

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 397**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2012 PCT/US2012/051373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13026004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2012 E 12823966 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2744823**

54 Título: **Anticuerpos que se unen con integrina alfa-v beta-8**

30 Prioridad:

17.08.2011 US 201161524708 P

11.05.2012 US 201261646111 P

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

22.11.2017

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)

**1111 Franklin Street 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**NISHIMURA, STEPHEN;
LOU, JIANLONG;
BARON, JODY LYNN y
MARKS, JAMES**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 643 397 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 con integrina alfa-v beta-8

5 **Antecedentes de la invención**

La citocina multifuncional factor de crecimiento transformante β (TGF- β), afecta a células inmunitarias, endoteliales, epiteliales y mesenquimatosas durante el desarrollo y la vida adulta en especies de invertebrados y vertebrados. En mamíferos, estas funciones están mediadas por tres isoformas ampliamente expresadas, TGF- β 1, 2 y 3. Las tres isoformas interactúan con los mismos receptores de superficie celular (TGFBR2 y ALK5) y señalizan a través de las mismas rutas de señalización intracelular, que implican efectores de señalización canónicos (es decir, SMAD) o no canónicos (es decir, MAPK, JUN, PI3K, PP2A, Rho, PAR6). En la ruta de señalización de TGF- β canónica, la señal se propaga desde el receptor de TGF- β mediante fosforilación de SMAD-2/3 citoplasmático, formación de complejo con SMAD-4, translocación del complejo SMAD-2/3/4 al núcleo y unión con elementos de respuesta a SMAD localizados en las regiones promotoras de muchos genes implicados en la respuesta fibrogénica. Aunque las isoformas de TGF- β tienen patrones de señalización similares, cada una cumple distintas funciones biológicas. Las isoformas de TGF- β tienen diferencias en sus afinidades de unión con receptores de TGF- β , mecanismo de activación, intensidad o duración de la señalización o distribución espacial y/o temporal.

Los modelos nuligénicos y de supresión condicional de isoformas de TGF- β , receptores y mediadores de la señalización, así como reactivos de bloqueo de función que se dirigen a todas las isoformas de TGF- β , han revelado papeles esenciales para TGF- β en el desarrollo de linfocitos T, cardíaco, pulmonar, vascular y del paladar. Los ratones deficientes en TGF- β 1 mueren en el útero, debido a defectos en la vasculogénesis del saco vitelino, o sobreviven hasta la adultez con autoinmunidad multiorgánica grave. La supresión genética del mediador de señalización de TGF- β Smad2 revela que es esencial en la formación de patrón temprana y la formación del mesodermo. Los ratones que carecen de Smad3 son viables y fértiles, pero muestran malformaciones de las extremidades, desregulación inmunitaria, colitis, carcinomas de colon y agrandamiento alveolar. En tejidos adultos, la ruta de TGF- β está implicada en las interacciones de células inmunitarias, mesenquimatosas y epiteliales para mantener la homeostasis en respuesta a tensión ambiental.

Las rutas homeostáticas mediadas por TGF- β se alteran en respuesta a lesión repetitiva crónica. El TGF- β es una citocina profibrogénica importante en la respuesta a lesión, que retarda la curación de heridas epiteliales. TGF- β inhibe la proliferación y migración epitelial, promueve la apoptosis y expande el compartimento mesenquimatoso induciendo reclutamiento de fibroblastos, contractilidad de fibroblastos y deposición de matriz extracelular. La transferencia intratraqueal de TGF- β 1 recombinante adenovirico al pulmón de roedor aumenta drásticamente la acumulación de fibroblastos y la expresión de colágeno de tipo I y tipo III alrededor de las vías respiratorias y en el intersticio pulmonar. Los anticuerpos neutralizantes anti TGF- β pueden bloquear la fibrosis pulmonar inducida por radiación o bleomicina.

El aumento de la actividad de TGF- β puede desempeñar un papel en la enfermedad pulmonar fibrótica, glomeruloesclerosis y reestenosis de vasos cardíacos, principalmente mediadas por TGF- β . La función de TGF- β 1 en seres humanos es compleja, como indican los trastornos hereditarios que implican al TGF- β 1 en sí mismo o a sus efectores de señalización. Las mutaciones que aumentan la actividad de la ruta de TGF- β conducen a defectos en el metabolismo óseo (es decir, enfermedad de Camurati-Engelmann), en tejido conectivo (es decir, síndrome de Marfan) y en aneurismas aórticos (es decir, síndrome de Loey-Dietz). Las mutaciones que conducen a actividad reducida de la ruta de TGF- β se correlacionan con cáncer. El papel de TGF- β como un supresor tumoral en cáncer no es sencillo, sin embargo, porque TGF- β puede también potenciar el crecimiento y la metástasis tumorales.

A pesar de las múltiples funciones esenciales de TGF- β , una única dosis o administración a corto plazo de un anticuerpo neutralizante pan TGF- β se tolera bien. No se observan efectos secundarios en roedores a dosis que inhiben la fibrosis de órganos o el crecimiento y la metástasis de células de carcinoma. Este tratamiento también inhibe eficazmente la fibrosis experimental. Se están realizando ensayos clínicos de fase I/II de una única dosis usando anticuerpos neutralizantes pan TGF- β para carcinoma de células renales metastásicas, melanoma, glomeruloesclerosis segmental focal y fibrosis pulmonar idiopática (Genzyme Corporation, disponible en genzyme-clinicalresearch.com). Neurohr *et al* desvela un anticuerpo monoclonal murino bloqueante de $\alpha\beta$ 8 que aumenta significativamente el grado de cierre de heridas inhibiendo la activación de TGF- β (Am J Respir Cell Mol Biol, Vol 35, pp 252-259, 2006).

Breve resumen

Se proporcionan en el presente documento composiciones de anticuerpos que pueden usarse para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos asociados con actividad de TGF- β elevada mediada por $\alpha\beta$ 8. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo humanizado que se une específicamente con integrina $\alpha\beta$ 8, en el que el anticuerpo muestra liberación del péptido de TGF β activo, maduro, pero no inhibe significativamente la adhesión de TGF β latente con integrina $\alpha\beta$ 8 en una célula que expresa $\alpha\beta$ 8, y en el que el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9.

La divulgación también proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con $\alpha\beta 8$, en el que el anticuerpo aislado inhibe la liberación de péptido de TGF β maduro, activo, pero no inhibe significativamente la adhesión de TGF β latente con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$, y en el que el anticuerpo aislado se une con células que expresan $\alpha\beta 8$ fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina). El anticuerpo con estas actividades se denomina 11E8, término que incluye versiones con afinidad madurada, humanizadas, quiméricas y marcadas de los anticuerpos 11E8, así como fragmentos de unión a $\alpha\beta 8$ de los mismos. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado se une específicamente con un epítipo en $\beta 8$ que está dentro de SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 48, 49 y 50). En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 51, 52 y 53). En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 10 y las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada y las CDR de cadena ligera de 11E8Mut28. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la secuencia de cadena pesada y la secuencia de región variable de cadena ligera de 11E8Mut28. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada y las CDR de cadena ligera de 11E8Mut94. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la secuencia de región variable de cadena pesada y la secuencia de región variable de cadena ligera de 11E8Mut94. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada y las CDR de cadena ligera de 11E8Mut39. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la secuencia de región variable de cadena pesada y la secuencia de región variable de cadena ligera de 11E8Mut39. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado se une con el epítipo $\beta 8$ con alta afinidad, por ejemplo, con mayor afinidad que el anticuerpo anti $\alpha\beta 8$ 37E1, con una afinidad en el intervalo nanomolar o picomolar, o con una Kd de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menor. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado es de menos de 50 kD, menos de 25 kD o es un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv). En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti $\alpha\beta 8$ 37E1 o 37E1B5 compete con el anticuerpo 11E8 por la unión con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$. También se describe una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado descrito en el presente documento y un excipiente farmacéutico.

Se describe además un anticuerpo humanizado que se une específicamente con $\alpha\beta 8$, en el que el anticuerpo aislado inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro, pero no inhibe significativamente la adhesión de TGF β latente con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$. El anticuerpo con esta actividad se denomina h37E1B5 (37E1B5 humanizado o Hu37E1B5), término que se refiere a h37E1B5 marcado y fragmentos de unión a $\alpha\beta 8$ del mismo. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo humanizado se une específicamente con un epítipo en $\beta 8$ que está dentro de SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo humanizado se une con el epítipo $\beta 8$ con alta afinidad, por ejemplo, con mayor afinidad que el anticuerpo anti $\alpha\beta 8$ 37E1, con una afinidad en el intervalo nanomolar o picomolar, o con una kD de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menor. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado es de menos de 50 kD, menos de 25 kD o es un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv). En la invención, el anticuerpo humanizado tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento y un excipiente farmacéutico.

También se describen composiciones de anticuerpos que pueden usarse para el diagnóstico de trastornos asociados con actividad de TGF- β elevada mediada por $\alpha\beta 8$. En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con $\alpha\beta 8$, en el que el anticuerpo no inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro, o la adhesión de TGF β latente con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$, en el que el anticuerpo aislado se une con células o tejido que expresan $\alpha\beta 8$ fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina) y en el que el anticuerpo distingue los niveles de expresión de $\alpha\beta 8$ en la célula o el tejido (por ejemplo, el anticuerpo puede usarse para comparar niveles de expresión de $\alpha\beta 8$ en diferentes células). Los anticuerpos con estas actividades se denominan 6B9 y 4F1, que incluyen versiones de afinidad madurada, humanizadas, quiméricas y marcadas de los anticuerpos 6B9 y 4F1, así como fragmentos de unión a $\alpha\beta 8$ de los mismos. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado se une específicamente con un epítipo en $\beta 8$ que está dentro de SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos de la divulgación, el epítipo incluye S95 de $\beta 8$ humana, cuya secuencia de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 19. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 18 y las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 19. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 18. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 19. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 19. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena

pesada y las CDR de cadena ligera de 6B9Mut1. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la secuencia de región variable de cadena pesada y la secuencia de región variable de cadena ligera de 6B9Mut1. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 20 y las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 20 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado se une con el epítipo $\beta 8$ con alta afinidad, por ejemplo, con una afinidad en el intervalo nanomolar o picomolar, o con una kD de 10^{-7} , 10^{-1} , 10^{-9} o menor. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado es de menos de 50 kD , menos de 25 kD o es un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv). En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti $\alpha\beta 8$ 6B9 o 4F1 no compete con el anticuerpo 37E1, 37E1B5 o 11E8 por la unión con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$. También se describe una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos aislados descritos en el presente documento y un excipiente farmacéutico.

Se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado descrito anteriormente en el primer párrafo del sumario para su uso en un método para aliviar al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, una fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma de mama en un individuo que comprende administrar la composición al individuo.

Se proporcionan además métodos para diagnosticar un trastorno asociado a integrina $\alpha\beta 8$ en un individuo, que comprenden poner en contacto una célula del individuo con el anticuerpo descrito anteriormente en el primer párrafo del sumario *in vitro*, y detectar la unión del anticuerpo con la célula, en los que el trastorno asociado con integrina $\alpha\beta 8$ se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma de mama, y en los que la unión del anticuerpo con la célula indica que el individuo tiene el trastorno asociado con integrina $\alpha\beta 8$. En algunos aspectos de la divulgación, la célula está fijada. En algunos aspectos de la divulgación, el trastorno asociado con $\alpha\beta 8$ es EII, y la célula se obtiene del intestino (por ejemplo, colon o intestino) del individuo. En algunos aspectos de la divulgación, el trastorno asociado con $\alpha\beta 8$ es artritis y la célula es un condrocito o célula de cartílago del individuo. En algunos aspectos de la divulgación, el trastorno asociado con $\alpha\beta 8$ es fibrosis hepática, y la célula es una célula estrellada hepática del individuo. En algunos aspectos de la divulgación, el trastorno asociado con $\alpha\beta 8$ es asma, EPOC o fibrosis pulmonar, y la célula se obtiene de las vías respiratorias del individuo. En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende además administrar una composición farmacéutica (que comprende el anticuerpo 11E8, 37E1B5 o h37E1B5) al individuo.

Se describen además métodos para determinar el nivel relativo de expresión de $\alpha\beta 8$ en una célula de ensayo. En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende poner en contacto la célula de ensayo con un anticuerpo 6B9, detectar la unión del anticuerpo 6B9 con la célula de ensayo y comparar el nivel de unión del anticuerpo 6B9 con el de una célula de control, determinando de este modo el nivel relativo de expresión de $\alpha\beta 8$ en la célula de ensayo. En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende poner en contacto la célula de ensayo con un anticuerpo 4F1, detectar la unión del anticuerpo 4F1 con la célula de ensayo, y comparar el nivel de unión del anticuerpo 4F1 con el de una célula de control, determinando de este modo el nivel relativo de expresión de $\alpha\beta 8$ en la célula de ensayo. En algunas realizaciones, la célula de ensayo está fijada (por ejemplo, fijada en formalina). En algunos aspectos de la divulgación, la célula de control está fijada. En algunos aspectos de la divulgación, la célula de control es una célula no cancerosa, de tipo silvestre. En algunos aspectos de la divulgación, la célula de control es una célula sana (de un individuo que no padece un trastorno relacionado con $\alpha\beta 8$). En algunos aspectos de la divulgación, el nivel de expresión es indicativo del número de copias de $\beta 8$ genómicas en la célula, por ejemplo, de modo que un nivel de expresión relativo mayor que un control no canceroso indica que la célula de ensayo tiene un número de copias genómicas de $\beta 8$ aumentado. En algunos aspectos de la divulgación, la célula de ensayo está en una muestra biológica de un individuo (por ejemplo, una muestra líquida o tisular *in vitro*). En algunos aspectos de la divulgación, la célula de ensayo está *in situ* en el individuo. En algunos aspectos de la divulgación, el método comprende además diagnosticar al individuo un trastorno asociado con $\alpha\beta 8$ (como se describe en el presente documento) cuando la expresión de $\alpha\beta 8$ es mayor de lo normal en la célula de ensayo. Un experto entenderá que una célula de control puede ser de un individuo sano (por ejemplo, representativo de niveles de expresión normales) o puede ser un control positivo, por ejemplo, que se sabe que tiene expresión $\alpha\beta 8$ elevada o de un individuo con un trastorno asociado con $\alpha\beta 8$.

Adicionalmente se describe un anticuerpo aislado que se une específicamente con $\alpha\beta 8$, en el que dicho anticuerpo no inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro, o la adhesión de TGF β latente con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado se une específicamente con un epítipo en $\beta 8$ que está dentro de SEQ ID NO: 1. El anticuerpo con estas actividades se denomina 14E5, término que incluye versiones de afinidad madurada, humanizadas, quiméricas y marcadas de los anticuerpos 14E5, así como fragmentos de unión a $\alpha\beta 8$ de los mismos. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada mostradas en SEQ ID NO: 12 y las CDR de cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cadena pesada y las CDR de cadena ligera de un anticuerpo de afinidad madurada seleccionado del grupo que consiste en: 14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83 y 14E5Mut95. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 12 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende la secuencia de región variable de cadena pesada y la secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo de afinidad madurada seleccionado del grupo que consiste en: 14ESMut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83 y 14E5Mut95. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado se une con el epítipo $\beta 8$ con alta afinidad, por ejemplo, con mayor afinidad que el anticuerpo anti $\beta 8$ 37E1, con una afinidad en el intervalo nanomolar o picomolar, o con una kD de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menor. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo aislado es de menos de 50 kD, menos de 25 kD o es un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv). En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti $\alpha\beta 8$ 37E1 o 37E1B5 compite con el anticuerpo 14E5 por la unión con $\alpha\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha\beta 8$.

Se proporciona además el anticuerpo humanizado descrito en el primer párrafo del sumario para su uso en un método de diagnóstico de un trastorno asociado con integrina $\alpha\beta 8$ en un individuo, que comprende poner en contacto una célula del individuo con el anticuerpo *in vivo*, y detectar la unión del anticuerpo con la célula, en el que el trastorno asociado con integrina $\alpha\beta 8$ se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma de mama, y en el que la unión del anticuerpo con la célula indica que el individuo tiene el trastorno asociado con $\alpha\beta 8$.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el alineamiento de las regiones variables de cadena pesada y ligera para los anticuerpos 37E1, 37E1B5 y 37E1B5 humanizado. Se indican las secuencias de CDR y marco conservado.

La Figura 2 muestra la expresión de $\beta 8$ humana en células estrelladas hepáticas en ratones transgénicos para ITGB8. El panel superior muestra el control de isotipo, mientras que el panel inferior muestra la expresión de $\beta 8$, determinada usando el anticuerpo 14E5.

La Figura 3 muestra la expresión de $\beta 8$ en macrófagos alveolares pulmonares, células dendríticas, células del ganglio linfático mediastinal, linfocitos T y B y proporciona un sumario de datos de tinción en otros órganos. A) Macrófagos pulmonares: autofluorescente +, CD11Chi+, F480+, CD8+, CD11B-, Ly6G-, CD103-, Ly6C +/-, TCR-; B) Células dendríticas pulmonares: autofluorescente -, CD11C intermed+, F480 (principalmente negativo), CD8+, CD11B+, CD103-/, Ly6C +/-, TCR-, Ly6G-, GR-1- C) C) Linfocitos T pulmonares: TCR $\alpha\beta$ +, CD3+, B220-, Clase II-, CD19-, no autofluorescente; D) Linfocitos B de pulmón: TCR $\alpha\beta$ -, CD3-, B220+, Clase II+, CD19+, no autofluorescente; E) Células dendríticas de MLN: autofluorescente -, CD11C intermed+, CD11B+, MHC de clase II alto, F480-, Ly6C +/-, Ly6G- (probablemente CD8+, CD103+/-, GR-1+/-); F) Linfocitos B de MLN: TCR $\alpha\beta$ -, CD3-, B220+, Clase II+, CD19+, no autofluorescente; G) Tabla sumario de datos de tinción en múltiples órganos. Se realizó tinción usando el clon de hibridoma 14E5.

La Figura 4 muestra el efecto de la administración de 37E1B5 en el tamaño del intestino delgado (inflamación) en ratones BACtg.

La Figura 5 muestra una imagen de sección de intestino delgado de control (no tratado) y ratones BACtg tratados con 37E1B5.

