) | Puntuación de Fibrosis Intersticial Patología Semana 16 (1-5) |
| Sham | 115±4 | No detectable | 0±0 | 0±0 | 0,25±0,25 |
| IgG de Control (10 mg/kg) | 102±53 | 22,8±7,4 | 2,55±0,16 | 1,91±0,28 | 2,09±0,16 |
| Anticuerpo III (1 mg/kg) | 74±18 | nd | 2,17±0,11 | 1,58±0,15 | 1,83±0,21 |
| Anticuerpo III (10 mg/kg) | 19±5 ^a | 5,6±0,9 ^a | 2,08±0,08 ^a | **1,42±0,15 | 1,42±0,15 ^a |
| Media aritmética ±SEM | | | | | |
| ^a Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo IgG de Control ($p < 0,05$) | | | | | |
| nd, no determinado | | | | | |

10 Hubo una reducción estadísticamente significativa en TGF-alfa en orina y MIP-2 en orina en las semanas 8 y 12 después de la cirugía respectivamente con una dosis de 10 mg/kg de Anticuerpo III en comparación con el grupo IgG de Control (Tabla 8). Además, hubo reducciones estadísticamente significativas en patología renal para proteína tubular y fibrosis intersticial y una disminución de la expansión de matriz mesangial con la dosis de 10 mg/kg de Anticuerpo III en comparación con el IgG de Control (Tabla 8).

Ejemplo 6: Albuminuria y patología renal en un modelo db/db de uninefroctomía de ratón de enfermedad renal diabética

15 El modelo de ratón db/db sometido a uninefroctomía representa un modelo de nefropatía diabética. [Ninichuk et al., Eur J Med Res. 2007 Agosto 16; 12 (8): 351-5]. Se usa el modelo db/db sometido a uninefroctomía para determinar los efectos del Anticuerpo III sobre los parámetros de enfermedad renal debido a la diabetes. Se lleva a cabo la cirugía de uninefroctomía ("UniNx") sobre ratones db/db sobre un fondo de C57BLKS/J en 4 semanas de edad con retirada del riñón derecho. Se lleva a cabo la aleatorización en grupos de 12 ratones a las 8 semanas de edad, por medio de ACR en orina, glucosa en sangre y peso corporal. Todos los ratones son hiperglucémicos al comienzo de cada estudio. Se dosifican subcutáneamente un IgG de Control isotópico o Anticuerpo III comenzando a las 9 semanas de edad y se continuó una vez por semana hasta las 25 semanas de edad. Se lleva a cabo el Estudio 1 con dosis de 0,3 a 10 mg/kg de Anticuerpo III y una dosis de 10 mg/kg de IgG de Control isotópico. Los puntos finales del estudio 1 son supervivencia, % de HbA1c, albuminuria, TGF-alfa en orina, peso del riñón y patología renal. El estudio 2 contiene grupos de dosis de 30, 10, 3 y 0,3 mg/kg de Anticuerpo III con una dosis de 30 mg/kg de IgG de Control isotópico. Los puntos finales del estudio 2 son supervivencia y albuminuria.

20

25

Hubo únicamente una muerte en el grupo IgG de Control en el estudio 1. No hubo muertes en el Estudio 2.

Recogida de orina y medición de Albuminuria

5 Se recoge la orina por medio del método de recogida por impronta para la toma de orina durante un período de tiempo de 2-4 horas. Se coloca un ratón individual en la parte superior de una microplaca de polipropileno de 96 pocillos y posteriormente se cubre con una cámara de Plexiglas con orificios para la transpiración pero evitando la entrada de agua o alimento. Al final de este período de tiempo, se retira la orina de la placa con una micropipeta y se coloca sobre hielo, se centrifuga y se somete a análisis de albúmina y creatinina. Se define la albuminuria como la proporción de albúmina con respecto a creatinina en la orina (ug/mg).