La Figura 6 muestra que los anticuerpos 4F1 y 6B9 se unen específicamente con y tiñen células 293 fijadas en formalina que expresan $\beta 8$ (293 B8) pero no células 293 no transfectadas (293 WT). Los anticuerpos también tiñen secciones de cerebro fijadas en formalina de ratones transgénicos para integrina $\beta 8$ (ITGB8 BAC).

Figura 7: El clon de hibridoma 4F1 tiñe específicamente cerebros y pulmones incluidos en parafina fijados en formalina de ratones transgénicos (Tg) *ITGB8* BAC. Se fijaron cerebros o pulmones de ratones *ITGB8* BAC Tg o de tipo silvestre (WT) durante una noche en formalina tamponada al 10 % y se enviaron para procesamiento tisular, inclusión en parafina y corte. Se realizó inmunotinción usando la misma recuperación de antígeno por calor que antes, y se detectaron anticuerpos usando un kit comercial (Dako).

Figura 8: El clon de hibridoma 6B9 puede detectar una variación en el número de copias, como se muestra por inmunotinción de cerebro de ratón transgénico (Tg) *ITGB8* BAC incluido en parafina, fijado en formalina. Se muestran tres líneas de ratones Tg (B, C y D) en comparación con WT (panel inferior). Los números de copias son los siguientes: 1 copia (D—línea BAC/WT), 2 copias (B y C—línea BAC/WT; D—línea BAC/BAC) o 4 copias (B y C—línea BAC/BAC).

Figura 9: El IgG monoclonal recombinante de conejo derivado de los dominios variables del clon 4F1 puede detectar una variación en el número de copias, como se muestra por inmunotinción de pulmón de ratón transgénico (Tg) *ITGB8* BAC incluido en parafina fijado en formalina. Se muestran tres líneas de ratones Tg (B, C y D) en comparación con WT (panel inferior). Los números de copias son los siguientes: 1 copia (D—línea BAC/WT), 2 copias (B y C—línea BAC/WT; D—línea BAC/BAC) o 4 copias (B y C—línea BAC/BAC).

Figura 10: El IgG recombinante monoclonal de conejo derivado de los dominios variables del clon 4F1 puede detectar expresión de $\alpha\beta 8$ por inmunotinción de pulmón fibrótico humano incluido en parafina fijado en formalina. Las flechas indican tinción de células fusiformes, que representan fibroblastos incluidos en tejido conectivo fibroso denso.

Figuras 11A-B: secuencia variable de cadena pesada para una diversidad de anticuerpos descubiertos y posteriores variantes de afinidad madurada (con "Mut" en la designación). Los aminoácidos en negrita y subrayados indican cambios de las secuencias de región variable de cadena pesada del anticuerpo original ("wt").

Figuras 12A-B: secuencia variable de cadena ligera para una diversidad de anticuerpos descubiertos y posteriores variantes de afinidad madurada (con "Mut" en la designación). Los aminoácidos en negrita y subrayados indican cambios de las secuencias de región variable de cadena ligera del anticuerpo original ("wt").

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

El factor de crecimiento transformante β (TGF β) se caracterizó originalmente como un oncogén capaz de inducir un fenotipo transformado en células no neoplásicas. Se han caracterizado desde entonces varios miembros de la familia TGF β , basándose en la presencia de dominios de aminoácidos similares.

Algunas isoformas de TGF- β se expresan de forma ubicua en mamíferos (TGF- β 1-3), pero se mantienen en una forma inactiva por interacción no covalente con un propéptido, el dominio asociado con latencia de TGF- β (LAP). Para que TGF β señalice, debe liberarse de su complejo inactivo por un proceso denominado activación de TGF β . El complejo de TGF latente incluye 3 componentes: el dímero de TGF β activo (maduro), LAP (péptido asociado a latencia) y LTBP (proteína de unión a TGF β latente). LAP es un dímero, unido por un enlace disulfuro, que representa el extremo N terminal de la proteína precursora de TGF β . La proteína TGF β madura representa el extremo C terminal (aproximadamente 25 kD) del precursor. La unión entre los TGF β y LAP se escinde proteolíticamente dentro del Golgi, pero el propéptido de TGF- β permanece unido a TGF β por interacciones no covalentes. El complejo de TGF β y LAP se denomina complejo latente pequeño (SLC). Lo que confiere la latencia es la asociación de LAP y TGF β . La unión de LAP-TGF β es reversible y los componentes purificados aislados pueden recombinarse para formar un SLC inactivo. Tanto el SLC como el complejo mayor se denominan en el presente documento TGF β latente, ya que ambos están inactivos.

En general, las integrinas son moléculas de adhesión y median en la unión de células con proteínas de matriz extracelular. La integrina $\alpha\beta 8$ se une con el LAP de TGF- β y media en la activación de TGF- β 1 y 3 (Mu *et al.* (2002) J. Cell Biol. 159: 493). Se requiere activación de TGF- β mediada por integrina $\alpha\beta 8$ para la activación *in vivo* de TGF- β (es decir, liberación del polipéptido de TGF- β maduro), por lo tanto $\alpha\beta 8$ es un filtro de la función de TGF- β . La integrina $\alpha\beta 8$ se expresa en epitelios normales (por ejemplo, epitelios de las vías respiratorias), células mesenquimatosas y tejidos neuronales. Los resultados mostrados en el presente documento indican que la activación mediada por integrina $\alpha\beta 8$ de TGF- β puede dar como resultado EPOC, fibrosis pulmonar, artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, fibrosis hepática y renal, enfermedades autoinmunitarias inflamatorias cerebrales y enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, EM, mielitis transversal, enfermedad de Devic, síndrome de Guillain-Barré), neuroinflamación, enfermedad de riñón y crecimiento y metástasis de cáncer.

II. Definiciones

A no ser que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4ª ed. 2007); Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Puede usarse en la práctica de la presente invención cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de ciertos términos usados frecuentemente en el presente documento y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

Las expresiones “anticuerpo anti $\alpha\beta 8$ ”, “anticuerpo específico de $\alpha\beta 38$ ”, “anticuerpo de $\alpha\beta 8$ ” y “anti $\alpha\beta 8$ ” se usan de forma sinónima en el presente documento para hacer referencia a un anticuerpo que se une específicamente con $\alpha\beta 8$. De forma similar, un anticuerpo anti $\beta 8$ (y términos similares) se refiere a un anticuerpo que se une específicamente con $\beta 8$. Los anticuerpos anti $\alpha\beta 8$ y anticuerpos anti $\beta 8$ descritos en el presente documento se unen con la proteína expresada en células que expresan $\alpha\beta 8$.

Una célula fijada es una que se ha tratado para inhibir el metabolismo celular y conservar la célula para caracterización. La fijación se practica habitualmente en la técnica, por ejemplo, para observar características citológicas por histología, o para observar expresión de marcadores de superficie celular por inmunotinción y/o citometría de flujo. Un experto entenderá que una célula puede fijarse en cualquiera de varias soluciones de fijación conocidas que comprenden, por ejemplo, formalina, formaldehído, paraformaldehído, metanol, acetona, etc. Los tejidos pueden fijarse de una manera similar.

Un trastorno asociado con $\alpha\beta 8$ es una afección caracterizada por la presencia de células que expresan $\alpha\beta 8$, bien células que expresan un nivel aumentado de $\alpha\beta 8$, o bien un número aumentado de células que expresan $\alpha\beta 8$ en relación con un control normal, no enfermo. Los trastornos asociados con TGF β (trastornos caracterizados por actividad de TGF β mayor de lo normal) incluyen trastornos asociados con $\alpha\beta 8$, ya que $\alpha\beta 8$ está implicada en la activación de TGF β en ciertas circunstancias, como se describe en el presente documento.

“Ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria, y complementos de los mismos. El término “polinucleótido” se refiere a una secuencia lineal de nucleótidos. El término “nucleótido” se refiere típicamente a una única unidad de un polinucleótido, es decir, un monómero. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o versiones modificadas de los mismos. Los ejemplos de polinucleótidos contemplados en el presente documento incluyen ADN mono y bicatenario, ARN mono y bicatenario (incluyendo ARNip) y moléculas híbridas que tienen mezclas de ADN y ARN mono y bicatenario.

Las palabras “complementario” o “complementariedad” se refieren a la capacidad de un ácido nucleico en un polinucleótido para formar un par de bases con otro ácido nucleico en un segundo polinucleótido. Por ejemplo, la secuencia A-G-T es complementaria de la secuencia T-C-A. La complementariedad puede ser parcial, en la que solamente algunos de los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con la formación de pares de bases, o completa, en la que los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con la formación de pares de bases.

Los expertos en la materia conocen una diversidad de métodos de mediciones de ADN y ARN específicas que usan técnicas de hibridación de ácido nucleico (véase, Sambrook, misma referencia). Algunos métodos implican la separación electroforética (por ejemplo, transferencia de Southern para detectar ADN y transferencia de Northern para detectar ARN), pero la medición de ADN y ARN también puede llevarse a cabo en ausencia de separación electroforética (por ejemplo, PCR cuantitativa, transferencia puntual o matriz).

Las palabras “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan indistintamente para indicar un polímero de aminoácidos o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácidos unidos o que interaccionan. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural, los que contienen restos modificados y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúa de forma similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento por sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o por los símbolos de una letra recomendados por la comisión de nomenclatura bioquímica de IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de forma similar, pueden denominarse por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

5 “Variantes modificadas de forma conservativa” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo, contiguas de forma natural. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifique una alanina, el codón puede alterarse a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añadan o supriman un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia modificada son una “variante modificada de forma conservativa” cuando la alteración dé como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de forma conservativa son además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención. Los siguientes aminoácidos son sustituciones típicamente conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

35 Las expresiones “idénticos” o “porcentaje de identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o dos o más polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos, o aminoácidos, que son iguales (es decir, aproximadamente 60 % de identidad, preferentemente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad sobre una región específica, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región designada) como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto, o por alineamiento manual e inspección visual. Véase por ejemplo, el sitio web del NCBI en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Se dice entonces que dichas secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de ensayo de nucleótidos. La definición también incluye secuencias que tienen supresiones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones. Como se describe posteriormente, los algoritmos pueden tener en cuenta huecos y similares. Típicamente, existe identidad sobre una región que comprende un epítipo de anticuerpo, o una secuencia que es de al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o sobre una región que es de 50-100 aminoácidos o nucleótidos en longitud, o sobre la longitud completa de la secuencia de referencia.

50 El término “recombinante” cuando se usa en referencia a, por ejemplo, una célula, o un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o una proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína nativos, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de forma anómala, se expresan poco o no se expresan en absoluto.

El término “heterólogo” cuando se usa en referencia a partes de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, y tiene dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para crear un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, como una proteína de fusión).

65 El término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región marco conservada de un gen de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que se une específicamente con y reconoce un antígeno, por ejemplo, β 8,

un marcador de superficie celular particular, o cualquier diana deseada. Típicamente, la “región variable” contiene la región de unión a antígeno del anticuerpo (o su equivalente funcional) y es más crítica en la especificidad y afinidad de unión. Véase Paul, *Fundamental Immunology* (2003).

5 Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables de reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente.

10 Un “isotipo” es una clase de anticuerpos definida por la región constante de cadena pesada. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de isotipo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

15 Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como cualquiera de una variedad de fragmentos bien caracterizados que incluye actividad de unión a antígeno específica. Dichos fragmentos pueden producirse por digestión con diversas peptidasas. La pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida con V_H - C_{H1} por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993)). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen con respecto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* bien químicamente o bien usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos, o los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario) o los identificados usando bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990)).

20 Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a una preparación clonal de anticuerpos con una única especificidad y afinidad de unión por un epítipo dado en un antígeno. Un “anticuerpo policlonal” se refiere a una preparación de anticuerpos que se inducen contra un único antígeno, pero con diferentes especificidades y afinidades de unión.

25 Como se usa en el presente documento, “región V” se refiere a un dominio de región variable de anticuerpo que comprende los segmentos de marco conservado 1, CDR1, marco conservado 2, CDR2, marco conservado 3, CDR3 y marco conservado 4. Estos segmentos se incluyen en el segmento V como consecuencia de la reordenación de los genes de región V de cadena pesada y cadena ligera durante la diferenciación de células B.

30 Como se usa en el presente documento, “región determinante de complementariedad (CDR)” se refiere a las tres regiones hipervariables en cada cadena que interrumpen las cuatro regiones “marco conservadas” establecidas por las regiones de cadena ligera y pesada. Las CDR son principalmente responsables de la unión con un epítipo de un anticuerpo. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del extremo N terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por tanto, una CDR3 V_H está localizada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

35 Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco conservada de un anticuerpo, es decir las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para situar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.

40 Las secuencias de aminoácidos de las CDR y regiones marco conservadas pueden determinarse usando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y AbM (véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, mencionado anteriormente; Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342, 877-883; Chothia *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 799-817; Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4)). También se describen definiciones de sitios de combinación de antígenos en las siguientes: Ruiz *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000); y Lefranc *Nucleic Acids Res.* Jan 1;29(1):207-9 (2001); MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996); y Martin *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin, *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203: 121-153, (1991); Pedersen *et al.*, *Immunomethods*, 1, 126, (1992); y Rees *et al.*, In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172 1996).

45 Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable, CDR o parte de la

misma) esté unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, (por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.); o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada (por ejemplo, regiones CDR y marco conservadas de diferentes especies).

El anticuerpo se une con un "epítipo" en el antígeno. El epítipo es el sitio de interacción de unión a anticuerpo específico en el antígeno y puede incluir varios aminoácidos o partes de varios aminoácidos, por ejemplo, 5 o 6, o más, por ejemplo, 20 o más aminoácidos, o parte de esos aminoácidos. En algunos casos, el epítipo incluye componentes no proteicos, por ejemplo, de un carbohidrato, ácido nucleico o lípido. En algunos casos, el epítipo es un resto tridimensional. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la diana es una proteína, el epítipo puede estar comprendido por aminoácidos consecutivos, o aminoácidos de diferentes partes de la proteína que se ponen en proximidad por plegamiento proteico (por ejemplo, un epítipo discontinuo). Lo mismo sucede para otros tipos de moléculas diana que forman estructuras tridimensionales.

La expresión "se une específicamente" se refiere a una molécula (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une con una diana con una afinidad al menos 2 veces mayor que compuestos no diana, por ejemplo, al menos 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces mayor afinidad. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con $\beta 8$ se unirá típicamente con $\beta 8$ con al menos una afinidad 2 veces mayor que una diana no $\beta 8$ (por ejemplo, una subunidad de integrina diferente, por ejemplo, $\beta 6$).

El término "se une" con respecto a un tipo celular (por ejemplo, un anticuerpo que se une con células fibróticas, hepatocitos, condrocitos, etc.), típicamente indica que un agente se une con una mayoría de las células en una población pura de esas células. Por ejemplo, un anticuerpo que se une con un tipo celular dado típicamente se une con al menos 2/3 de las células en una población de las células indicadas (por ejemplo, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %). Un experto en la materia reconocerá que surgirá algo de variabilidad dependiendo del método y/o umbral de determinación de la unión.

Como se usa en el presente documento, un primer anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, "compite" por la unión con una diana con un segundo anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, en el que la unión del segundo anticuerpo con la diana se reduce de forma detectable en presencia del primer anticuerpo en comparación con la unión del segundo anticuerpo en ausencia del primer anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del primer anticuerpo con la diana también se reduce de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo, puede suceder, aunque no es necesaria. Es decir, un segundo anticuerpo puede inhibir la unión de un primer anticuerpo con la diana sin que ese primer anticuerpo inhiba la unión del segundo anticuerpo con la diana. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando afín, en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de su epítipo o sus epítipos respectivos. La presente invención abarca anticuerpos tanto competidores como competidores cruzados. El término anticuerpo "competidor" puede aplicarse al primer o segundo anticuerpo como puede determinar un experto en la materia. En algunos casos, la presencia del anticuerpo competidor (por ejemplo, el primer anticuerpo) reduce la unión del segundo anticuerpo con la diana en al menos 10 %, por ejemplo, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más, por ejemplo, de modo que la unión del segundo anticuerpo con la diana sea indetectable en presencia del primer anticuerpo (competidor).

La expresión "expresado diferencialmente" o "regulado diferencialmente" se refiere en general a un marcador de proteína o ácido nucleico que está sobreexpresado (regulado positivamente) o infraexpresado (regulado negativamente) en una muestra en comparación con al menos otra muestra. En el contexto de la presente invención, la expresión se refiere en general a sobreexpresión de un biomarcador (por ejemplo, $\alpha\beta 8$) en una célula enferma en comparación con una célula normal.

Por ejemplo, las expresiones "sobreexpresado" o "regulado positivamente" se refieren indistintamente a una proteína o un ácido nucleico, en general un biomarcador, que se transcribe o traduce a un nivel detectablemente mayor que el de control. La expresión incluye sobreexpresión debida a transcripción, procesamiento postranscripcional, traducción, procesamiento postraduccional, localización celular (por ejemplo, orgánulo, citoplasma, núcleo, superficie celular) y estabilidad de ARN y proteína. La sobreexpresión puede detectarse usando técnicas convencionales para detectar biomarcadores, bien ARNm (es decir RT-PCR, hibridación) o bien proteína (es decir, citometría de flujo, captura de imágenes, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La sobreexpresión puede ser 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en comparación con una célula normal.

Los términos "agonista", "activador", "inductor" y términos similares se refieren a moléculas que aumentan la actividad o expresión en comparación con un control. Los agonistas son agentes que, por ejemplo, se unen con, estimulan, aumentan, activan, potencian la activación, sensibilizan o regulan positivamente la actividad de la diana. La expresión o actividad puede aumentarse 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 100 % o más que la de un control. En ciertos casos, la activación es 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más en comparación con un control.

Las expresiones “inhibidor”, “represor” o “antagonista” o “regulador negativo” se refieren indistintamente a una sustancia que da como resultado una expresión o un nivel de actividad detectablemente menor en comparación con un control. La expresión o actividad inhibida puede ser 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o menos que la de un control. En ciertos casos, la inhibición es 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más en comparación con un control.

Una muestra o un valor de “control” se refiere a una muestra que actúa como una referencia, habitualmente una referencia conocida, para comparación con una muestra de ensayo. Por ejemplo, puede tomarse una muestra de ensayo de una condición de ensayo, por ejemplo, en presencia de un compuesto de ensayo, y compararse con muestras de condiciones conocidas, por ejemplo, en ausencia del compuesto de ensayo (control negativo) o en presencia de un compuesto conocido (control positivo). Un control también puede representar un valor promedio reunido a partir de varios ensayos o resultados. Un experto en la materia reconocerá que los controles pueden diseñarse para evaluación de cualquier número de parámetros. Por ejemplo, puede idearse un control para comparar el beneficio terapéutico basándose en datos farmacológicos (por ejemplo, semivida) o medidas terapéuticas (por ejemplo, comparación de beneficio y/o efectos secundarios). Pueden diseñarse controles para aplicaciones *in vitro*. Un experto en la materia entenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos basándose en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la significación de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado son ampliamente variantes en controles, la variación en muestras de ensayo no se considerará significativa.

Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, químicos u otros físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos electrón densos, enzimas (por ejemplo, como se usa habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas u otras entidades que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en un péptido o anticuerpo reactivo específicamente con un péptido diana. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar un anticuerpo con el marcador, por ejemplo, usando métodos descritos en Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

Una molécula “marcada” (por ejemplo, ácido nucleico, proteína o anticuerpo) es una que está unida, covalentemente, mediante un enlazador o un enlace químico, o no covalentemente, mediante enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno con un marcador de modo que la presencia de la molécula puede detectarse detectando la presencia del marcador unido a la molécula.

El término “diagnóstico” se refiere a una probabilidad relativa de que un trastorno tal como cáncer o una afección inflamatoria esté presente en el sujeto. De forma similar, el término “pronóstico” se refiere a una probabilidad relativa de que pueda producirse en el sujeto un cierto resultado futuro. Por ejemplo, el pronóstico puede referirse a la probabilidad de que un individuo desarrolle un trastorno asociado a TGF- β o $\alpha\text{v}\beta 3$, tenga reaparición, o la gravedad probable de la enfermedad (por ejemplo, la gravedad de los síntomas, tasa de degradación funcional, supervivencia, etc.). No se pretende que los términos sean absolutos, como apreciará cualquier experto habitual en el campo del diagnóstico médico.

“Biopsia” o “muestra biológica de un paciente” como se usa en el presente documento se refiere a una muestra obtenida de un paciente que tiene, o se sospecha que tiene, un trastorno asociado a TGF β o $\alpha\text{v}\beta 3$. En algunos aspectos, la muestra puede ser una biopsia tisular, tal como biopsia de aguja, biopsia de aguja fina, biopsia quirúrgica, etc. La muestra también puede ser una muestra de sangre o fracción de sangre, por ejemplo, fracción de glóbulos blancos, suero o plasma. La muestra puede comprender una muestra tisular que alberga una lesión o lesión sospechada, aunque la muestra biológica también puede derivar de otro sitio, por ejemplo, un sitio de metástasis sospechada, un ganglio linfático o de la sangre. En algunos casos, la muestra biológica también puede ser de una región adyacente a la lesión o lesión sospechada.

Una “muestra biológica” puede obtenerse de un paciente, por ejemplo, una biopsia, de un animal, tal como un modelo animal, o de células cultivadas, por ejemplo, una línea celular o células retiradas de un paciente y que se han dejado crecer en cultivo para observación. Las muestras biológicas incluyen tejidos y fluidos corporales, por ejemplo, sangre, fracciones sanguíneas, linfa, saliva, orina, heces, etc.

Los términos “terapia”, “tratamiento” y “alivio” se refieren a cualquier reducción en la gravedad de los síntomas. En el caso de tratar una afección inflamatoria, el tratamiento puede referirse a reducir, por ejemplo, los niveles en sangre de citocinas inflamatorias, niveles en sangre de TGF- β activo maduro, dolor, hinchazón, reclutamiento de células inmunitarias, etc. En el caso de tratamiento del cáncer, el tratamiento puede referirse a reducir, por ejemplo, el tamaño tumoral, el número de células cancerosas, la tasa de crecimiento, la actividad metastásica, la muerte celular de células no cancerosas, etc. Como se usa en el presente documento, los términos “tratar” y “prevenir” no pretenden ser términos absolutos. El tratamiento y la prevención pueden referirse a cualquier retardo de la aparición, alivio de los síntomas, mejora de la supervivencia del paciente, aumento del tiempo o tasa de supervivencia, etc. El tratamiento y la prevención pueden ser completos (sin síntomas detectables restantes) o parciales, de modo que los síntomas sean menos frecuentes o graves que en un paciente sin el tratamiento descrito en el presente documento. El efecto del tratamiento puede compararse con un individuo o grupo de individuos que no reciben el tratamiento, o

con el mismo paciente antes del tratamiento o en un momento diferente durante el tratamiento. En algunos aspectos, la gravedad de la enfermedad se reduce en al menos 10 %, en comparación, por ejemplo, con el individuo antes de la administración, o con un individuo de control que no se somete a tratamiento. En algunos aspectos la gravedad de la enfermedad se reduce en al menos 25 %, 50 %, 75 %, 80 % o 90 %, o en algunos casos, ya no es detectable usando técnicas de diagnóstico convencionales.

Las expresiones “cantidad eficaz”, “dosis eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz”, etc. se refieren a la cantidad del agente terapéutico suficiente para aliviar un trastorno, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, para el parámetro dado, una cantidad terapéuticamente eficaz mostrará un aumento o una reducción del efecto terapéutico al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 % o al menos 100 %. La eficacia terapéutica también puede expresarse como aumento o reducción en “veces”. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede tener un efecto de al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces o más efecto sobre un control.

Como se usa en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” se usa de forma sinónima con fisiológicamente aceptable y farmacológicamente aceptable. Una composición farmacéutica comprenderá en general agentes para tamponar y conservar el almacenamiento, y puede incluir tampones y vehículos para suministro apropiado, dependiendo de la vía de administración.

Los términos “dosis” y “dosificación” se usan indistintamente en el presente documento. Una dosis se refiere a la cantidad de principio activo proporcionado a un individuo en cada administración. Para la presente invención, la dosis puede referirse a la concentración del anticuerpo o componentes asociados, por ejemplo, la cantidad de agente terapéutico o dosificación de radiomarcador. La dosis variará dependiendo de varios factores, incluyendo frecuencia de administración; tamaño y tolerancia del individuo; gravedad de la afección; riesgo de efectos secundarios; la vía de administración; y la modalidad de captura de imágenes del resto detectable (si está presente). Un experto en la materia reconocerá que la dosis puede modificarse dependiendo de los factores anteriores o basándose en el progreso terapéutico. La expresión “forma de dosificación” se refiere al formato particular del producto farmacéutico, y depende de la vía de administración. Por ejemplo, una forma de dosificación puede estar en un líquido, por ejemplo, una solución salina para inyección.

“Sujeto”, “paciente”, “individuo” y términos similares se usan indistintamente y se refieren a, excepto cuando se indique, mamíferos tales como seres humanos y primates no humanos, así como conejos, ratas, ratones, cabras, cerdos y otras especies de mamíferos. El término no indica necesariamente que se haya diagnosticado al sujeto una enfermedad particular, sino que se refiere típicamente a un individuo que está en supervisión médica. Un paciente puede ser un individuo que busca tratamiento, supervisión, ajuste o modificación de un régimen terapéutico existente, etc.

Una “afección inflamatoria” se refiere a cualquier inflamación en un individuo y puede ser transitoria (por ejemplo, en respuesta a exposición a un patógeno o alérgeno) o crónica. La inflamación se caracteriza por citocinas inflamatorias tales como IFN-gamma, IL-6 y TNF-alfa que recluten y activen macrófagos y otros leucocitos. En algunos casos, la inflamación puede desarrollarse a una afección crónica, perjudicial o afección autoinmunitaria (por ejemplo, EM, lupus, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn). La inflamación puede ser evidente localmente (por ejemplo, en un sitio localizado de infección o exposición) o sistémicamente (por ejemplo, aterosclerosis, alta presión sanguínea). En algunos aspectos, las composiciones de anticuerpo y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar afecciones inflamatorias.

“Cáncer”, “tumor”, “transformadas” y términos similares incluyen células precancerosas, neoplásicas, transformadas y cancerosas, y pueden referirse a un tumor sólido o un cáncer no sólido (véase, por ejemplo, Edge *et al.* AJCC Cancer Staging Manual (7^a ed. 2009); Cibas y Ducatman Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates (3^a ed. 2009)). El cáncer incluye neoplasias tanto benignas como malignas (crecimiento anómalo). La “transformación” se refiere a cambios fenotípicos espontáneos o inducidos, por ejemplo, inmortalización de células, cambios morfológicos, crecimiento celular aberrante, inhibición del contacto y anclaje reducidos y/o malignidad (véase, Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (3^a ed. 1994)). Aunque la transformación puede surgir de infección con un virus transformante e incorporación de un nuevo ADN genómico, o captación de ADN exógeno, también puede surgir de forma espontánea o después de exposición a un carcinógeno.

El término “cáncer” puede referirse a carcinomas, sarcomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias, cánceres sólidos y linfoides, etc. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no microcíticas o NSCLC), cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de hígado (es decir, hepatocarcinoma), cáncer renal (es decir, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer pleural, cáncer pancreático, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer testicular, cáncer anal, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer esofágico, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del apéndice, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinoma; cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la sangre, sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, linfoma de linfocitos B, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, Linfoma microcítico, Linfoma de Células Grandes,

leucemia monocítica, leucemia mielógena, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y mieloma múltiple. En algunos aspectos, las composiciones de anticuerpos y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar el cáncer.

5 III. Anticuerpos específicos para $\alpha\nu\beta 8$

A. 37E1B5 humanizado

10 El anticuerpo monoclonal de ratón 37E1 (IgG2a) bloquea selectivamente la interacción de la integrina $\alpha\nu\beta 8$ humana con su ligando, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). El anticuerpo está definido porque bloquea de forma selectiva la activación mediada por $\alpha\nu\beta 8$ de TGF- β (liberación del polipéptido de TGF- β maduro), pero no evita la unión de $\alpha\nu\beta 8$ con TGF- β inmovilizado o secretado. Esto permite un alto grado de selectividad en la perturbación de solamente la activación de TGF- β , no las propiedades de adhesión celular de $\alpha\nu\beta 8$. Además, la inactivación sistémica de TGF- β es indeseable en algunos casos. La actividad específica del anticuerpo 37E1 proporciona una
15 herramienta terapéutica dirigida para reducción de los niveles de TGF- β .

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de 37E1 se refinaron para preparar un anticuerpo de mayor afinidad. La Figura 1 muestra las sustituciones de aminoácidos específicas que confieren mayor afinidad para el mismo epítipo en $\beta 8$. El anticuerpo mejorado (mayor afinidad) se denominó 37E1B5. Muestra afinidad aumentada *in vitro* y eficacia más fuerte en la inhibición de la activación mediada por integrina $\alpha\nu\beta 8$ de TGF- β en células cultivadas. La dosis terapéutica eficaz del anticuerpo 37E1B5 *in vitro* está en el intervalo picomolar. Se ha generado una versión humanizada de 37E1B5, que conserva la unión de alta afinidad de $\beta 8$, como se muestra en la Figura 1. Como con los anticuerpos parentales 37E1 y 37E1B5, el 37E1B5 humanizado bloquea la activación mediada por $\alpha\nu\beta 8$ de TGF- β , pero no evita la unión de $\alpha\nu\beta 8$ con TGF- β inmovilizado o secretado.
20

En consecuencia, se describen anticuerpos que tienen CDR 1-3 de cadena pesada como se encuentra en las secuencias de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 4, 6 y 8. Las secuencias de CDR 1-3 de cadena pesada son RYWMS (SEQ ID NO: 94), EINPDSSTINYTSSLKD (SEQ ID NO: 95) y LITTEDY (SEQ ID NO: 96), respectivamente. Se describen además anticuerpos que tienen CDR 1-3 de cadena ligera como se encuentran en la secuencia de cadena ligera variable SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 y 9. Las secuencias de CDR 1-3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 son KASQDINSYL (SEQ ID NO: 97), RANRLVD (SEQ ID NO: 98) y LQYDFPYPY (SEQ ID NO: 99). Las secuencias de región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 7 y 9 tienen las mismas secuencias de CDR1 y CDR3 que SEQ ID NO: 5, pero difieren en CDR2 (YANRLVD, SEQ ID NO: 100).
25

35 En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan anticuerpos que comprenden:

una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 95 y 96, una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 97, 98 y 99;

40 una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 94, 95 y 96, y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 97, 100 y 99; o

45 una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 6 y 8 y una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 7 y 9, en cualquier combinación.

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9.

50 B. 11E8

El anticuerpo 11E8 se une con un epítipo similar en $\alpha\nu\beta 8$ a 37E1B5, pero también se une con células fijadas (por ejemplo, fijadas con formalina). De forma más similar a 37E1B5, 11E8 se une específicamente con $\alpha\nu\beta 8$, e inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro, sin inhibir la adhesión de TGF β latente con $\alpha\nu\beta 8$. Debido a que 11E8
55 puede unirse con $\alpha\nu\beta 8$ en células tanto no fijadas como fijadas con formalina, y puede reducir la liberación de TGF β maduro, 11E8 es útil para la detección (por ejemplo, diagnóstico o supervisión), terapia y aplicaciones combinadas de detección/terapéuticas.

Las reacciones variables de cadena pesada y ligera (con las CDR subrayadas) para el anticuerpo 11E8 se exponen a continuación:
60

SEQ ID NO: 10 – Región variable de cadena pesada para 11E8 (las CDR 1-3 están subrayadas; SEQ ID NO: 48-50, respectivamente)

EVQLQQSGPELMKGTGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGDILPGSGTTNYNEKFKGRATVTADRSSN
TAYMQLSSLTYGDSAVYYCATWGWDTYWDQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 11 – Región variable de cadena ligera para 11E8 (las CDR 1-3 están subrayadas; SEQ ID NO: 51-53, respectivamente)

DIVMTQSPSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDYSLTISN
LEPEDIATYYCQQYSNLPYTFGGGTKLEIKR

En consecuencia, los anticuerpos que se describen comprenden CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 48, 49 y 50, y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 51, 52 y 53. En algunos aspectos de la divulgación, los anticuerpos comprenden la región variable de cadena pesada SEQ ID NO: 10 y/o la región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 11.

Como se muestra en las Figuras 11A-B y 12A-B, se han descubierto anticuerpos de afinidad madurada de 11E8 y se designan 11E8Mut28, 11E8Mut94 y 11E839.

El anticuerpo de afinidad madurada 11E8Mut28 tiene un cambio en la CDR3 de cadena pesada WGWDSY; SEQ ID NO: 54) y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQFSNLPYT; SEQ ID NO: 55). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden:

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 48, 49 y 54 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 51, 52 y 53; o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 48, 49 y 50 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 51, 52 y 55; o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 48, 49 y 54 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 51, 52 y 55.

11E8Mut28 también tiene cambios en la FR3 de cadena pesada (KAAITADTSSNTSYLQLSLTSEDSAVYYCAR; SEQ ID NO: 56) y FR4 de cadena pesada (WGQGTLVTVSS; SEQ ID NO: 57). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 56 o 57 (por ejemplo, SEQ ID NO: 32), y opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 23.

El anticuerpo de afinidad madurada 11E8Mut94 tiene un cambio en las CDR2 y CDR de cadena pesada (DILPGSGTTNYNEKFEG, SEQ ID NO: 90 y WGWDSY, SEQ ID NO: 54, respectivamente). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden:

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 48, 90 y 54 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 51, 52 y 53.

11smut94 también tiene cambios en FR2 de cadena pesada (WVKQRPGHGFEWIG, SEQ ID NO: 91), FR3 de cadena pesada (RAAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR, SEQ ID NO: 92) y FR4 de cadena pesada (WGQGTLVTVSS; SEQ ID NO: 57). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 91, 92 o 57 (por ejemplo, SEQ ID NO: 88), y opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 89. 11smut94 también tiene cambios en la FR1 de cadena ligera (DIKMTQTPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 93). En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, por ejemplo, SEQ ID NO: 89, y opcionalmente una cadena pesada de SEQ ID NO: 88.

El anticuerpo de afinidad madurada 11E8Mut39 tiene un cambio en la CDR1 de cadena pesada (TYWIE; SEQ ID NO: 112), CDR2 de cadena pesada (HTLPGSGTTNYNEKFKG; SEQ ID NO: 113), CDR1 de cadena ligera (STSQDVSSYLN; SEQ ID NO: 105) y CDR2 de cadena ligera (YASNLHS; SEQ ID NO: 107). Por consiguiente, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden:

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 112, 113 y 50 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 51, 52 y 53;

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 48, 49 y 50, y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 105, 107 y 53; o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 112, 113, 50, y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 105, 107 y 53.

11smut39 también tiene cambios en la FR1 de cadena pesada (QVQLQQSGPELMKGTGASVKISCKATGYTFS; SEQ ID NO: 106), FR3 de cadena pesada (RATITADRPSNTSYMQLSSLTYGDSAVEYCAT; SEQ ID NO: 114) y FR4 de cadena pesada (WDHGTSVTVSS; SEQ ID NO: 108). 11E8Mut39 tiene cambios en la FR1 de cadena ligera (DIMMTQTPSSLSASLGDRVTISC; SEQ ID NO: 115) y FR4 de cadena ligera (FGGGTKLEIKA; SEQ ID NO: 111). Por tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 106, 114 o 108 (por ejemplo, SEQ ID NO: 102), y opcionalmente una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 104. En algunos aspectos, los anticuerpos tienen una región variable de cadena ligera

que comprende SEQ ID NO: 115 o 111 (por ejemplo, SEQ ID NO: 104), y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 102.

C. 14E5

El anticuerpo 14E5 se une con un epítipo similar en $\alpha\beta$ 8 a 37E1B5. Como 37E1B5, 14E5 se une específicamente con $\alpha\beta$ 8 pero a diferencia de 37E1B5, 14E5 no inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro, o la adhesión de TGF β latente con $\alpha\beta$ 8. Debido a que 14E5 es específico para $\alpha\beta$ 8, pero no bloquea la actividad, es útil para la detección, por ejemplo, aplicaciones de diagnóstico o supervisión *in vivo*.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera (con las CDR subrayadas) para el anticuerpo 14E5 se exponen a continuación:

SEQ ID NO: 12 – Región variable de cadena pesada para 14E5 (las CDR 1-3 están subrayadas; SEQ ID NO: 58-60, respectivamente)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWIKQRP^{GH}GLEWIGHILPGSVITNYNEKFKGKAAITADTSSN
TSYMQLS^{SL}TS^{ED}SAVYYCARW^{GW}DSYWGQGT^{LV}TVSS

SEQ ID NO: 13 – Región variable de cadena ligera para 14E5 (las CDR 1-3 están subrayadas; SEQ ID NO: 61-63, respectivamente)

DIEMTQSPSSLSASLGDRVTISCST^{SQ}DISS^{LN}WYQ^{QK}PDGTVTL^{LI}YY^{TS}NLHSGVPSR^{FG}SGSG^{SD}T^{DY}SLT^{IS}N
LEPEDIATYYC^QQY^{SK}LPY^{TF}GGG^{TK}LEIKR

En consecuencia, se describen anticuerpos que comprenden las CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y las CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 61, 62 y 63. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden la región variable de cadena pesada SEQ ID NO: 12 y/o la región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 13.