Determinación de % de HbA1c

10 Se usa el % de HbA1c como medida de la hiperglucemia al final del estudio. Se obtiene plasma de EDTA en la necropsia por medio de punción cardíaca. Se centrifugan las muestras de sangre a 2000 g durante 20 minutos para retirar las células sanguíneas y obtener plasma. Se analizan las muestras de plasma para determinar la Hemoglobina A1c y la Hemoglobina Total. A partir de estos datos, se calcula el % de HbA1c.

Peso de Riñón

15 Se retiran los riñones en la necropsia para determinar su peso.

Determinación de TGF-alfa en orina por medio de ELISA

20 Se concentra 5 veces la orina obtenida por medio de recogida por impronta con un filtro centrífugo Amicon Ultra de 0,5 ml que contenía una membrana de punto de corte de 3 K MW. Se centrifuga el dispositivo a 14.000 x g durante 30 minutos, y posteriormente se recogen las muestras de orina concentradas. Se establece ELISA tipo sándwich para TGF-alfa de ratón. Se usa TGF-alfa de rata como patrón para ELISA TGF-alfa. Se revisten placas de 96 pocillos de poliestireno con 3 µg/ml de Anticuerpo III durante la noche a 4 °C. Se lavan las placas, se someten a bloqueo con tampón de bloqueo, se lavan de nuevo, y posteriormente se añaden las muestras de orina concentradas. Trascorridas 2 horas a temperatura ambiente, se lavan las placas, y posteriormente se añade anti-h-TGF-alfa policlonal sometida a tratamiento con biotina secundaria. Trascorridas 2 horas a temperatura ambiente, se lavan las placas y se incuban con estreptavidina-HRP durante 30 minutos. Se genera la señal con sustrato TMB, y se detiene la reacción con H₂SO₄ 2N. Se obtienen los datos de absorbancia en un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices) y se importan los datos en Microsoft Excel 2007 y Sigmaplot v 9.01 para el análisis.

Patología Renal

30 Se retiran los riñones a la conclusión del estudio, se retiran las cápsulas y posteriormente se fijan en formalina y se procesan para el seccionamiento con parafina de acuerdo con tecnología convencional. Se evalúan las lesiones renales de las secciones de riñón por parte de un patólogo. Se puntúan semi-cuantitativamente la matriz mesangial, la dilatación pélvica y la fibrosis glomerular, usando la siguiente escala: nula (0), mínima (1), ligera (2), moderada (3), pronunciada (4) y grave (5). Se puntúan la expansión de matriz mesangial glomerular y el engrosamiento de la membrana de basamento usando las secciones teñidas con H&E y PAS. Se evalúan las secciones de riñón teñidas con tricromo de Masson para determinar el grado de fibrosis (glomerular).

Métodos Estadísticos

40 Se analizan todos los datos con un soporte lógico JMP v 8.0 (SAS Institute). Se evalúan estadísticamente las puntuaciones de patología por medio de análisis de contingencia y ensayo exacto de Fishers. Se lleva a cabo el análisis estadístico de albuminuria (ACR) por medio de un modelo de Fit con datos nanotransformados y ACR de línea base en la semana 8 en forma de covariación. Se analiza la evolución de ACR por medio de comparación de los datos a las 24 semanas con los datos a las 16 semanas dentro de cada grupo por medio de ensayo de ANOVA y t de Student con datos no apareados. El cambio de ACR desde la semana 16 hasta la semana 24 a través de los grupos se lleva a cabo por medio de un ensayo de ANOVA y t de Student con datos no apareados. Se considera que un valor de P < 0,05 es estadísticamente significativo. Se evalúan todos los datos por medio de ANOVA con datos transformados por logaritmo y ensayo de t de Student con datos no apareados.

Tabla 9

| Estudio 1 - Evolución de albuminuria | | | | | | | |
|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Edad (semanas) | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | Cambio de ACR Semanas 16-24 (ug/mg) | Cambio de ACR Semanas 16-24 (%) |
| Delgado y sano | nd | 15 ± 2 | 19±3 | 13±3 | 12± 2 | nd | nd |
| IgG de Control db/db @ 10 mg/kg | 273±59 ^a | 903±125 ^a | 1551±180 ^a | 2384±257 ^a | 3228±488 ^{ac} | 1677±419 | 108±27 |
| Anticuerpo III db/db @ 0,3 mg/kg | 299±63 ^a | 913±174 ^a | 1573±209 ^a | 1911±222 ^a | 2248±417 ^{ab} | 675±332 ^b | 43±21 |
| Anticuerpo III db/db @ 10 mg/kg | 291±55 ^a | 1002±107 ^a | 965±141 ^a | 1433±190 ^{ab} | 1426±230 ^{ab} | 461±219 ^b | 48±23 |
| Media aritmética ±SEM | | | | | | | |
| ^a Estadísticamente significativo con respecto al grupo delgado y sano (p < 0,05) | | | | | | | |
| ^b Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo IgG de Control (p < 0,05) | | | | | | | |
| ^c Estadísticamente significativo con respecto al momento de tiempo 16 dentro de ese grupo (p < 0,05) | | | | | | | |

5 En el Estudio 1, hubo una disminución dependiente de la dosis en albuminuria con respecto al grupo IgG de Control con el Anticuerpo III (Tabla 9). Hubo menos evolución de albuminuria en comparación con el grupo IgG de Control para ambos grupos de Anticuerpo III durante los dos últimos meses. El cambio en albuminuria dentro del grupo durante los dos últimos meses del estudio indicó que el grupo de Control IgG aumentó significativamente desde la semana 16 hasta la semana 24, mientras que los Grupos de Anticuerpo III no lo hicieron (Tabla 9). En el Estudio 2, hubo una reducción dependiente de la dosis en la evolución de albuminuria con el tiempo con el Anticuerpo III en comparación con el IgG de Control (Tabla 9).

10

Tabla 10

| Estudio 2 - Evolución de albuminuria | | | | | | | |
|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Edad (semanas) | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | Cambio de ACR Semanas 16-24 (ug/mg) | Cambio de ACR Semanas 16-24 (%) |
| Delgado y sano | nd | 13±0 | 15±0 | 9±0 | 9±0 | nd | nd |
| IgG de Control db/db @ 30 mg/kg | 358±76 ^a | 1325±271 ^a | 1621±350 ^a | 2219±320 ^a | 2397±242 ^a | 776±379 | 48±23 |
| Anticuerpo III db/db @ 0,3 mg/kg | 356±60 ^a | 1200±213 ^a | 2410±393 ^a | 2286±416 ^a | 2086±394 ^a | -323±279 ^b | -13±12 ^b |
| Anticuerpo III db/db @ | 367±77 ^a | 1122±248 ^a | 1670±193 ^a | 1427±204 ^a | 1544±264 ^{ab} | -126±208 ^b | -8±12 ^b |

| | | | | | | | |
|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|
| 3 mg/kg | | | | | | | |
| Anticuerpo III db/db @ 10 mg/kg | 326±77 ^a | 1107±304 ^a | 1659±286 ^a | 1202±189 ^{ab} | 1171±252 ^{ab} | -489±275 ^b | -29±17 ^b |
| Anticuerpo III db/db @ 30 mg/kg | 308±68 ^a | 1155±179 ^a | 1669±223 ^a | 1334±237 ^a | 950±132 ^{ac} | -719±230 ^b | -43±14 ^b |
| Media aritmética ±SEM | | | | | | | |
| ^a Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo delgado y sano (p < 0,05) | | | | | | | |
| ^b Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo IgG de Control (p < 0,05) | | | | | | | |
| ^c Estadísticamente significativo con respecto al momento de tiempo 16 dentro de ese grupo (p < 0,05) | | | | | | | |

El cambio en albuminuria durante los dos últimos meses del ensayo del Estudio 2 indicó que 30 mg/kg de Anticuerpo III dieron como resultado una reducción significativa de albuminuria durante los dos últimos meses del estudio, mientras que IgG de Control aumentó durante el mismo periodo de tiempo (Tabla 10).