Como se muestra en las Figuras 11A-B y 12A-B, se han descubierto siete anticuerpos de afinidad madurada de 14E5, designados 14ESMut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83 y 14E5Mut95. Estos anticuerpos de afinidad madurada tienen cambios en la secuencia de CDR y FR como se expone posteriormente. En algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden CDR y FR de 14E5 y las formas de afinidad madurada de 14E5 en diversas combinaciones.

14E5Mut11 tiene un cambio en la CDR1 de cadena pesada (TNWIE, SEQ ID NO: 64), un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISKYLN, SEQ ID NO: 65), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO: 66), y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQYSNLPYT, SEQ ID NO: 67). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut11, por ejemplo:

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 64, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 61, 62 y 63; o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 65, 66 y 67; o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 64, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 65, 66 y 67.

14E5Mut11 también tiene cambios en las FR1 y FR2 de cadena ligera (DILMTQSPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 68 y WYQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 24), y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33.

14E5Mut42 también tiene un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISNYLN, SEQ ID NO: 70), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO: 66), y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQYSDLPYT, SEQ ID NO: 71). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut42, por ejemplo:

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 71.

14E5Mut42 también tiene cambios en la FR1 de cadena pesada (EVPLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFS, SEQ ID NO: 72), FR1 y FR2 de cadena ligera (DIVMTQTPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 73 y WYQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 72 (por ejemplo, SEQ ID NO: 34), opcionalmente con una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 25. En algunos aspectos, los anticuerpos

ES 2 643 397 T3

comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 73 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 25) y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 34.

5 14E5Mut54 tiene un cambio en la CDR1 de cadena pesada (TNWIE, SEQ ID NO: 64), un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISNYLN, SEQ ID NO: 70), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO: 66) y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQYSNLPYT, SEQ ID NO: 67). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut54, por ejemplo:

10 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 64, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 61, 62 y 63, o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 67; o

15 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 64, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 67.

14E5Mut54 también tiene cambios en la FR3 de cadena pesada (KAAITADTSSNTSYMQLTSLTSEDSAVYYCAR, SEQ ID NO: 74) y en FR1 y FR2 de cadena ligera (DILMTQTPSSLSASLGDRVTIRC, SEQ ID NO: 75 y WYQQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 74 (por ejemplo, SEQ ID NO: 35), opcionalmente con una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 26. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 75 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26) y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 35.

25 14E5Mut68 tiene un cambio en la CDR2 de cadena pesada (DILPGSGTTNYNEKFKG, SEQ ID NO: 76), un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISNYLN, SEQ ID NO: 70), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO: 66), y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQYSELPYT, SEQ ID NO: 77). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut68, por ejemplo:

30 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 76 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 61, 62 y 63, o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 67; o

35 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 76 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 77.

14E5Mut68 también tiene cambios en la FR3 de cadena pesada (RATVTADRSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR, SEQ ID NO: 78) y en FR1 y FR2 de cadena ligera (DIKMTQSPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 79 y WYQQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 78 (por ejemplo, SEQ ID NO: 36), opcionalmente con una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 27. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 79 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 27) y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 36.

45 14E5Mut65 tiene un cambio en la CDR1 de cadena pesada (TNWIE, SEQ ID NO: 64), un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISNYLN, SEQ ID NO: 70), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO: 66) y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQFSNLPYT, SEQ ID NO: 80). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut65, por ejemplo:

50 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 64, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 61, 62 y 63, o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 80; o

55 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 64, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 80.

14E5Mut65 también tiene cambios en las FR1 y FR3 de cadena pesada (QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYSFS, SEQ ID NO: 81 y KAAITADTSSNTSYMQLSSLTSDSAVYYCAR, SEQ ID NO: 82) y FR1 y FR2 de cadena ligera (DIKMTQSPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 79 y WYQQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 81 o 82 (por ejemplo, SEQ ID NO: 37), opcionalmente con una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 28. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 79 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 28) y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 37.

65 14E5Mut83 tiene un cambio en la CDR1 de cadena pesada (THWIE, SEQ ID NO: 83), un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISNYLN, SEQ ID NO: 70), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO:

66), y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQYSDLPYT, SEQ ID NO: 71). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut83, por ejemplo:

5 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 83, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 61, 62 y 63, o

CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 71; o

10 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 83, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 71.

14E5Mut83 también tiene cambios en la FR1 de cadena pesada (EVQLQQSGAVLMKPGASVKISCKATGYTFS, SEQ ID NO: 84) y en FR1 y FR2 de cadena ligera (DILMTQSPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 68 y WYQQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 84 (por ejemplo, SEQ ID NO: 38), opcionalmente con una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 29. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 68 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 29) y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 38.

14E5Mut95 tiene un cambio en la CDR1 de cadena ligera (SASQGISNYLN, SEQ ID NO: 70), un cambio en la CDR2 de cadena ligera (YTSSLHS, SEQ ID NO: 66) y un cambio en la CDR3 de cadena ligera (QQYSDLPYT, SEQ ID NO: 71). En consecuencia, en algunos aspectos, se describen anticuerpos que comprenden combinaciones de las CDR de 14E5 y 14E5Mut95, por ejemplo:

20 CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 58, 59 y 60 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 70, 66 y 71.

14E5Mut95 también tiene cambios en las FR1 y FR3 de cadena pesada (EVQLQQTGAELMKPGASVKISCKATGYTFS, SEQ ID NO: 85 y KAVITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR, SEQ ID NO: 86) y en FR1 y FR2 de cadena ligera (DIEMTQSPSSLSASLGDRVTISC, SEQ ID NO: 87 y WYQQKPDGTVKLLTY, SEQ ID NO: 69, respectivamente). Por lo tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86 (por ejemplo, SEQ ID NO: 39), opcionalmente con una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 30. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 87 o 69 (por ejemplo, SEQ ID NO: 30), y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 29.

35 **D. 6B9**

El anticuerpo 6B9 se une con un epítipo en β 8 que está incluido en los aminoácidos 61-105 de β 8 humana (posiciones de aminoácidos relativas a la secuencia de β 8 de longitud completa mostrada en SEQ ID NO: 17) y no interacciona significativamente con β 8 murino. Como se muestra en los ejemplos, la serina 95 está implicada en el epítipo (bien unida directamente o bien implicada indirectamente en la estructura epitópica), ya que la sustitución de serina con prolina en esa posición esencialmente elimina la unión. El anticuerpo 6B9 no compete por la unión con 37E1B5, 11E8 o 14E5. Además, el anticuerpo 6B9 puede detectar β 8 en células y tejidos no fijados y fijados en formalina, y distinguen los niveles de expresión β 8, por ejemplo, en células que expresan diferentes niveles de β 8 (véase Ejemplos y Figuras 6 y 8). Los niveles de expresión también puede ser indicativos del número de copias genómicas de β 8 en la célula y patogénesis.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera (con las CDR subrayadas) para el anticuerpo 6B9 se exponen a continuación:

50 SEQ ID NO: 18 – Región variable de cadena pesada para 6B9 (las CDR 1-3 están subrayadas, SEQ ID NO: 40-42, respectivamente)

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTDYLIIEWVKQRPGQGLEWIGVINPETGGTNYNAKFKG
KATLTADKSSSSAYMQLSSLTSGDSAVYFCAREAGNYIYAMDYWGQGTSTVTVSS

55 SEQ ID NO: 19 – Región variable de cadena ligera para 6B9 (las CDR 1-3 están subrayadas, SEQ ID NO: 43-45, respectivamente)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASVNIYSYLWVYQQKQKSPQLLVHNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINS
LQPEDFGSYQCQHHHGTPYTFGGGTKLEIKR

60 En consecuencia, se describen anticuerpos que comprenden CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 40, 41 y 42 y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 43, 44 y 45. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden la región variable de cadena pesada SEQ ID NO: 18 y/o la región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 19.

Como se muestra en las Figuras 11A-B y 12A-B, se ha descubierto un anticuerpo de afinidad madurada de 6B9, designado 6B9Mut1. Notablemente, este anticuerpo de afinidad madurada tiene un cambio en la CDR2 de cadena pesada (VINPETGGTNYNAKFRG; SEQ ID NO: 46). En consecuencia, en algunos, se describen anticuerpos que comprenden CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 40, 46 y 42, y CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 43, 44 y 45.

6B9Mut1 también tiene un cambio en la FR1 de cadena ligera (DI~~V~~MTQSPASLSASVGETVTITC; SEQ ID NO: 47). En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 47 (por ejemplo, la región variable podría comprender SEQ ID NO: 23) y opcionalmente una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18.

A. 4F1

El anticuerpo 4F1 también se une con un epítipo en $\beta 8$ que se incluye en los aminoácidos 61-105 de $\beta 8$ (posiciones de aminoácidos relativas a la secuencia de $\beta 8$ de longitud completa mostrada en SEQ ID NO: 17) y no interacciona significativamente con $\beta 8$ murina. Como se muestra en los ejemplos, la serina 95 está implicada en el epítipo, ya que la sustitución de serina con prolina en esa posición esencialmente elimina la unión. El anticuerpo 4F1 no compite por la unión con 37E1B5, 11E8 o 14E5. Además, el anticuerpo 4F1 puede detectar $\beta 8$ en células y tejidos no fijados y fijados en formalina, y distinguir los niveles de expresión $\beta 8$, por ejemplo, en células que expresan diferentes niveles de $\beta 8$ (véase Ejemplos y Figuras 6, 7, 9 y 10). Los niveles de expresión también puede ser indicativos del número de copias genómicas de $\beta 8$ en la célula y patogénesis.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera (con las CDR subrayadas) para el anticuerpo 4F1 se exponen a continuación:

SEQ ID NO: 20 – Región variable de cadena pesada para 4F1 (las CDR 1-3 están subrayadas, SEQ ID NO: 116-118, respectivamente).

QVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGTGGTNYNKKFKV
KATLTADKSSSTAYMQLGGLTFDDSAVYFCAREGNARTYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 21 – Región variable de cadena ligera para 4F1 (las CDR 1-3 están subrayadas, SEQ ID NO: 119-121, respectivamente).

DIEMTQTPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLVWYQQKQGKSPQVLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINS
LQPEDFGSYQCQHHNGTPYTFGGGTKLEIKR

En consecuencia, se describen anticuerpos que comprenden las CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 116, 117 y 118 y las CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 119, 120 y 121. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden la región variable de cadena pesada SEQ ID NO: 20 y/o la región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 21.

F. Anticuerpos anti- $\alpha\beta 8$

Se describen en el presente documento anticuerpos que se unen específicamente con integrina $\alpha\beta 8$, pero no se unen significativamente con otras integrinas (por ejemplo, $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 3$, etc.). Los presentes anticuerpos se unen con un epítipo o una región epitópica específicos dentro de $\alpha\beta 8$. El epítipo puede ser un epítipo conformacional (no lineal) o no conformacional. Dicho anticuerpo puede unirse con $\beta 8$ solamente, es decir, el epítipo se localiza dentro de $\beta 8$, o con un epítipo no lineal que comprende parte de ambas subunidades, o un epítipo que se basa en la interacción de $\alpha\beta$ y $\beta 8$. Los presentes anticuerpos incluyen los anticuerpos específicos de $\alpha\beta 8$ descritos anteriormente, así como versiones humanizadas, quiméricas y/o marcadas de los mismos, y fragmentos de unión a $\alpha\beta 6$ y/o variantes de los mismos.

En algunos aspectos, el anticuerpo se une con $\beta 8$ e inhibe la activación de TGF β , por ejemplo, en comparación con la activación de TGF β en ausencia del anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo no reduce la adhesión de células que expresan $\alpha\beta 6$ a TGF β , es decir, el anticuerpo no reduce la adhesión celular mediada por $\alpha\beta 6$ con TGF β . En algunos aspectos, el anticuerpo puede reducir la unión de $\alpha\beta 6$ soluble con TGF β , en comparación con la unión de $\alpha\beta 6$ en ausencia del anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo puede unirse con un epítipo en $\beta 8$ que está dentro de SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, el epítipo incluye al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos R79, 185, S95, P100, I108, P109, R128, H140 y F179 de $\beta 8$ humana. En algunos aspectos, el epítipo incluye al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos I74, N88, I107, T110, I125, R175 y F180 de $\beta 8$ humana. En algunos aspectos, el epítipo incluye al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos 1125, R128, R175, F179 y F180 de $\beta 8$ humana. En algunos aspectos, el anticuerpo se une con $\beta 8$, pero no de ratón.

El sitio de unión, es decir, epítipo, de un anticuerpo inducido contra un antígeno dado puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo de competición (por ejemplo, un ELISA competitivo) usando un anticuerpo con un epítipo conocido. Si el anticuerpo de ensayo compite por la unión con el antígeno, entonces es probable que comparta al menos parte del mismo epítipo. El epítipo también puede localizarse usando intercambio de dominio o mutagénesis selectiva del antígeno. Es decir, cada región, o cada aminoácido, del antígeno puede "intercambiarse", o sustituirse con aminoácidos o componentes que se sabe que no interactúan con el anticuerpo de ensayo. Si la sustitución de una región o un aminoácido dado reduce la unión del anticuerpo de ensayo con el antígeno sustituido en comparación con el antígeno no sustituido, entonces esa región o ese aminoácido probablemente esté implicado en el epítipo.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo 37E1B5 humanizado con una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8, y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 9. El isotipo del anticuerpo puede ser IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3 o IgG4.

Los anticuerpos descritos por la presente pueden ser policlonales o monoclonales. Los sueros policlonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen específicamente con varios epítopos a lo largo de la longitud de $\alpha\beta 8$. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos de un segmento particular de $\alpha\beta 8$. En algunos aspectos, el anticuerpo es quimérico, humanizado (véase, Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989) y documentos WO 90/07861, US 5693762, US 5693761, US 5585089, US 5530101 y Winter, US 5225539), o humano (Lonberg *et al.*, documentos WO93/12227 (1993); US 5877397, US 5874299, US 5814318, US 5789650, US 5770429, US 5661016, US 5633425, US 5625126, US 5569825, US 5545806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) EP1481008, Bleck, Bioprocessing Journal 1 (Sept/Oct. 2005), US2004132066, US2005008625, WO2004072266, WO2005065348, WO2005069970 y WO2006055778. En algunos aspectos, los anticuerpos son formas humanizadas o quiméricas de 37E1B5, 11E8, de 14E5. Puede usarse el isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 para anticuerpos humanizados o quiméricos. Algunos anticuerpos se unen específicamente con $\alpha\beta 8$ con una afinidad de unión mayor de o igual a aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} M⁻¹ (por ejemplo, con una Kd en el intervalo micromolar (10^{-6}), nanomolar (10^{-9}), picomolar (10^{-12}) o menor).

G. Detección de la actividad de TGF β y el efecto de anticuerpos anti- $\alpha\beta 8$

Para determinar el efecto de un anticuerpo en la actividad de TGF β , están disponibles varios bioensayos de TGF β . Por ejemplo, la activación de TGF β puede ensayarse en un ensayo de cocultivo. Las células de ensayo que expresan $\alpha\beta 8$ se co-cultivan con células TMLC, es decir, células epiteliales de pulmón de visón transfectadas de forma estable con un fragmento promotor sensible a TGF- β que conduce el gen luciferasa (Abe *et al.* (1994) Annal Biochem 216: 276). Las células TMLC son altamente sensibles a TGF β con un fondo muy bajo de activación de TGF β . Las células TMLC pueden por lo tanto usarse en co-cultivo con otras líneas celulares o fracciones sin células para ensayar con respecto a la presencia de TGF β activo usando luminiscencia como lectura. Pueden realizarse ensayos en presencia o ausencia de anticuerpo de bloqueo anti-TGF β (10 μ g/ml, 1D11, R&D Systems), anti- $\beta 8$ (20 μ g/ml, 37E1B5) o anti- $\beta 6$ (150 μ g/ml, 10D5) como se ha descrito (Abe (1994); Munger (1999).

Para medir el TGF β activo en tejido tumoral, pueden triturarse pesos iguales de tejido tumoral e incubarse en DME estéril durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes que contienen TGF β activo pueden recogerse después de centrifugación (20 g) a 4 °C. Los sedimentos pueden incubarse después en DME sin suero durante 20 min a 80 °C para activar SLC, después de lo cual pueden recogerse los sobrenadantes. Los sobrenadantes que contienen TGF β activo o activado por calor (latente) se añaden después de a células TMLC previamente sembradas en placas con o sin 1 D 11. Para ensayos inhibidores de proteasa, se añaden inhibidores al inicio del co-cultivo. La dosis máxima de cada inhibidor se define como la mayor concentración que no inhibe la capacidad de las células TMLC para responder a TGF β activo recombinante. Para medir la actividad de TGF β soluble de células cultivadas, las células se incuban en 100 μ l de medio completo con o sin 37E1 o 10D5 durante 1 h a 37 °C con rotación suave. Se recogen sobrenadantes sin células por centrifugación (20 g) durante 5 min a 4 °C y después se añaden a células TMLC previamente sembradas en placas en presencia o ausencia de 1D11. Para ensayos de receptores solubles, se usa medio acondicionado obtenido de cultivos de una noche de células. Las unidades de luciferasa relativas se definen como la actividad menos la actividad de fondo de las células indicadores TMLC.