5

Tabla 11

| HbA1c, Peso de Riñón, TGF alfa en orina y puntuaciones de patología renal | | | | | | |
|--|-----------------------|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| Punto Final | HbA1c (%) | Peso de Riñón (mgs) | TGF alfa en orina Semana 8 (pg/mg) | TGF alfa en orina Semana 24 (pg/mg) | Puntuación de patología de Matriz Mesangial (1-5) | Puntuación de Patología de Dilatación Pélvica (1-5) |
| Delgado y sano | 4,1±0,0 | 138±4 | nd | nd | 0±0 | 0±0 |
| IgG de Control db/db @ 10 mg/kg | 11,1±0,3 ^a | 396±13 ^a | 215±17 | 199±18 | 1,92±0,08 ^a | 1,67±0,14 ^a |
| Anticuerpo III db/db @ 0,3 mg/kg | 11,2±0,4 ^a | 375±14 ^a | 208±17 | 145±30 ^b | 1,64±0,15 ^a | 0,45±0,16 ^{ab} |
| Anticuerpo III db/db @ 10 mg/kg | 10,7±0,4 ^a | 359±12 ^{ab} | 193±16 | 3±1 ^b | 1,17±0,11 ^{ab} | 0,25±0,13 ^{ab} |
| Media aritmética ±SEM | | | | | | |
| ^a Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo delgado y sano (p < 0,05) | | | | | | |
| ^b Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo IgG de Control (p < 0,05) | | | | | | |

El peso de riñón izquierdo disminuyó de forma significativa en el grupo de 10 mg/kg de Anticuerpo III con respecto a los grupos de IgG Control 10 mg/kg y 0,3 mg/kg de Anticuerpo III (Tabla 11). Hubo una disminución significativa en TGF-alfa en orina durante el transcurso del estudio en el grupo de dosis de 10 mg/kg de Anticuerpo III (Tabla 11). Además, el % de HbA1c para todos los grupos de tratamiento se elevó significativamente con respecto a los ratones sanos de Control (Tabla 11). El tratamiento con Anticuerpo III no afectó a % de HbA1c en comparación con el grupo IgG de Control (Tabla 11). Además, hubo reducciones significativas en las puntuaciones de patologías renales para la expansión de matriz mesangial y dilatación pélvica con 10 mg/kg de Anticuerpo III en comparación con el IgG de Control (Tabla 11).

15 **Ejemplo 7: Estudio de Toxicidad y Toxicocinético en Macacos de Java a los que se han Suministrado Inyecciones Intravenosas Rápidas durante 6 Semanas.**

Se llevó a cabo un estudio toxicológico de 6 semanas en monos para evaluar si la inhibición de TGF-alfa y Epiregulina conducía a toxicidad cutánea. Se dosifica a los monos un vehículo, 10 o 100 mg/kg de inyección intravenosa de Anticuerpo I (IV) en régimen semanal durante 6 semanas. Se alterna el punto de inyección entre las venas safena derecha e izquierda. Se proporciona alimentación dos veces al día (una vez por la mañana y una vez por la tarde). La ración de alimento de la mañana se proporciona poco después de la dosificación en los días de dosificación. No se ofrecen complementos ni tratamientos ricos en calcio durante el estudio. Se ofrece una multivitamina para niños una vez a la semana los Sábados (tras las recogidas de sangre posteriores a la dosis de 96 horas, cuando resultó aplicable).

Se alojan los monos en jaulas de malla metálica/barrotes de acero inoxidable "divididas por pares" durante todo el estudio. Durante las primeras tres semanas, se mantuvieron los animales de forma individual. Para el resto del estudio, se albergaron los animales por pares dentro de los grupos de tratamiento, comenzando cada tarde y continuando hasta la mañana siguiente, con el fin de proporcionar una oportunidad adicional para la socialización.