IV. Métodos para generar anticuerpos

Para la preparación y el uso de anticuerpos adecuados como se describe en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales o policlonales, pueden usarse muchas técnicas conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al.*, Immunology Today 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); y Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2^a ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés pueden clonarse de una célula, por ejemplo, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden clonarse de un hibridoma y usarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las bibliotecas

génicas que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales también pueden prepararse a partir de células de hibridoma o plasmáticas. Las combinaciones aleatorias de los productos génicos de cadena pesada y ligera generan un gran grupo de anticuerpos con diferente especificidad antigénica (véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology* (3ª ed. 1997)). Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios o anticuerpos recombinantes (Patente de Estados Unidos 4.946.778, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567) para producir anticuerpos para polipéptidos de la presente invención. Además, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados o humanos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)). Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación en fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heterodiméricos que se unen específicamente con antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10: 779-783 (1992)). Los anticuerpos también pueden hacerse biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos antígenos diferentes (véase, por ejemplo, documento WO 93/08829, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos covalentemente, o inmunotoxinas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 4.676.980, documentos WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

Pueden producirse anticuerpos usando cualquier variedad de sistemas de expresión, incluyen sistemas de expresión procariotas y eucariotas. En algunos aspectos, el sistema de expresión es un sistema de expresión de células de mamífero, tal como un hibridoma, o un sistema de expresión de células CHO. Muchos de dichos sistemas están ampliamente disponibles de proveedores comerciales. En aspectos en los que un anticuerpo comprende tanto una región V_H como una región V_L, las regiones V_H y V_L pueden expresarse usando un único vector, por ejemplo, en una unidad de expresión di-cistrónica, o bajo el control de diferentes promotores. En otros aspectos, la región V_H y V_L puede expresarse usando vectores separados. Una región V_H o V_L como se describe en el presente documento puede comprender opcionalmente una metionina en el extremo N terminal.

Un anticuerpo como se describe en el presente documento, también puede producirse en diversos formatos, incluyendo un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un scFv o un dAB. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por diversos métodos, incluyendo digestión de un anticuerpo intacto con una enzima, tal como pepsina (para generar fragmentos (Fab')₂) o papaina (para generar fragmentos Fab); o síntesis *de novo*. También pueden sintetizarse fragmentos de anticuerpo utilizando metodología de ADN recombinante. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-β8 comprende fragmentos F(ab')₂ que se unen específicamente con β8. Un anticuerpo de la invención también puede incluir una región constante humana. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* (Paul *et al.*, 4ª ed. 1999); Bird, *et al.*, *Science* 242: 423 (1988); y Huston, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879 (1988).

También se conocen en la técnica métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos importados, que se toman típicamente de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struck. Biol.* 2: 593-596 (1992)), sustituyendo con CDR de roedor o secuencias de CDR las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, polietilenglicol (PEGilación) o albúmina de suero, para proporcionar una semivida extendida *in vivo*. Se proporcionan ejemplos de PEGilación de fragmentos de anticuerpo en Knight *et al.* *Platelets* 15: 409, 2004 (para abciximab); Pedley *et al.*, *Br. J. Cancer* 70: 1126, 1994 (para un anticuerpo anti-CEA); Chapman *et al.*, *Nature Biotech.* 17: 780, 1999; y Humphreys, *et al.*, *Protein Eng. Des.* 20: 227, 2007). El anticuerpo o fragmento de anticuerpo también puede marcarse o conjugarse con un agente terapéutico como se describe posteriormente.

La especificidad de unión del anticuerpo puede definirse con respecto a las constantes de disociación comparativas (K_d) del anticuerpo por la diana (por ejemplo, β8) en comparación con la constante de disociación con respecto al anticuerpo y otros materiales en el ambiente o moléculas no relacionadas en general. Típicamente, la K_d para el anticuerpo con respecto al material no relacionado será al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces o más que la K_d con respecto a la diana.

La afinidad deseada por un anticuerpo, por ejemplo, alta (pM a nM baja), media (nM baja a 100 nM) o baja (aproximadamente 100 nM o mayor), puede diferir dependiendo de si se usa como un diagnóstico o una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo con afinidad mediana puede tener más éxito en la localización en tejido deseado en

comparación con uno con alta afinidad. Por lo tanto, pueden usarse anticuerpos que tengan diferentes afinidades para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

5 Un resto de dirección típicamente se unirá con una Kd de menos de aproximadamente 1000 nM, por ejemplo, menos de 250, 100, 50, 20 o menor nM. En algunos aspectos, la Kd del agente de afinidad es menor de 15, 10, 5 o 1 nM. En algunos aspectos, la Kd es 1-100 nM, 0,1-50 nM, 0,1-10 nM o 1-20 nM. El valor de la constante de disociación (Kd) puede determinarse por métodos bien conocidos, y puede calcularse incluso para mezclas complejas por métodos como se desvelan, por ejemplo, en Caceci *et al.*, *Byte* (1984) 9: 340-362.

10 La afinidad de un anticuerpo, o cualquier agente de dirección, por una diana puede determinarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se revisa en Ernst *et al.* *Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley & Sons ed. 2009).

15 Pueden usarse ELISA cuantitativo y métodos de afinidad basados en matriz similares. ELISA (ensayo de señalización inmunoabsorbente ligado a enzimas) es un método basado en anticuerpos. En algunos casos, un anticuerpo específico para diana de interés se fija a un sustrato, y se pone en contacto con una muestra que se sospecha que contiene la diana. La superficie se lava después para retirar sustancias no unidas. Puede detectarse unión diana de diversas maneras, por ejemplo, usando una segunda etapa con un anticuerpo marcado, marcaje directo de la diana, o un marcaje del anticuerpo primario con un marcador que es detectable tras la unión a antígeno.

20 En algunos casos, el antígeno se fija al sustrato (por ejemplo, usando un sustrato con alta afinidad por proteínas, o una interacción de Estreptavidina-biotina) y se detecta usando un anticuerpo marcado (u otro resto de dirección). Se han desarrollado y se conocen en la técnica varias permutaciones de los métodos de ELISA originales (véase Lequin (2005) *Clin. Chem.* 51: 2415-18 para una revisión).

25 La Kd, Kon y Koff pueden determinarse también usando resonancia de plasmón superficial (RPS), por ejemplo, como se mide usando un sistema Biacore T100. Se revisan técnicas de RPS, por ejemplo, en Hahnfeld *et al.* *Determination of Kinetic Data Using SPR Biosensors, Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (2004). En un experimento de RPS típico, se inmoviliza un agente de interacción (diana o agente de dirección) en un portaobjetos de vidrio recubierto con oro, RPS activo, en una celda de flujo, y se introduce una muestra que contiene el otro agente de interacción para fluir a través de la superficie. Cuando se ilumina la superficie con luz de una frecuencia dada, los cambios de la reflectividad óptica del oro indican unión y la cinética de unión.

30 La afinidad de unión también puede determinarse anclando un agente de interacción biotinilado a una microplaca sensora de estreptavidina (SA). El otro agente de interacción se pone en contacto después con la microplaca y se detecta, por ejemplo, como se describe en Abdessamad *et al.* (2002) *Nuc. Acids Res.* 30: e45.

V. Aplicaciones y composiciones farmacéuticas

40 Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ de los mismos, anticuerpos marcados, inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden usarse para detectar, tratar, aliviar o prevenir enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma.

45 Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ de los mismos, anticuerpos marcados, inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden usarse para detectar, tratar, aliviar o prevenir enfermedad inflamatoria del intestino.

50 Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ de los mismos, anticuerpos marcados, inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden usarse para detectar, tratar, aliviar o prevenir una enfermedad antiinmunitaria inflamatoria cerebral, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante (por ejemplo, mielitis transversal, enfermedad de Devic, síndrome de Guillain-Barré), neuroinflamación, enfermedad renal o glioma.

55 Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ de los mismos, anticuerpos marcados, inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden usarse para detectar, tratar, aliviar o prevenir artritis.

60 Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ de los mismos, anticuerpos marcados, inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden usarse para detectar, tratar, aliviar o prevenir diversos trastornos fibróticos, tales como fibrosis de las vías respiratorias, fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica, fibrosis pulmonar postinfecciosa, daño alveolar difuso, fibrosis pulmonar asociada a enfermedad vascular de colágeno, fibrosis pulmonar inducida por fármacos, silicosis, fibrosis pulmonar relacionada con el amianto, bronquiolitis respiratoria, enfermedad pulmonar intersticial de bronquiolitis respiratoria, fibrosis intersticial de descamación, neumonía organizada criptogénica, neumonía de hipersensibilidad crónica, fibrosis pulmonar o hepática relacionada con fármacos, fibrosis renal y fibrosis hepática (por ejemplo, inducida por alcohol, uso de fármacos, esteatohepatitis, infección vírica (por ejemplo, hepatitis B o C),

65

coleostasis, etc.).

Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ de los mismos, anticuerpos marcados, inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden usarse para detectar, tratar, aliviar o prevenir adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma de mama y crecimiento y metástasis de cáncer.

Un experto apreciará que la naturaleza de la composición farmacéutica y la vía de administración dependerán en parte de la afección que se trate.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del ácido nucleico envasado o suspendido en diluyentes, tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, bolsitas o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos cálcicos, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes, agentes saporíferos, colorantes, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de grageas pueden comprender el principio activo en un aromatizante, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o emulsiones de sacarosa y goma arábiga, geles y similares que contienen, además del principio activo, vehículos conocidos en la técnica.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento (o fragmento de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ del mismo) puede administrarse, sola o en combinación con otros componentes adecuados, y puede prepararse en formulaciones de aerosol ("nebulizarse") para administrar mediante inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, etc.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en el ácido nucleico envasado con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación del compuesto elegido con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles e hidrocarburos de parafina.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vías intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estéril isotónica, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de la presente invención, pueden administrarse composiciones, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, por vía tópica, por vía intraperitoneal, por vía intravesical o por vía intratecal. Los anticuerpos se administran típicamente por administración parenteral o intravenosa. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes precintados de dosis unitaria o multi-dosis, tales como ampollas y viales.

Las soluciones y suspensiones para inyección pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos por o resultarán evidentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

Las composiciones para administración comprenden típicamente un anticuerpo como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ o fragmento de unión a $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ o inmunoconjugado del mismo) disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un vehículo acuoso. Puede usarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada. Estas soluciones son estériles y en general sin materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables según se requiere para aproximar las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico, etc. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes líquidos, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

La formulación también proporcionar compuestos activos adicionales, incluyendo agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, citocinas, agente inhibidor del crecimiento y agente anti-hormonal. Los principios activos pueden

prepararse como preparaciones de liberación sostenida (por ejemplo, matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos (por ejemplo, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli (vinilalcohol)), polilactidas. Los anticuerpos e inmunoconjugados también pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

VI. Composiciones y aplicaciones de diagnóstico

La integrina $\alpha\beta8$ se expresa en fibroblastos, células estrelladas, condrocitos, macrófagos activados y subconjuntos de linfocitos T y B. La expresión de integrina $\alpha\beta8$ es mayor en fibroblastos en EPOC y fibrosis pulmonar, y puede usarse como un marcador sustituto para la masa celular de fibroblastos aumentada. Por lo tanto los anticuerpos desvelados por la presente pueden ser ampliamente aplicables a estrategias de captura de imágenes para detectar procesos fibroinflamatorios. Los anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico descritos por la presente pueden aplicarse a: enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, un trastorno fibroinflamatorio hepático, lesión de hígado inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), hepatitis vírica y cirrosis biliar primaria (CBP), rechazo de injertos después de trasplante de hígado, hepatitis autoinmunitaria, un trastorno autoinmunitario, lupus eritematoso, esclerodermia, dermatomiositis, penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, glomerulonefritis, carcinoma hepatocelular (CHC), adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma, melanoma, carcinoma de próstata, ovárico, uterino y de mama.

Como se ha explicado anteriormente, pueden usarse anticuerpos anti- $\alpha\beta8$ descritos en el presente documento (incluyendo fragmentos de unión a $\alpha\beta8$ de los mismos, variantes con afinidad madurada y variantes de anticuerpo menos de 50 o 25 kD o scFv) para diagnóstico, bien *in vivo* o bien *in vitro* (por ejemplo, usando una muestra biológica obtenida de un individuo). El anticuerpo se conjuga típicamente o se asocia de otro modo con un marcador detectable. La asociación puede ser directa, por ejemplo, un enlace covalente, o indirecta, por ejemplo, usando un agente de unión secundario, quelante o enlazador.

Un anticuerpo marcado puede proporcionarse a un individuo para determinar la aplicabilidad de una terapia pretendida. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo marcado para detectar la densidad de la integrina $\beta8$ dentro de un área enferma. Para terapias que se pretende que se dirijan a la actividad de TGF β o $\alpha\beta8$ (para reducir la actividad de TGF β o $\alpha\beta8$), la densidad de $\beta8$ es típicamente alta en relación con tejido no enfermo. Un anticuerpo marcado también puede indicar que el área enferma es accesible para terapia. Los pacientes pueden seleccionarse por lo tanto para terapia basándose en los resultados de captura de imágenes. Puede conseguirse caracterización anatómica, tal como determinación de los límites precisos de un cáncer, usando técnicas de captura de imágenes convencionales (por ejemplo, exploración TC, IRM, exploración de TEP, etc.). Dichos métodos *in vivo* pueden llevarse a cabo usando cualquiera de los anticuerpos desvelados por la presente. En algunos aspectos, se usa 14E5 marcado, ya que no afecta a los niveles de TGF β .

También puede usarse cualquiera de los anticuerpos desvelados por la presente para métodos de diagnóstico o supervisión *in vitro*, por ejemplo, usando células o tejido de una muestra del paciente. En algunos casos, se usa 11E8 marcado (o un fragmento de unión a $\beta8$ o variante de afinidad madurada), ya que puede unirse con células fijadas así como células no fijadas. En algunos casos, se usa 6B9 marcado (o un fragmento de unión a $\beta8$ o variante de afinidad madurada), ya que puede unirse con células fijadas así como células no fijadas, y no compite por la unión con $\beta8$ con anticuerpos terapéuticos tales como 11E8, 37E1 o 37E1B5. En algunos casos, se usa 4F1 marcado (o un fragmento de unión a $\beta8$ o variante de afinidad madurada), ya que puede unirse con células fijadas así como células no fijadas, y no compite por la unión con $\beta8$ con anticuerpos terapéuticos tales como 11E8, 37E1 o 37E1B5.

En algunos aspectos, el anticuerpo de diagnóstico es un fragmento variable monocatenario (scFv). Pueden usarse anticuerpos intactos (por ejemplo, IgG) para radioinmunoterapia o suministro dirigido de agentes terapéuticos debido a que muestran alta captación y retención. En algunos casos, la persistencia en circulación de mAb intactos puede dar como resultado fondo alto (Olafsen *et al.* (2012) *Tumour Biol.* 33: 669-77; Cai *et al.* (2007) *J Nucl Med.* 48: 304-10). Los scFv, típicamente con una masa molecular de aproximadamente 25 kD, se secretan rápidamente por los riñones, pero son monovalentes y pueden tener menor afinidad. Los problemas de la monovalencia pueden superarse con ingeniería de anticuerpos avanzada (como se muestra en el presente documento), donde puede mejorarse las afinidades al intervalo de nM bajo a pM. Dichos anticuerpos tienen semividas suficientemente cortas para ser útiles como agentes de captura de imágenes y tienen características de unión adecuadas para dirección tisular (Cortez-Retamozo *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64: 2853-7). Como se muestra en el presente documento, se han creado varios derivados de anticuerpo scFv de muy alta afinidad de 4F1, 6B9 y 14E5 que pueden convertirse en plataformas de scFv humanizadas. Estos anticuerpos mejorados no bloquean la función y por lo tanto pueden usarse en combinación con un agente terapéutico que se dirija a $\beta8$.

Un agente de diagnóstico que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento puede incluir cualquier agente de diagnóstico conocido en la técnica, como se proporciona, por ejemplo, en las siguientes referencias: Armstrong *et al.*, Diagnostic Imaging, 5ª Ed., Blackwell Publishing (2004); Torchilin, V. P., Ed., Targeted Delivery of Imaging Agents, CRC Press (1995); Vallabhajosula, S., Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT, Springer (2009). Las expresiones “agente detectable”, “resto detectable”, “marcador”, “agente de captura de imágenes” y expresiones similares se usan de forma sinónima en el presente documento. Un agente de diagnóstico puede detectarse de diversas maneras, incluyendo como un agente que proporciona y/o potencia una señal detectable. Las señales detectables incluyen, pero sin limitación, señales emisoras gamma, radiactivas, ecogénicas, ópticas, fluorescentes, absorbentes, magnéticas o de tomografía. Las técnicas para captura de imágenes del agente de diagnóstico pueden incluir, pero sin limitación, tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT), captura de imágenes por resonancia magnética (IRM), captura de imágenes óptica, tomografía de emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada (TC), captura de imágenes por rayos x, captura de imágenes por rayos gamma y similares. La TEP es particularmente sensible y cuantitativa, y por lo tanto valiosa para caracterizar procesos fibróticos *in vivo* (Olafsen *et al.* (2012) *Tumour Biol.* 33: 669-77; Cai *et al.* (2007) *J Nucl Med.* 48: 304-10). Esto es útil más allá de un diagnóstico adjunto y sería en general útil para diagnosticar, estadificar clínicamente y seguir a pacientes fibróticos durante cualquier régimen de tratamiento.

Puede incorporarse un radioisótopo en los agentes de diagnóstico descritos en el presente documento y puede incluir radionúclidos que emiten rayos gamma, positrones, partículas beta y alfa y rayos X. Los radionúclidos adecuados incluyen pero sin limitación ^{225}Ac , ^{72}As , ^{211}At , ^{11}B , ^{128}Ba , ^{212}Bi , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{14}C , ^{109}Cd , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^3H , ^{166}Ho , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{130}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{13}N , ^{15}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{212}Pb , ^{103}Pd , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{47}Sc , ^{153}Sm , ^{89}Sr , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{88}Y y ^{90}Y . En ciertos aspectos, los agentes radiactivos pueden incluir ^{111}In -DTPA, $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -DTPA, $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -ENPy2, $^{62/64/67}\text{Cu}$ -TETA, $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -IDA y $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ triaminas (cíclicas o lineales). En otros aspectos, los agentes pueden incluir DOTA y sus diversos análogos con ^{111}In , ^{177}Lu , ^{153}Sm , $^{88/90}\text{Y}$, $^{62/64/67}\text{Cu}$ o $^{67/68}\text{Ga}$. En algunos aspectos, puede marcarse una nanopartícula por incorporación de lípidos unidos a quelantes, tales como DTPA-lípido, como se proporcionan en las siguientes referencias: Phillips *et al.*, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 1(1): 69-83 (2008); Torchilin, V.P. y Weissig, V., Eds. Liposomes 2ª Ed.: Oxford Univ. Press (2003); Elbayoumi, T.A. y Torchilin, V.P., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33: 1196-1205 (2006); Mougín-Degraef, M. *et al.*, Int'l J. Pharmaceutics 344: 110-117 (2007).