El Nivel de Efecto Adverso No Observado ("NOAEL") para el estudio fue de 100 mg/kg de Anticuerpo I. No se observaron cambios cutáneos en los animales tratados. No se observaron otros cambios de patología.

Listado de SEQ ID

CDRs de Cadena Pesada

SEQ Nº ID: 1 GYTFTDAYIN

SEQ Nº ID: 2 WIWPGPVITYYNPKFKG

SEQ Nº ID: 3 REVLSPFAY

CDRs de Cadena Ligera

SEQ Nº ID: 4 RSSQSIVHSTGNTYLE

SEQ Nº ID: 5 KVSNRFS

SEQ Nº ID: 6 FHGTHVPYT

Regiones Variables de Cadena Pesada

SEQ Nº ID: 7(Anticuerpo I y Anticuerpo II)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDAYINWVRQAPGQGLEWMGWIW
PGPVITYYNPKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARREVLSPFAY
WGQGTTVTVSS

SEQ Nº ID: 8 (Anticuerpo III)

QVQLQSQGPPELVKPGASVKISCKASGYTFTDAYINWVKQRPGQGLEWIGWIWPG
PVITYYNPKFKGKATLVTDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAFYFCARREVLSPFAYWG
QGTLVTVSA

Regiones Variables de Cadena Ligera

SEQ Nº ID: 9 (Anticuerpo I)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKV
SNRFGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIK

SEQ Nº ID: 10 (Anticuerpo II)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKV
SNRFGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIK

SEQ Nº ID: 11 (Anticuerpo III)

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFHGTHVPYTFGGGTKLEIK

Cadena Pesada Completa

SEQ Nº ID: 12 (Anticuerpo I y Anticuerpo II)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDAYINWVRQAPGQGLEWMGWIW
PGPVITYYNPKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARREVLSPFAY
WGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE
SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK G
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLG

5

Cadenas Ligeras Completas

SEQ Nº ID: 13 (Anticuerpo I)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKV
SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ Nº ID: 14 (Anticuerpo II)

DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKV
SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

Secuencias de Nucleótidos

Región Variable de Cadena Pesada

SEQ Nº ID: 15

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAG
TGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGCTACACCTTCACTGACGCGTATATAAAC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTGGC
CTGGACCCGTTATTACTTACTACAATCCGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACCATT
ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT
CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGAAGTACTATCCCCGTT
TGCTTACTGGGGCCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA

15

Secuencias de Nucleótidos

Regiones Variables de Cadena Ligera

SEQ Nº ID: 16

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAG
GGCCACCATCAACTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTACTGGAAAC
ACCTATTTAGAATGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCA
TTTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGC
GGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATG
TGGCAGTTTATTACTGTTTTACGGCACTCATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGA
GGACCAAGGTGGAGATCAAA

SEQ Nº ID: 17

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTACTGGAAAC
ACCTATTTAGAATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGA
TCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCAACTTACTACTGTTTTACGGCACTCATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAG
GGACCAAGGTGGAGATCAAA

TGF Alfa Humana Madura

5 SEQ Nº ID: 18

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

TGF Alfa (Mus musculus) de Ratón Madura

SEQ Nº ID: 19

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCTRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCCEHADLLA

10 **TGF Alfa (Rattusnorvegicus) de Ratón Madura**

SEQ Nº ID: 20

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCTRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCCEHADLLA

TGF Alfa (Macaca fascicularis) Cyno Madura

SEQ Nº ID: 21

15 VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

Epiregulina Humana Madura - adición de metionina N-terminal

SEQ Nº ID: 22

MVSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFL

Epiregulina (Mus musculus) de Ratón Madura - adición de metionina N-terminal

20 SEQ Nº ID: 23

MVQITKCSSDMDGYCLHGQCIYLVDMREKFCRCEVGYTGLRCEHFFL

Epiregulina (Macaca fascicularis) Cyno Madura

SEQ Nº ID: 24

VSITKCNDSMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFYL

Epigen Humano Maduro

SEQ N° ID: 25

AVTVTPPITAQQADNIEGPIALKFSHLCLEDHNSYCINGACAFHHELEKAICRCFT
GYTGERCEHLTLTSYA

Epigen (Mus musculus) de Ratón Maduro

5 SEQ N° ID: 26

LKFSHPCLEDHNSYCINGACAFHHELKQAICRCFTGYTGQRCEHLTLTSYA

EGF Humano Maduro - adición de metionina N-terminal

SEQ N° ID: 27

MNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWE
LR

10 **HBEGF Humano Maduro**

SEQ N° ID: 28

DLQEADLDLLRVTLSSKPQALATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYKDF
CIHGECKYVKELRAPSCICHPGYHGERCHGLSL

Betacelulina Humana Madura

SEQ N° ID: 29

15 DGNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKGHFSRCPKQYKHYCIKGRCRFV
VAEQTPSCVCDEGYIGARCERVDLFY

Anfiregulina Humana Madura

SEQ N° ID: 30

SVRVEQVVKPPQNKTESENTSDKPKRKKKGKNGKNRRNRKKKNPCNAEFQNF
CIHGECKYIEHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLK

Anticuerpo III de Cadena Pesada Completo - Anticuerpo de Ratón

20 SEQ N° ID: 31

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDAYINWVKQRPQG LEWIGWIWPG
PVITYYNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAFYFCARREVLSPFAYWG
QGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS
LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD
CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDD
VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS
KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVEWQWNGQPAENY
KNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSP
GK

Anticuerpo III de Cadena Ligera Completo - Anticuerpo de Ratón

SEQ N° ID: 32

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFHGTHVPYTFGGGTKLEIK
 RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKDKINVKWKIDGSERQNGVLNS
 WTDQSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

Epiregulina Humana Madura

SEQ N° ID: 33

VSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFL

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> Anticuerpos que se unen a TGF-alfa y Epiregulina

<130> X18890

<150> 61/472338 <151> 2011-04-06

10 <160> 33

<170> Versión Patentin 3.5

<210> 1

<211> 10

<212>PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223>Estructura Sintética

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala Tyr Ile Asn
 1 5 10

20 <210> 2

<211> 17

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Estructura Sintética

<400> 2

Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

ES 2 539 503 T3

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

5 <400> 3

Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4

<211> 16

<212>PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

15

<210> 5

<211> 7

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Estructura Sintética

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6

25 <211> 9

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

30 <400> 6

Phe His Gly Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7

ES 2 539 503 T3

<211> 118

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Estructura Sintética

<400> 7

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe

50

55

60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

10 <211> 118

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

15 <400> 8

ES 2 539 503 T3

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 9

<211> 112

<212>PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

<400> 9

ES 2 539 503 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe His Gly
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 112

<212>PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

ES 2 539 503 T3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

ES 2 539 503 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 13

<211> 219

<212>PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

<400> 13

ES 2 539 503 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

 Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe His Gly
 85 90 95

 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

<211> 219

5 <212>PRT

ES 2 539 503 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

<400> 14

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe His Gly
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 15

<211> 354

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

ES 2 539 503 T3

<220>

<223> Estructura Sintética

<400> 15

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| caggtgcagc | tggtgcagtc | tggggctgag | gtgaagaagc | ctgggtcctc | agtgaaggtt | 60 |
| tcctgcaagg | catctggcta | caccttcact | gacgcgtata | taaactgggt | gcgacaggcc | 120 |
| cctggacaag | ggcttgagtg | gatgggatgg | atttggcctg | gacccgttat | tacttactac | 180 |
| aatccgaagt | tcaagggcag | agtcaccatt | accgcggaca | aatccacgag | cacagcctac | 240 |
| atggagctga | gcagcctgag | atctgaggac | acggccgtgt | attactgtgc | gagaagggaa | 300 |
| gtactatccc | cgtttgctta | ctggggccaa | ggaaccacgg | tcaccgtctc | ctca | 354 |

5 <210> 16

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Estructura Sintética

<400> 16

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gacatcgtga | tgaccagtc | tccagactcc | ctggctgtgt | ctctgggcga | gagggccacc | 60 |
| atcaactgca | gatctagtca | gagcattgta | catagtactg | gaaacaccta | tttagaatgg | 120 |
| taccagcaga | aaccaggaca | gcctcctaag | ctgctcattt | acaaagtffc | caaccgattt | 180 |
| tctggggctcc | ctgaccgatt | cagtggcagc | gggtctggga | cagatttcac | tctcaccatc | 240 |
| agcagcctgc | aggctgaaga | tgtggcagtt | tattactgtt | ttcacggcac | tcatgttccg | 300 |
| tacacgttcg | gcggagggac | caaggtggag | atcaaaa | | | 336 |

<210> 17

15 <211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Sintética

20 <400> 17

ES 2 539 503 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctct ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgca gatctagtca gagcattgta catagtactg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tatcagcaga aaccagggaa agcccctaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc catcaagggt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc 240
 agcagtctgc aacctgaaga ttttgcaact tactactggt ttcacggcac tcatgttccg 300
 tacacgttcg gcggaggac caaggtggag atcaaa 336

5 <210> 18
 <211> 50
 <212>PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

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

10 <210> 19
 <211> 50
 <212>PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 19

ES 2 539 503 T3

Val Val Ser His Phe Asn Lys Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Tyr Cys
1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Glu Lys Pro Ala Cys
20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Ala
50

<210> 20

5 <211> 50

<212>PRT

<213>Rattus norvegicus

<400> 20

Val Val Ser His Phe Asn Lys Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Tyr Cys
1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Glu Lys Pro Ala Cys
20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Ala
50

10 <210> 21

<211> 50

<212>PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 21

ES 2 539 503 T3

Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Phe Cys
 1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys
 20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
 35 40 45

Leu Ala
 50

<210> 22

<211> 47

<212>PRT

5 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223>Epiregulina Humana Madura con adición de metionina N-terminal

<400> 22

Met Val Ser Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu
 1 5 10 15

His Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg
 20 25 30

Cys Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
 35 40 45

10 <210> 23

<211> 47

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223>Epiregulina (Mus musculus) de Ratón Madura con adición de metionina N-terminal

<400> 23

ES 2 539 503 T3

Met Val Gln Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asp Gly Tyr Cys Leu
 1 5 10 15

His Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Arg Glu Lys Phe Cys Arg
 20 25 30

Cys Glu Val Gly Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
 35 40 45

<210> 24

<211> 46

<212>PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 24

Val Ser Ile Thr Lys Cys Asn Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu His
 1 5 10 15

Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg Cys
 20 25 30

Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Tyr Leu
 35 40 45

<210> 25

<211> 72

10 <212>PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Val Thr Val Thr Pro Pro Ile Thr Ala Gln Gln Ala Asp Asn Ile
 1 5 10 15

Glu Gly Pro Ile Ala Leu Lys Phe Ser His Leu Cys Leu Glu Asp His
 20 25 30

Asn Ser Tyr Cys Ile Asn Gly Ala Cys Ala Phe His His Glu Leu Glu
 35 40 45

Lys Ala Ile Cys Arg Cys Phe Thr Gly Tyr Thr Gly Glu Arg Cys Glu
 50 55 60

His Leu Thr Leu Thr Ser Tyr Ala
 65 70

ES 2 539 503 T3

<210> 26

<211> 51

<212>PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 26

Leu Lys Phe Ser His Pro Cys Leu Glu Asp His Asn Ser Tyr Cys Ile
1 5 10 15

Asn Gly Ala Cys Ala Phe His His Glu Leu Lys Gln Ala Ile Cys Arg
20 25 30

Cys Phe Thr Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu His Leu Thr Leu Thr
35 40 45