En algunos aspectos, un agente de diagnóstico puede incluir quelantes que se unan, por ejemplo, con iones metálicos para usar para una diversidad de técnicas de captura de imágenes de diagnóstico. Los quelantes ejemplares incluyen pero sin limitación ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido [4-(1,4,8, 11-tetraazaciclotetradec-1-il)metil]benzoico (CPTA), ácido ciclohexanodiamintetracético (CDTA), ácido etilenbis(oxi)etilennitrilo)tetraacético (EGTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido cítrico, ácido hidroxietilendiamintriacético (HEDTA), ácido iminodiacético (IDA), ácido trietilentetraaminhexaacético (TTHA), 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetra(ácido metileno)fosfónico (DOTP), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecan-1,4,8,11-tetraacético (TETA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), N^1, N^1 -bis(piridin-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (ENPy2) y derivados de los mismos.

En algunos aspectos, el agente de diagnóstico puede asociarse con un ligando de unión secundario o con una enzima (un marcador enzimático) que generará un producto coloreado tras el contacto con un sustrato cromogénico. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de hidrógeno (de rábano rusticano) y glucosa oxidasa. Los ligandos de unión secundarios incluyen, por ejemplo, biotina y avidina o compuestos de estreptavidina como se conocen en la técnica.

En algunos aspectos, los agentes de diagnóstico pueden incluir agentes ópticos tales como agentes fluorescentes, agentes fosforescentes, agentes quimioluminiscentes y similares. Se conocen en la técnica numerosos agentes (por ejemplo, colorantes, sondas, marcadores o indicadores) y pueden usarse en la presente invención. (Véase, por ejemplo, Invitrogen, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Décima Edición (2005)). Los agentes fluorescentes pueden incluir una diversidad de moléculas pequeñas orgánicas y/o inorgánicas o una diversidad de proteínas fluorescentes y derivados de las mismas. Por ejemplo, los agentes fluorescentes pueden incluir pero sin limitación cianinas, ftalocianinas, porfirinas, indocianinas, rodaminas, fenoxazinas, fenilxantenos, fenotiazinas, fenoselenazinas, fluoresceínas, benzoporfirinas, escurainas, dipirrol pirimidonas, tetracenos, quinolinas, pirazinas, corrinas, croconios, acridonas, fenantridinas, rodaminas, acridinas, antraquinonas, análogos de chalcogenopirilio, clorinas, naftalocianinas, colorantes de metina, colorantes de indolenio, compuestos azo, azulenos, azaazulenos, colorantes de trifenil metano, indoles, benzoindoles, indocarbocianinas, benzoindocarbocianinas y derivados de BODIPY™.

VII. Tratamientos

Los anticuerpos anti- $\alpha\text{v}\beta 8$ descritos por la presente, y fragmentos de unión a $\alpha\text{v}\beta 8$ o inmunoconjugados de los mismos, pueden administrarse a un individuo usando métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracefalorraquídea, subcutánea, intraarterial, intrasnovial, intratecal, oral, tópica (por ejemplo, transdérmica) o inhalación. La administración puede ser local o sistémica.

Las composiciones pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad (por ejemplo, EII, cáncer, fibrosis (pulmonar o hepática), EPOC, asma, artritis, etc.) en una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán del trastorno para tratar, la vía de administración, la gravedad de la afección y el estado general de la salud del paciente. Pueden administrarse administraciones individuales o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia según el paciente requiera y tolere. Las composiciones descritas por la presente pueden administrarse a seres humanos y otros animales, particularmente mamíferos. Por lo tanto los métodos son aplicables tanto a terapia humana como a aplicaciones veterinarias. Pueden utilizarse otras terapias de cáncer conocidas en combinación con los métodos de la invención. Por ejemplo, las composiciones para su uso de acuerdo con la invención, también pueden usarse para dirigir o sensibilizar una célula a otros agentes terapéuticos de cáncer tales como 5FU, vinblastina, actinomicina D, cisplatino, metotrexato, etc. Las composiciones descritas por la presente también pueden combinarse con radioterapia o inmunoterapia así como productos terapéuticos actualmente en desarrollo.

Las terapias de combinación contemplan la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden.

Para determinar una dosis terapéuticamente eficaz, puede administrarse inicialmente al individuo una dosis baja de un anticuerpo anti- $\alpha\nu\beta 8$ (o fragmento de unión a $\alpha\nu\beta 8$ o inmunocombinado del mismo), y la dosis puede aumentarse de forma gradual hasta que la afección del individuo comience a mejorar. Por ejemplo, la dosificación inicial puede ser aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg diariamente. Puede usarse un intervalo de dosis diario de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, en puntos temporales posteriores si la condición del individuo no cambia a la dosis menor. Como se ha observado anteriormente, un experto apreciará que deben considerarse varias variables cuando se determina una dosis terapéuticamente eficaz. La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de una composición particular (o terapia de combinación) en un paciente particular.

VIII. Ejemplos

A. Ejemplo 1: anticuerpo 37E1B5

Las secuencias de región V de cadena pesada y ligera de 37E1, 37E1B5 y 37E1B5 humanizado (h37E1B5 o Hu37E1B5) se muestran en la Figura 1. Se indican las regiones marco conservadas y CDR. El anticuerpo 37E1B5 humanizado conserva la alta afinidad y actividad de 37E1B5.

En cultivo *in vitro*, 37E1 a una concentración de aproximadamente 200 $\mu\text{g/ml}$ inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro. Como se ha explicado anteriormente, 37E1B5 tiene una afinidad mucho mayor y está activo en el intervalo picomolar. 37E1B5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ es muy eficaz para inhibir la liberación de péptido de TGF β activo, maduro en cultivo *in vitro*.

B. Ejemplo 2: Generación de los anticuerpos 11E8 y 14E5

Los anticuerpos 11E8 y 14E5 se produjeron en células de hibridoma, que se crearon fusionando células de mieloma SP2/0 con linfocitos de ratones inmunizados específicamente. Los ratones se inmunizaron por inyección subcutánea de una versión modificada técnicamente de integrina $\alpha\nu\beta 8$ secretada, purificada.

C. Ejemplo 3: Caracterización del epítipo $\beta 8$

Se usaron construcciones de integrina quimérica $\beta 8$, que cambiaban secuencias de ratón en ITGB8 humana para localizar los epítipos de unión para los anticuerpos 37E1B5, 11E8 y 14E5. El epítipo se localizó por unión de anticuerpo, tinción de superficie celular y detección por citometría de flujo. El epítipo está incluido dentro de los aminoácidos 121-180 de la integrina humana $\beta 8$ (en relación con la secuencia de $\beta 8$ mostrada en la SEQ ID NO: 17). Los tres anticuerpos se unen con $\beta 8$ humana, pero no con $\beta 8$ de ratón. Por lo tanto, se incluye al menos una de las 9 diferencias de aminoácidos no conservativas o 7 diferentes de aminoácidos menores (indicadas por + en la línea media de la secuencia) en el epítipo de unión, o afectan a la estructura tridimensional del dominio de tal manera que distingan la proteína de ratón de la proteína humana. El epítipo queda en lo que se conoce como híbrido Psi y la hélice alfa1 y región enlazadora alfa1 del dominio Beta-I de la subunidad $\beta 8$ de integrina, y se encuentra en la superficie de la molécula.

M itgb8	121	GEVSVQLHPGAEANFMLKVRPLKKYPVDLYYLVVDVSASMHNIEKLNLSVGNLDSKMKMALY	180
		GEVS+QL PGAEANFMLKV PLKKYPVDLYYLVVDVSASMHNIEKLNLSVGNLDS+KMA +	
H ITGB8	121	GEVSIQLRPGAEANFMLKVHPLKKYPVDLYYLVVDVSASMHNIEKLNLSVGNLDSRKMMAFF	180

SEQ ID NO: 1 representa la región de la integrina $\beta 8$ humana que incluye el epítipo 37E1B5 (aminoácidos 121-180). SEQ ID NO: 2 representa la secuencia murina homóloga, que no es una con el anticuerpo 37E1B5. La R en la posición 140 de la secuencia murina es polimórfica y también puede ser una H. La secuencia de alineamiento está representada por SEQ ID NO: 3.

Se realizaron estudios de intercambio de dominio adicionales dentro de esta región, sustituyendo secuencia humana por murina, para determinar qué aminoácido o aminoácidos se incluyen en el epítipo 37E1B5. La sustitución de los aminoácidos 125-180 murinos de integrina $\beta 8$ redujo significativamente la unión de 37E1B5. Por lo tanto, el epítipo en la integrina humana $\beta 8$ incluye al menos un aminoácido seleccionado de 1125, R128, R175, F179 y F180.

D. Ejemplo 4: Caracterización del anticuerpo 11E8

Los inmunoprecipitados del anticuerpo 11E8 secretaron $\alpha v\beta 8$, y reconocen un epítipo de la subunidad $\beta 8$ que está presente en células de riñón embrionario 293 humanas transfectadas con $\beta 8$ y células de carcinoma de colon SW480, pero no células transfectadas de forma simulada.

11E8 bloquea específicamente la activación de TGF- β mediada por $\alpha v\beta 8$ en células SW480 transfectadas con ITGB8. Como 37E1B5, 11E8 es un anticuerpo de alta afinidad, y tiene la actividad de bloqueo de TGF β a una concentración muy baja (40 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* fue la concentración más baja ensayada). 11E8 no bloquea la activación de TGF- β mediada por otros mecanismos no mediados por $\beta 8$.

Además, 11E8 reconoce un epítipo $\beta 8$ que está presente en células fijadas en formalina, haciéndolo adecuado para estudios de localización en tejidos humanos. El anticuerpo 11E8 está activo *in vitro* e *in vivo*, y puede usarse como un agente terapéutico para reducir la actividad de TGF β mediada por $\alpha v\beta 8$. La capacidad de 11E8 para unirse con células fijadas es útil para acelerar la aprobación reguladora, y para seleccionar un grupo de pacientes (por ejemplo, para confirmar la expresión de $\alpha v\beta 8$ en el tejido de interés antes de iniciar el tratamiento), caracterizar poblaciones de pacientes (por ejemplo, de acuerdo con localización de la expresión $\alpha v\beta 8$, respuesta a diversos agentes terapéuticos, etc.) y supervisar la progresión de enfermedad (por ejemplo, durante un ciclo de tratamiento con anticuerpo 11E8 u otro agente terapéutico).

Para definir mejor el epítipo de 11E8, se realizó un ensayo de competición con 37E1B5. La adición de 37E1B5 no marcado inhibió la unión del anticuerpo 11E8 marcado con células SW480 transfectadas con ITGB8 (integrina $\beta 8$ humana) y células puro que expresan $\alpha v\beta 8$. El resultado indica que los epítopos de estos anticuerpos solapan significativamente.

Las secuencias de región variable para 11E8 se obtuvieron, como se muestra en SEQ ID NO: 10 y 11. Las CDR 1-3 de la cadena pesada de 11E8 son: SYWIE, DILPGSGTTNYNEKFKG y WGWDTY, respectivamente. Las CDR 1-3 de la cadena ligera de 11E8 son: SASQGISNYLN, YTSSLHS, QQYSNLPYT, respectivamente.

E. Ejemplo 5: Caracterización del anticuerpo 14E5

Como se ha desvelado anteriormente, el anticuerpo 14E5 reconoce integrina $\beta 8$ humana pero no de ratón, y se une con un epítipo dentro de los aminoácidos 120-180. El anticuerpo 14E5 se une con $\alpha v\beta 8$ en células que expresan $\alpha v\beta 8$ tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no inhibe la liberación de TGF β activo, maduro. El anticuerpo 14E5 es útil para aplicaciones de diagnóstico o selección de población de pacientes, ya que se une con alta afinidad y funciona bien en ensayos de FACS.

Para definir mejor el epítipo del anticuerpo 14E5, se realizó un ensayo de competición con 37E1B5. La adición de anticuerpo 37E1B5 no marcado inhibió la unión del anticuerpo 14E5 marcado con células SW480 transfectadas con ITGB8 y células puro que expresaban $\alpha v\beta 8$. El resultado indica que el epítipo para estos anticuerpos es solapante.

Las secuencias de región variable para 14E5 se obtuvieron, como se muestra en SEQ ID NO: 12 y 13. Las CDR 1-3 de la cadena pesada de 14E5 son: TYWIE, HILPGSVITNYNEKFKG, WGWDSY, respectivamente. Las CDR 1-3 de la cadena ligera de 14E5 son: STSQDISSSLN, YTSNLHS, QQYSKLPYT, respectivamente.

F. Ejemplo 6: El papel de integrina $\alpha v\beta 8$ en la remodelación de las vías respiratorias

TGF- β está implicado en la respuesta inflamatoria y fibrótica. IL-1 β regula positivamente la expresión de $\beta 8$, que se sobreexpresa en las vías respiratorias de pacientes con EPOC. Se diseñó un modelo de remodelación de las vías respiratorias mediada por $\beta 8$ para determinar las interacciones de $\beta 8$, TGF- β e IL-1 β *in vivo*. Los resultados muestran que la activación mediada por $\beta 8$, inducida por IL-1- β , de TGF- β desempeña un papel crítico en la remodelación de las vías respiratorias.

$\beta 8$ se suprimió en ratones C57BL/6 usando un sistema Cre/LoxP. Se usó IL-1 β adenovírica intratraqueal como un modelo para inflamación en ratones de 6 a 9 semanas de edad con un alelo de integrina $\beta 8$ flanqueado por sitios LoxP y un alelo nuligénico (Floxed/-). Se administró por vía intratraqueal IL-1 β humana adenovírica (Ad-hIL-1 β) o adenovirus de control, con o sin Ad-Cre.

5 Se usaron ratones que expresaban la recombinasa de fusión Cre-ER(T) bajo el control del promotor de colágeno I $\alpha 2$ para mostrar que los fibroblastos desempeñan un papel importante en la activación mediada por $\alpha v\beta 8$ de TGF- β en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, remodelación de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina y remodelación de las vías respiratorias inducida por Ad-IL1 β . Los cambios de morfología de las vías respiratorias se evaluaron por histología. La expresión génica de varias citocinas inflamatorias en múltiples puntos temporales después de la administración de Ad-hIL-1 β reveló la inducción secuencial de genes que caracterizan una respuesta inflamatoria.

10 Los resultados de los ratones con supresión condicional de $\beta 8$ mostraron que se requiere $\beta 8$ para inflamación y fibrosis de las vías respiratorias transitoria inducida por IL-1 β . La administración de IL-1 β humana en ratones que expresaban $\beta 8$ dio como resultado la activación mediada por $\beta 8$ de TGF- β , inducción de los genes *ccl2* y *ccl20* de ratón (Ligando de Quimiocina CC 2 y 20, que están implicados en respuestas inflamatorias), reclutamiento de células dendríticas e inicio y perpetuación de la respuesta inmunitaria adaptativa.

15 Los datos de los nuligénicos para integrina $\beta 8$ condicionales mostraron una respuesta fibrótica y de inflamación reducida tanto a Ad-hIL-1 β como a ovoalbúmina, lo que dio como resultado protección de la remodelación de las vías respiratorias. Por lo tanto, la dirección a $\beta 8$ reduce la activación de TGF- β inducida por IL-1 β e inducida por ovoalbúmina en la remodelación de las vías respiratorias, y lesión pulmonar aguda inducida por bleomicina.

25 **G. Ejemplo 7: Anti-integrina $\beta 8$ reduce la expresión de Coll**

La producción de MEC aumentada y contractilidad de fibroblastos aumentada son distintivos de respuestas fibróticas vistas en engrosamiento de la pared de las vías respiratorias y aumento de colágeno de tipo I (Coll) y Actina de Músculo Liso (α -SMA). Se usó anti- $\beta 8$ neutralizante para evaluar la contribución de la activación de TGF- β mediada por $\alpha v\beta 8$ autocrina a la respuesta profibrótica. El tratamiento de fibroblastos de las vías respiratorias con anticuerpos de bloqueo de $\beta 8$ inhibió la expresión de α -SMA y la secreción de Coll, lo que indica que la activación mediada por $\alpha v\beta 8$ de TGF- β influye en el fenotipo de miofibroblastos. El cocultivo de fibroblastos de las vías respiratorias con células epiteliales bronquiales humanas metaplásicas escamosas condujo a un aumento en la expresión de proteína Coll por fibroblastos de las vías respiratorias, que era dependiente de IL-1 β y fibroblasto $\beta 8$. El aumento en la expresión de Coll pudo inhibirse casi completamente por la transfección de fibroblastos de las vías respiratorias con ARNip de $\beta 8$, lo que indica que la inhibición de la activación mediada por $\beta 8$ de TGF β puede reducir las respuestas profibróticas y aliviar las afecciones fibróticas.

40 **H. Ejemplo 8: Expresión de integrina $\beta 8$ en fibroblastos EPOC**

Se detectó expresión de integrina $\beta 8$ en fibroblastos de los pulmones de pacientes con EPOC humanos usando tinción tisular y cultivo primario, y fue mayor que en tejido sin EPOC. La expresión de integrina $\beta 8$ también aumentó significativamente en fibroblastos aislados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, en comparación con fibroblastos de pacientes normales. Los fibroblastos con EPOC tienen expresión de proteína integrina $\alpha v\beta 8$ dependiente de IL-1 β aumentada, en comparación con fibroblastos de pulmón normales. Estos datos demuestran que $\alpha v\beta 8$ es tanto una diana corriente abajo como un mediador patológico de la actividad de IL-1 β .

Los anticuerpos anti- $\beta 8$ descritos en el presente documento (por ejemplo, 37E1B5, 14E5 y 11E8) pueden usarse terapéuticamente y/o como diagnóstico en enfermedades en las que se expresa integrina $\beta 8$, e IL-1 β y/o TGF- β desempeñan un papel patológico.

50 **I. Ejemplo 9: El anticuerpo neutralizante de integrina $\beta 8$ reduce inflamación de las vías respiratorias inducida**

El clon de BAC humano RP11-431K20 se usó para generar ratones transgénicos que expresaban integrina $\beta 8$ humana (ITGB8). Estos ratones se criaron para generar ratones con un alelo funcional de *itgb8* de ratón para generar una generación F1 de ratones con ITGB8 humana y una copia funcional de *itgb8* de ratón. Estos ratones se cruzaron para generar una generación F2 que dio como resultado BAC ITGB8 viables, es decir, ratones *itgb8* -/- con solamente una copia humana del gen, lo que demuestra rescate de la letalidad de *itgb8* -/- con ITGB8 humana.