Ser Tyr Ala
50

<210> 27

<211> 54

<212>PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223>EGF Humana Madura con metionina N-terminal

<400> 27

Met Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu
1 5 10 15

His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys
20 25 30

Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu
35 40 45

Lys Trp Trp Glu Leu Arg
50

15 <210> 28

<211> 86

<212>PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 28

ES 2 539 503 T3

Asp Leu Gln Glu Ala Asp Leu Asp Leu Leu Arg Val Thr Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Pro Gln Ala Leu Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg
 20 25 30

Lys Lys Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg
 35 40 45

Lys Tyr Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Val Lys Glu
 50 55 60

Leu Arg Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro Gly Tyr His Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Cys His Gly Leu Ser Leu
 85

<210> 29

<211> 80

<212>PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 29

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
 20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
 35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
 50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr
 65 70 75 80

<210> 30

<211> 98

10 <212>PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 30

ES 2 539 503 T3

Ser Val Arg Val Glu Gln Val Val Lys Pro Pro Gln Asn Lys Thr Glu
1 5 10 15

Ser Glu Asn Thr Ser Asp Lys Pro Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys
20 25 30

Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro Cys Asn Ala
35 40 45

Glu Phe Gln Asn Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Ile Glu His
50 55 60

Leu Glu Ala Val Thr Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr Phe Gly Glu Arg
65 70 75 80

Cys Gly Glu Lys Ser Met Lys Thr His Ser Met Ile Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Lys

<210> 31

<211> 442

<212>PRT

5 <213>Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura Artificial

<400> 31

ES 2 539 503 T3

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

ES 2 539 503 T3

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220

Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270

Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320

Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335

Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 340 345 350

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 420 425 430

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

ES 2 539 503 T3

<210> 32

<211> 219

<212>PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Estructura Artificial

<400> 32

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1          5          10          15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20          25          30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35          40          45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe His Gly
 85          90          95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100         105         110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115         120         125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130         135         140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145         150         155         160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165         170         175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180         185         190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195         200         205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210         215
    
```

ES 2 539 503 T3

<210> 33

<211> 46

<212>PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 33

Val Ser Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15

Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg Cys
20 25 30

Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
35 40 45

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo que se une a TGF-alfa y Epregulina, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que LCVR comprende secuencias de amino ácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y HCVR comprende secuencias de amino ácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 es SEQ N° ID: 4, LCDR2 es SEQ N° ID: 5, LCDR3 es SEQ N° ID: 6, HCDR1 es SEQ. N° ID: 1, HCDR2 es SEQ. N° ID: 2 y HCDR3 es SEQ. N° ID: 3.
2. El anticuerpo de la Reivindicación 1, en el que la secuencia de amino ácidos de LCVR es SEQ N° ID: 9 o SEQ N° ID: 10.
3. El anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en el que la secuencia de amino ácidos de HCVR es SEQ N° ID: 7.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de amino ácidos de LCVR es SEQ N° ID: 9 y la secuencia de amino ácidos de HCVR es SEQ N° ID: 7.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de amino ácidos de la cadena ligera es SEQ N° ID: 13 o SEQ N° ID: 14.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en el que la secuencia de amino ácidos de la cadena pesada es SEQ N° ID: 12.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, que comprende dos cadenas ligeras en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena ligera es SEQ N° ID: 13, y dos cadenas pesadas en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena es SEQ N° ID: 12.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o las Reivindicaciones 5 a 6, que comprende dos cadenas ligeras en las que la secuencia de amino ácidos de cadena ligera es SEQ N° ID: 14, y dos cadenas pesadas en las que la secuencia de amino ácidos de cada cadena pesada es SEQ N° ID: 12.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Un anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, para su uso en terapia.
11. Un anticuerpo de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética.
12. Un fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8.
13. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de unión a antígeno de la Reivindicación 12, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Un fragmento de unión a antígeno de la Reivindicación 12 para su uso en terapia.
15. Un fragmento de unión a antígeno de la Reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de nefropatía diabética.