60 Estos ratones se usaron para inducir remodelación de las vías respiratorias usando un modelo de suministro de IL-1 β adenovírica intratraqueal. En este modelo, se induce de forma reproducible remodelación de las vías respiratorias robusta con un perfil inmunológico similar a enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) humana.

El anticuerpo 37E1B5, a una dosis de 7 mg/kg, bloqueó significativamente la inflamación de las vías respiratorias, con una reducción significativa en neutrófilos en el lavado broncoalveolar. Histológicamente, la inflamación de la pared de las vías respiratorias y fibrosis se redujo significativamente por 37E1B5. Además, la supresión específica de fibroblastos de *itgb8* puede inhibir significativamente la remodelación de las vías respiratorias inducida por IL-1 β adenovérica.

También se usaron ratones con supresión específica de fibroblastos de *itgb8* para estudiar la remodelación de las vías respiratorias alérgica (inflamación de las vías inflamatorias inducida por ovoalbúmina, fibrosis y metaplasia mucosa). La remodelación se redujo en gran medida en los ratones *itgb8*^{-/-} en comparación con tipo silvestre. El modelo alérgico también depende tanto de IL-1B como de TGF- β . Estos datos muestran que *itgb8* desempeña un papel en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa mediadas por IL-1 β y TGF- β . IL-1 β provoca un aumento en la integrina $\beta 8$ en múltiples tipos celulares, incluyendo fibroblastos de las vías respiratorias y el pulmón, y astrocitos, y se observa expresión de $\beta 8$ inducida por IL-1 β tanto en ratones como en seres humanos.

J. Ejemplo 10: Los condrocitos articulares humanos expresan integrina $\alpha\beta 8$

Se recogió cartílago articular adulto del espacio de la articulación de la rodilla de un paciente que se sometió a reparación opcional de una rodilla para osteoartritis crónica. Se cultivaron condrocitos primarios hasta una confluencia del 70 % y se determinó la expresión del receptor de integrina por tinción celular y citometría de flujo. Los anticuerpos usados fueron anti- $\beta 8$ (37E1B5) y anti- $\beta 6$ (E7P6). Se detectó tinción robusta con 37E1B5 y no se vio tinción con E7P6. Los condrocitos primarios se co-cultivaron con células indicadoras de TGF β TMLC (Annes *et al.* (2004) J. Cell Biol. 165: 723) en un bioensayo de TGF β en presencia o ausencia de anti- $\beta 8$ (37E1B5) o anti- $\beta 6$. Anti- $\beta 8$ produjo un bloqueo robusto de la activación de TGF β mientras que anti- $\beta 6$ no produjo dicho efecto.

Los resultados indican no solamente que $\alpha\beta 8$ se expresa en condrocitos, sino que la expresión da como resultado activación de TGF β . Por lo tanto, puede usarse inhibición de $\alpha\beta 8$ para tratar trastornos del cartílago relacionados con TGF β activado, tales como artritis y fibrosis sinovial (véase, por ejemplo, Bakker *et al.* (2001) Osteoarthritis and Cartilage 9: 128).

K. Ejemplo 11: Las células estrelladas hepáticas expresan $\alpha\beta 8$

Las células estrelladas hepáticas son células contráctiles que pueden producir colágeno en respuesta a TGF β activado, y el tipo celular parenquimatoso implicado en la fibrosis hepática. La fibrosis hepática tiene varios desencadenantes, incluyendo alcohol, drogas y anestésicos, infección (por ejemplo, hepatitis B y C), autoinmunidad, colestasis (exceso de bilis) y esteatohepatitis no alcohólica.

Se detectó expresión de integrina $\beta 8$ en los ratones transgénicos descritos anteriormente (IGTB8 humana, pero no IGTB8 de ratón) para determinar si la actividad de TGF β en el hígado puede ser una diana usando un anticuerpo específico de $\beta 8$ descrito en el presente documento.

La Figura 2 muestra que un porcentaje significativo de células estrelladas hepáticas expresa $\beta 8$, como se determina usando el anticuerpo 14E5.

L. Ejemplo 12: Los anticuerpos anti- $\beta 8$ reducen la inflamación del intestino delgado

Se observaron síntomas de enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en los ratones descritos anteriormente que expresan IGTB8 humana, pero no *itgb8* de ratón. Los síntomas incluyen pérdida de peso y agrandamiento e inflamación del intestino delgado, así como escoliosis. La Figura 3 muestra la selección de células inmunitarias en los intestinos de estos ratones. La Figura 3A muestra parámetros de selección generales, mientras que las Figuras 3B-3E muestran el patrón de expresión de $\beta 8$ en linfocitos B CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos NK, respectivamente. Los linfocitos NK no expresaron $\beta 8$ a un nivel detectable. Las células dendríticas de los intestinos de los ratones con IGTB8 también mostraron expresión de $\beta 8$.

Los ratones con IGTB8 se usaron por lo tanto para determinar el efecto del anticuerpo anti- $\beta 8$ 37E1B5 *in vivo*. Los ratones transgénicos para IGTB8 se trataron con 3 mg de 37E1B5/kg, administrado IP dos veces por semana durante 8 semanas. La Figura 4 muestra que el tratamiento con el anticuerpo 37E1B5 redujo significativamente el alargamiento del intestino delgado asociado con inflamación. La Figura 5 ilustra adicionalmente el efecto del tratamiento con anticuerpo, comparando un segmento de intestino tomado de un ratón con IGTB8, de control (no tratado) con el de un ratón tratado con anticuerpo (B5).

M. Ejemplo 13: Los anticuerpos 4F1 y 6B9 se unen con $\beta 8$ humana en células y tejido fijos

Los clones de hibridoma 4F1 y B69 tiñen específicamente células de riñón embrionario 294 incluidas en parafina fijadas en formalina transfectadas por *ITGB8* y cerebros de ratones transgénicos (Tg) *ITGB8* BAC. Se fijaron células

293 transfectadas de forma estable que expresaban integrina $\alpha\beta 8$ humana (293 B8) o no (293 WT) durante una noche en formalina tamponada al 10 %, se sedimentaron y después se incluyeron en tapones de agarosa y se enviaron para procesamiento tisular rutinario, inclusión en parafina y corte. Se procesaron muestras de cerebro de ratones *ITGB8* BAC Tg de una manera similar. Se realizó inmunotinción usando recuperación de antígeno por calor y se detectaron anticuerpos usando un kit comercial (Dako). Se usó 6B9 a 25 $\mu\text{g/ml}$ con recuperación de antígeno por calor a 102 °C durante 10 minutos. Se usó 4F1 a 50-100 $\mu\text{g/ml}$ con recuperación de antígeno por calor a 95 °C durante 10 minutos. Los resultados en la Figura 6 muestran que los anticuerpos son específicos para $\beta 8$ y pueden unirse con $\beta 8$ en tejido fijo.

Para el clon de hibridoma 4F1, se fijaron cerebros o pulmones de ratones *ITGB8* BAC Tg de tipo silvestre (WT) durante una noche en formalina tamponada al 10 % y se enviaron para procesamiento tisular, inclusión en parafina y corte. Se realizó inmunotinción usando la misma recuperación de antígeno por calor que se usó anteriormente, y se detectaron anticuerpos usando un kit comercial. Los resultados se muestran en la Figura 7.

N. Ejemplo 14: Los anticuerpos 6B9 y 4F1 pueden distinguir células con diferentes números de copias genómicas de $\beta 8$

El clon de hibridoma 6B9 puede unirse con $\beta 8$ en tejido fijo, y detectar la variación en el número de copias. La Figura 8 muestra inmunotinción de cerebro de ratón transgénico (Tg) *ITGB8* BAC incluido en parafina, fijado en formalina. Se fijaron cerebros de ratones *ITGB8* BAC Tg o WT durante una noche en formalina tamponada al 10 % y se enviaron para procesamiento tisular rutinario, inclusión en parafina y corte. Se realizó inmunotinción como se ha descrito anteriormente. Se muestran tres líneas de ratones Tg (B, C y D) en comparación con WT, que expresan 1 copia (D---línea BAC/WT), 2 copias (B y C---línea BAC/WT; D---línea BAC/BAC) o 4 copias (B y C---línea BAC/BAC).

De forma similar, un IgG monoclonal recombinante de conejo derivado de los dominios variables de 4F1 puede detectar la variación en el número de copias. La Figura 9 muestra los resultados de la inmunotinción de pulmón de ratón transgénico (Tg) *ITGB8* BAC incluido en parafina, fijado en formalina. Se fijaron pulmones de ratones *ITGB8* BAC Tg o WT durante una noche en formalina tamponada al 10 % y se enviaron para procesamiento tisular, inclusión en parafina y corte. Se realizó inmunotinción como se ha descrito anteriormente. Se muestran tres líneas de ratones Tg (B, C y D) en comparación con WT, que expresan 1 copia (D---línea BAC/WT), 2 copias (B y C---línea BAC/WT, D---línea BAC/BAC) o 4 copias (B y C---línea BAC/BAC).

Los anticuerpos 4F1 y 6B9 pueden detectar diferencias en la expresión entre una y dos copias de *ITGB8* en tejidos incluidos en parafina fijados en formalina aislados de ratones BAC *ITGB8*. Estos anticuerpos son por lo tanto potencialmente útiles como agentes de diagnóstico para detectar el aumento de la expresión de $\beta 8$, como diagnóstico adjunto a anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, 37E15B, 11E8 y fragmentos de unión a $\beta 8$ y variantes de afinidad madurada de los mismos).

O. Ejemplo 15: Detección de $\beta 8$ en tejido de pulmón patológico humano fijo

IgG monoclonal recombinante de conejo derivado de los dominios variables del clon 4F1 puede detectar la expresión de $\alpha\beta 8$ por inmunotinción de pulmón fibrótico humano incluido en parafina fijado en formalina. Se obtuvieron muestras de ensayo de pulmón humano de tejido de patología quirúrgica de un paciente con enfisema y tejido cicatricial subpleural. El tejido se fijó durante una noche en formalina tamponada al 10 % y se envió para procesamiento tisular, inclusión en parafina y corte. Se realizó inmunotinción como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 10. Las flechas indican tinción de células fusiformes, que representan fibroblastos incluidos en tejido conectivo fibroso denso.

P. Ejemplo 16: Mapeo de epítomos para anticuerpos 6B9 y 4F1

Se usaron construcciones de integrina $\beta 8$ quimérica, que intercambiaron secuencias de ratón en *ITGB8* humana para localizar los epítomos de unión para los anticuerpos 6B9 y 4F1. El epítomo se localizó por unión a anticuerpo, tinción de superficie celular y detección por citometría de flujo. El epítomo está incluido dentro de los aminoácidos 61-105 de la integrina $\beta 8$ humana. Los anticuerpos 6B9 y 4F1 se unen con $\beta 8$ humana, pero no con $\beta 8$ de ratón. Al menos una de las 3 diferencias de aminoácidos no conservativas o 2 diferencias de aminoácidos menores (indicadas por + en la secuencia de alineamiento) se incluyen en el epítomo de unión o afectan a la estructura tridimensional del dominio de tal modo que distingue la proteína de ratón de la humana.

Ratón	61	LGPECGWCVQEDFVSGGSGSERCDTVSSSLISKGCPVDSIEYLSVH	105
		LGPECGWCVQEDF+SGGS SERCD VS+LISKGC VDSIEY SVH	
Humana	61	LGPECGWCVQEDFISGGSRSERCDIVSNLISKGCSVDSIEYPSVH	105

SEQ ID NO: 14 representa la región de integrina $\beta 8$ humana que incluye el epítomo (aminoácidos 61-105). La SEQ ID NO: 15 representa la secuencia murina homóloga, que no se une con los anticuerpos 4F1 o 6B9. La secuencia de alineamiento está representada por SEQ ID NO: 16.

Se llevó a cabo intercambio de aminoácidos en esta región para determinar qué aminoácido o aminoácidos están incluidos en el epítipo β8. La tabla posterior indica que el resto de serina en la posición 95 de la secuencia de β8 humana está implicada en los epítipos de 6B9 y 4F1.

		% Positivo para 4F1	% Positivo para 6B9
Ratón	V G T S P (SEQ ID NO: 122)	3	6
Humana	I R I N S (SEQ ID NO: 123)	100	100
	V R I N S (SEQ ID NO: 124)	92	102
	I G I N P (SEQ ID NO: 125)	0	1
	I G I N S (SEQ ID NO: 126)	101	104

5

Q. Ejemplo 17: Caracterización de anticuerpos 6B9 y 4F1

Se obtuvieron las secuencias de región variable para 6B9, como se muestra en las SEQ ID NO: 18 y 19. Las CDR 1-3 de la cadena pesada de 6B9 son: DYLIIE, VINPETGGTNYNAKFKG y EAGNYIYAMDY, SEQ ID NO: 40-42, respectivamente. Las CDR 1-3 de la cadena ligera de 6B9 son: RASVNIYSYLV, NAKTLAE y QHHHGTPYT, SEQ ID NO: 43-45, respectivamente.

10

Se obtuvieron las secuencias de región variable para 4F1, como se muestra en la SEQ ID NO: 20 y 21. Las CDR 1-3 de la cadena pesada de 4F1 son: NYLIE, VINPGTGGTNYNKKFKV y EGNARTYYYAMDY, SEQ ID NO: 116-118, respectivamente. Las CDR 1-3 de la cadena ligera de 4F1 son: RASENIYSYLV, NAKTLAE y QHHNGTPYT, SEQ ID NO: 119-121, respectivamente.

15

R. Ejemplo 18: Caracterización de los epítipos de los anticuerpos 37E1B5, 14E5 y 11E8

Como se ha mostrado anteriormente, SEQ ID NO: 1 representa la región de integrina β8 humana que incluye el epítipo de β8 (aminoácidos 120-180) para los anticuerpos 37E1B5, 14E5 y 11E8. SEQ ID NO: 2 representa la secuencia murina homóloga, que no se une significativamente.

20

Se llevó a cabo intercambio de aminoácidos en esta región para determinar qué aminoácido o aminoácidos están incluidos en epítipo β8. La tabla a continuación indica cuáles de los aminoácidos 175-180 de SEQ ID NO: 1 están incluidos en el epítipo para cada anticuerpo

25

	% positivo para 37E1B5	% positivo para 14E5	% positivo para 11E8
RKMAFF (humana) SEQ ID NO: 127	108	112	97
KKMALY (ratón) SEQ ID NO: 128	0	0	0
RKMALY SEQ ID NO: 129	14	1	4
RKMAFY SEQ ID NO: 130	89	6	108
KKMAFY SEQ ID NO: 131	3	6	31
KKMALF SEQ ID NO: 132	31	1	3
KKMAFF SEQ ID NO: 133	116	9	115
RKMALF SEQ ID NO: 134	131	150	125

S. Ejemplo 19: Determinación de afinidad para anticuerpos Fv monocatenarios

También se determinó la afinidad de los anticuerpos desvelados, incluyendo versiones de afinidad madurada. Típicamente la Kd de afinidad de un anticuerpo monocatenario es 10-100 veces mayor que la de Ig correspondiente (es decir, el anticuerpo monocatenario tiene 10-100 veces menor afinidad que la Ig correspondiente).

30

Anticuerpo	Kd (nM) de scFv
4F1	>100
6B9	14,83
6B9Mut1	9,34
11E8	>250
11E8Mut28	3,52
11E8Mut94	3,2
11E8Mut39	21,07
14E5	13,96
14ESMut11	3,85
14E5Mut42	3,35
14E5Mut54	2,09
14E5Mut65	3,04
14E5Mut68	1,42
14E5Mut83	1,79

ES 2 643 397 T3

Anticuerpo	Kd (nM) de scFv
14E5Mut93	2,31
14E5Mut95	1,83

Listado de secuencias.txt

5 <110> The Regents of the University of California
 <120> Anticuerpos que se unen con integrina alfa-V beta-8
 <130> N402240EP
 10 <140> EP 12823966.2
 <141> 17-08-2012
 <150> US 61/524708
 <151> 17-08-2011
 15 <150> US 61/646111
 <151> 11-05-2012
 <160> 136
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 60
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítopo 37E1B5, aminoácidos 121-180
 30 <400> 1
 Gly Glu Val Ser Ile Gln Leu Arg Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met
 1 5 10 15
 Leu Lys Val His Pro Leu Lys Lys Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu
 20 25 30
 Val Asp Val Ser Ala Ser Met His Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser
 35 40 45
 Val Gly Asn Asp Leu Ser Arg Lys Met Ala Phe Phe
 50 55 60
 35 <210> 2
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> región murina homóloga sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítopo 37E1B5
 <400> 2

ES 2 643 397 T3

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

- 5 <210> 3
- <211> 60
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> secuencia de alineamiento sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5 y región homóloga de ratón
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa = Val o Ile
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)..(8)
- <223> Xaa = His o Arg
- 25 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (20)..(20)
- <223> Xaa = Arg o His
- 30 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (55)..(55)
- <223> Xaa = Lys o Arg
- 35 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (59)..(59)
- <223> Xaa = Leu o Phe
- 40 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (60)..(60)
- <223> Xaa Tyr o Phe
- <400> 3

ES 2 643 397 T3

Gly Glu Val Ser Xaa Gln Leu Xaa Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met
 1 5 10 15
 Leu Lys Val Xaa Pro Leu Lys Lys Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu
 20 25 30
 Val Asp Val Ser Ala Ser Met His Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser
 35 40 45
 Val Gly Asn Asp Leu Ser Xaa Lys Met Ala Xaa Xaa
 50 55 60

5 <210> 4
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 37E1
 <400> 4

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

15 <210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cadena ligera sintética (VL) de anticuerpo monoclonal 37E1
 <400> 5

ES 2 643 397 T3

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

Glu Arg Val Thr Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 **25** **30**

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 **40** **45**

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 **55** **60**

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 **70** **75** **80**

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 **90** **95**

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
100 **105**

- 5 <210> 6
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 37E1B5
- <400> 6

ES 2 643 397 T3

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

- <210> 7
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cadena ligera sintética (VL) de anticuerpo monoclonal 37E1B5
- <400> 7

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

ES 2 643 397 T3

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

5 <210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 37E1B5 humanizado (Hu37E1B5)
 <400> 8

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

15 <210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 643 397 T3

<220>

<223> cadena ligera sintética (VL) de anticuerpo monoclonal 37E1B5 humanizado (Hu37E1B5)

<400> 9

5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética de anticuerpo monoclonal 11E8

<400> 10

15

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

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

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

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 643 397 T3

Ala Thr Trp Gly Trp Asp Thr Tyr Trp Asp Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5 <210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética de anticuerpo monoclonal 11E8
 <400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 12
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética de anticuerpo monoclonal 14E5
 <400> 12

ES 2 643 397 T3

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

<210> 13
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética de anticuerpo monoclonal 14E5

<400> 13

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

ES 2 643 397 T3

5
<210> 14
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región sintética de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1, aminoácidos 61-105

10
<400> 14
Leu Gly Pro Glu Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Ile Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Arg Ser Glu Arg Cys Asp Ile Val Ser Asn Leu Ile Ser Lys
20 25 30
Gly Cys Ser Val Asp Ser Ile Glu Tyr Pro Ser Val His
35 40 45

15
<210> 15
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región sintética homóloga murina de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1

20
<400> 15
Leu Gly Pro Glu Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Val Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Ser Glu Arg Cys Asp Thr Val Ser Ser Leu Ile Ser Lys
20 25 30
Gly Cys Pro Val Asp Ser Ile Glu Tyr Leu Ser Val His
35 40 45

25
<210> 16
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> secuencia de alineamiento sintética de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1 y
región homóloga de ratón

35
<220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Val o Ile

40
<220>
<221> VARIANTE
<222> (19)..(19)
<223> Xaa = Gly o Arg

45
<220>
<221> VARIANTE
<222> (25)..(25)
<223> Xaa = Thr o Ile

ES 2 643 397 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = Ser o Asn
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa = Pro o Ser
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa = Leu o Pro
 15

<400> 16

 Leu Gly Pro Glu Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Xaa Ser Gly
 1 5 10 15

 Gly Ser Xaa Ser Glu Arg Cys Asp Xaa Val Ser Xaa Leu Ile Ser Lys
 20 25 30

 Gly Cys Xaa Val Asp Ser Ile Glu Tyr Xaa Ser Val His
 35 40 45

<210> 17
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(769)
 <223> secuencia de longitud completa de integrina beta8 humana
 25

<400> 17
 30

ES 2 643 397 T3

Met Cys Gly Ser Ala Leu Ala Phe Phe Thr Ala Ala Phe Val Cys Leu
 1 5 10 15

Gln Asn Asp Arg Arg Gly Pro Ala Ser Phe Leu Trp Ala Ala Trp Val
 20 25 30

Phe Ser Leu Val Leu Gly Leu Gly Gln Gly Glu Asp Asn Arg Cys Ala
 35 40 45

Ser Ser Asn Ala Ala Ser Cys Ala Arg Cys Leu Ala Leu Gly Pro Glu
 50 55 60

Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Ile Ser Gly Gly Ser Arg Ser
 65 70 75 80

Glu Arg Cys Asp Ile Val Ser Asn Leu Ile Ser Lys Gly Cys Ser Val
 85 90 95

Asp Ser Ile Glu Tyr Pro Ser Val His Val Ile Ile Pro Thr Glu Asn
 100 105 110

Glu Ile Asn Thr Gln Val Thr Pro Gly Glu Val Ser Ile Gln Leu Arg
 115 120 125

ES 2 643 397 T3

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

ES 2 643 397 T3

Phe Asn Ile Thr Ala Ile Cys Pro Asp Gly Ser Arg Lys Pro Gly Met
 405 410 415
 Glu Gly Cys Arg Asn Val Thr Ser Asn Asp Glu Val Leu Phe Asn Val
 420 425 430
 Thr Val Thr Met Lys Lys Cys Asp Val Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala
 435 440 445
 Ile Ile Lys Pro Ile Gly Phe Asn Glu Thr Ala Lys Ile His Ile His
 450 455 460
 Arg Asn Cys Ser Cys Gln Cys Glu Asp Asn Arg Gly Pro Lys Gly Lys
 465 470 475 480
 Cys Val Asp Glu Thr Phe Leu Asp Ser Lys Cys Phe Gln Cys Asp Glu
 485 490 495
 Asn Lys Cys His Phe Asp Glu Asp Gln Phe Ser Ser Glu Ser Cys Lys
 500 505 510
 Ser His Lys Asp Gln Pro Val Cys Ser Gly Arg Gly Val Cys Val Cys
 515 520 525
 Gly Lys Cys Ser Cys His Lys Ile Lys Leu Gly Lys Val Tyr Gly Lys
 530 535 540
 Tyr Cys Glu Lys Asp Asp Phe Ser Cys Pro Tyr His His Gly Asn Leu
 545 550 555 560
 Cys Ala Gly His Gly Glu Cys Glu Ala Gly Arg Cys Gln Cys Phe Ser
 565 570 575
 Gly Trp Glu Gly Asp Arg Cys Gln Cys Pro Ser Ala Ala Ala Gln His
 580 585 590
 Cys Val Asn Ser Lys Gly Gln Val Cys Ser Gly Arg Gly Thr Cys Val
 595 600 605
 Cys Gly Arg Cys Glu Cys Thr Asp Pro Arg Ser Ile Gly Arg Phe Cys
 610 615 620
 Glu His Cys Pro Thr Cys Tyr Thr Ala Cys Lys Glu Asn Trp Asn Cys
 625 630 635 640
 Met Gln Cys Leu His Pro His Asn Leu Ser Gln Ala Ile Leu Asp Gln
 645 650 655
 Cys Lys Thr Ser Cys Ala Leu Met Glu Gln Gln His Tyr Val Asp Gln
 660 665 670

ES 2 643 397 T3

Thr Ser Glu Cys Phe Ser Ser Pro Ser Tyr Leu Arg Ile Phe Phe Ile
 675 680 685
 Ile Phe Ile Val Thr Phe Leu Ile Gly Leu Leu Lys Val Leu Ile Ile
 690 695 700
 Arg Gln Val Ile Leu Gln Trp Asn Ser Asn Lys Ile Lys Ser Ser Ser
 705 710 715 720
 Asp Tyr Arg Val Ser Ala Ser Lys Lys Asp Lys Leu Ile Leu Gln Ser
 725 730 735
 Val Cys Thr Arg Ala Val Thr Tyr Arg Arg Glu Lys Pro Glu Glu Ile
 740 745 750
 Lys Met Asp Ile Ser Lys Leu Asn Ala His Glu Thr Phe Arg Cys Asn
 755 760 765

Phe

<210> 18
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética de anticuerpo monoclonal 6B9

10

<400> 18

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

15

ES 2 643 397 T3

<210> 19
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética de anticuerpo monoclonal 6B9

10

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética de anticuerpo monoclonal 4F1

20

<400> 20

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

ES 2 643 397 T3

Met Gln Leu Gly Gly Leu Thr Phe Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Asn Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética de anticuerpo monoclonal 4F1
 <400> 21

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

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

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 22
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 6B9Mut1
 <400> 22

ES 2 643 397 T3

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

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 11E8Mut28

<400> 23

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

ES 2 643 397 T3

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut11

10

<400> 24

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut42

20

<400> 25

ES 2 643 397 T3

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

5 <210> 26
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut54
 <400> 26

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

15 <210> 27
 <211> 108

ES 2 643 397 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut68

<400> 27

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

10 <210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut65

20 <400> 28

ES 2 643 397 T3

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

<210> 29
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut83

10

<400> 29

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

15

ES 2 643 397 T3

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut95

10

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 6B9Mut1

20

<400> 31

ES 2 643 397 T3

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

<210> 32
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 11E8Mut94

<400> 32

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

ES 2 643 397 T3

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

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5 <210> 33
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut11
 <400> 33

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

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

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly Trp Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

15 <210> 34
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut42
 <400> 34

ES 2 643 397 T3

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

5 <210> 36
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut68
<400> 36

ES 2 643 397 T3

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

5

<210> 37
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut65
 <400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Asn
 20 25 30

ES 2 643 397 T3

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

5 <210> 38
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut83
 <400> 38

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

15 <210> 39
 <211> 115
 <212> PRT

ES 2 643 397 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut95

5

<400> 39

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

10

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 6B9

<400> 40

Asp Tyr Leu Ile Glu
1 5

20

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 6B9

30

<400> 41

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

Gly

5 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 6B9
 <400> 42

Glu Ala Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 6B9
 <400> 43

Arg Ala Ser Val Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Val
 1 5 10

25 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 6B9
 <400> 44

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5

35 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 6B9
 <400> 45

Gln His His His Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5

45 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT

50

ES 2 643 397 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 6B9 de afinidad madurada (6B9Mut1)

<400> 46

Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

10

<210> 47

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 6B9 de afinidad madurada (6B9Mut1)

20

<400> 47

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys
20

25

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 11E8

<400> 48

Ser Tyr Trp Ile Glu
1 5

35

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 11E8

<400> 49

45

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 50

ES 2 643 397 T3

<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> región variable de cadena pesada sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 11E8

<400> 50

Trp Gly Trp Asp Thr Tyr
1 5

10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 11E8

20 <400> 51

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

25 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 11E8

<400> 52

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

35

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 11E8

<400> 53

45

Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr Thr
1 5

50 <210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> región variable de cadena pesada sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut28 y 11E8Mut94)

<400> 54

ES 2 643 397 T3

Trp Gly Trp Asp Ser Tyr
1 5

5 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut28)

<400> 55

Gln Gln Phe Ser Asn Leu Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut28)

25 <400> 56

Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

30 <210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR4 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut28 y 11E8Mut94)

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40 <210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 14E5

50 <400> 58

Thr Tyr Trp Ile Glu
1 5

ES 2 643 397 T3

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 14E5

<400> 59

10

His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> región variable de cadena pesada sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 14E5

20

<400> 60

Trp Gly Trp Asp Ser Tyr
1 5

25

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 14E5

<400> 61

Ser Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ser Leu Asn
1 5 10

35

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 14E5

45

<400> 62

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser

1

5

50

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 643 397 T3

<220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 14E5

5 <400> 63

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr
1 5

10 <210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut11, 14E5Mut54 y 14E5Mut65)

<400> 64

Thr Asn Trp Ile Glu
1 5

20 <210> 65
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut11)

<400> 65

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

35 <210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65 y 14E5Mut83)

<400> 66

45 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

50 <210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut11)

<400> 67

ES 2 643 397 T3

Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr Thr
1 5

5 <210> 68
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut11 y 14E5Mut83)

<400> 68

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

15 <210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR2 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut11, 14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83 y 14E5Mut95)

25 <400> 69

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Thr Tyr
1 5 10 15

30 <210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut42, 14E5Mut54, 14E5Mut68, 14E5Mut65, 14E5Mut83 y 14E5Mut95)

<400> 70

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

40 <210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut42, 14E5Mut83 y 14E5Mut95)

50 <400> 71

ES 2 643 397 T3

Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr Thr
1 5

5 <210> 72
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut42)

<400> 72

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

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

15 <210> 73
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut42)

25 <400> 73

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

30 <210> 74
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut54)

<400> 74

Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

40 <210> 75
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 643 397 T3

<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut54)

<400> 75

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Arg Cys
20

<210> 76

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut68)

<400> 76

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut68)

30

<400> 77

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

35

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut68)

<400> 78

Arg Ala Thr Val Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln
1 5 10 15

45

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 79

ES 2 643 397 T3

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut68)

10 <400> 79

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
 20

15 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut65)

<400> 80

Gln Gln Phe Ser Asn Leu Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 81
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut65)

35 <400> 81

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

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

40 <210> 82
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut65)

<400> 82

ES 2 643 397 T3

Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

5 <210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut83)

<400> 83

Thr His Trp Ile Glu
 1 5

15 <210> 84
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut83)

25 <400> 84

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

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

30 <210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut95)

<400> 85

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

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

40 <210> 86
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

ES 2 643 397 T3

<220>

<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut95)

5

<400> 86

Lys Ala Val Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

10

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 14E5 de afinidad madurada (14E5Mut95)

20

<400> 87

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

25

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 11E8Mut94

<400> 88

ES 2 643 397 T3

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

<210> 89
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 11E8Mut94

<400> 89

ES 2 643 397 T3

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

5 <210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut94)
 <400> 90

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 91
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR2 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut94)
 25 <400> 91

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Phe Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

30 <210> 92
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 643 397 T3

<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut94)

<400> 92

5

Arg Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 93

<211> 23

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut94)

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

20

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 37E1, 37E1B5 y Hu37E1B5

<400> 94

30

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 95

<211> 17

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 37E1, 37E1B5 y Hu37E1B5

<400> 95

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

45

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

ES 2 643 397 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 37E1, 37E1B5 y Hu37E1B5

5

<400> 96

Leu Ile Thr Thr Glu Asp Tyr
1 5

10

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 37E1, 37E1B5 y Hu37E1B5

<400> 97

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu
1 5 10

20

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 37E1

30

<400> 98

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

35

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 37E1, 37E1B5 y Hu37E1B5

<400> 99

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

45

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 37E1B5 y Hu37E1B5

<400> 100

55

Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

ES 2 643 397 T3

<210> 101
 <400> 101 000
 5
 <210> 102
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 11E8Mut39
 <400> 102
 15
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly His Thr Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Arg Pro Ser Asn Thr Ser Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Gly Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Trp Gly Trp Asp Thr Tyr Trp Asp His Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 103
 <400> 103 000
 20
 <210> 104
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 11E8Mut39
 <400> 104
 30

ES 2 643 397 T3

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

5 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)
 <400> 105

Ser Thr Ser Gln Asp Val Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

15 <210> 106
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)
 25 <400> 106

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

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

30 <210> 107
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 643 397 T3

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)

<400> 107

5

Tyr Ala Ser Asn Leu His Ser
1 5

<210> 108

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR4 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)

<400> 108

Trp Asp His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

20

<210> 109

<400> 109 000

25

<210> 110

<400> 110 000

30

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 111

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
1 5 10

40

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)

50

<400> 112

Thr Tyr Trp Ile Glu
1 5

55

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 643 397 T3

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)

<400> 113

5

His Thr Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> región marco conservada de cadena pesada sintética FR3 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)

<400> 114

Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Arg Pro Ser Asn Thr Ser Tyr Met Gln
1 5 10 15

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

20

<210> 115

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región marco conservada de cadena ligera sintética FR1 de anticuerpo monoclonal 11E8 de afinidad madurada (11E8Mut39)

30

<400> 115

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

35

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 4F1

<400> 116

Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5

45

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

ES 2 643 397 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 4F1

5

<400> 117

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

Val

10

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> región variable de cadena pesada sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 4F1

<400> 118

Glu Gly Asn Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR1 de anticuerpo monoclonal 4F1

30

<400> 119

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Val
1 5 10

35

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR2 de anticuerpo monoclonal 4F1

<400> 120

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

45

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera sintética CDR3 de anticuerpo monoclonal 4F1

55

<400> 121

ES 2 643 397 T3

Gln His His Asn Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

5 <210> 122
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región sintética homóloga murina de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1
<400> 122

Val Gly Thr Ser Pro
1 5

15 <210> 123
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región sintética de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1
<400> 123

Ile Arg Ile Asn Ser
1 5

25 <210> 124
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región sintética de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1 con intercambio de aminoácidos
<400> 124

Val Arg Ile Asn Ser

1 5

40 <210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> región sintética de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1 con intercambio de aminoácidos

50 <400> 125

Ile Gly Ile Asn Pro
1 5

<210> 126

ES 2 643 397 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> región sintética de integrina beta8 humana que incluye el epítipo 6B9 y 4F1 con intercambio de aminoácidos

10 <400> 126

Ile Gly Ile Asn Ser
1 5

15 <210> 127
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8
<400> 127

Arg Lys Met Ala Phe Phe
1 5

25 <210> 128
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> región sintética homóloga murina de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8

35 <400> 128

Lys Lys Met Ala Leu Tyr
1 5

40 <210> 129
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8 con intercambio de aminoácidos

<400> 129

Arg Lys Met Ala Leu Tyr
1 5

50 <210> 130
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8 con intercambio de aminoácidos

ES 2 643 397 T3

<400> 130

Arg Lys Met Ala Phe Tyr
1 5

5 <210> 131
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8 con intercambio de aminoácidos

15 <400> 131

Lys Lys Met Ala Phe Tyr
1 5

20 <210> 132
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8 con intercambio de aminoácidos

<400> 132

Lys Lys Met Ala Leu Phe
1 5

30 <210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8 con intercambio de aminoácidos

40 <400> 133

Lys Lys Met Ala Phe Phe
1 5

45 <210> 134
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> región sintética de integrina humana beta8 que incluye el epítipo 37E1B5, 14E5 y 11E8 con intercambio de aminoácidos

<400> 134

Arg Lys Met Ala Leu Phe
1 5

55

ES 2 643 397 T3

<210> 135
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> región variable de cadena pesada sintética (VH) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut93

<400> 135

10

```

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

<210> 136
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> región variable de cadena ligera sintética (VK) de anticuerpo monoclonal 14E5Mut93

20

<400> 136

ES 2 643 397 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente con integrina $\alpha v\beta 8$,
5 en el que el anticuerpo inhibe la liberación de péptido de TGF β activo, maduro, pero no inhibe significativamente la adhesión de TGF β latente con integrina $\alpha v\beta 8$ en una célula que expresa $\alpha v\beta 8$, y en el que el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo scFv.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para su uso en un método para aliviar al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma de mama en un individuo, que comprende administrar la composición al individuo.
- 15 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la afección es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o un trastorno fibrótico pulmonar.
- 20 6. Un método para diagnosticar un trastorno asociado con integrina $\alpha v\beta 8$ en un individuo, que comprende poner en contacto una célula del individuo con el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 *in vitro*, y
25 detectar la unión del anticuerpo con la célula,
en el que el trastorno asociado con integrina $\alpha v\beta 8$ se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma
30 de mama, y
en el que la unión del anticuerpo con la célula indica que el individuo tiene el trastorno asociado con integrina $\alpha v\beta 8$.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la célula está fijada.
- 35 8. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, para su uso en un método para diagnosticar un trastorno asociado con integrina $\alpha v\beta 8$ en un individuo, que comprende poner en contacto una célula del individuo con el anticuerpo *in vivo*, y
40 detectar la unión del anticuerpo con la célula,
en el que el trastorno asociado con integrina $\alpha v\beta 8$ se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma
45 de mama, y
en el que la unión del anticuerpo con la célula indica que el individuo tiene el trastorno asociado con integrina $\alpha v\beta 8$.
- 50 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para su uso en un método para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del cerebro, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma y carcinoma de mama, en el que el trastorno se diagnostica por un método de la reivindicación 6, 7 u 8.

Marco conservado 1 CDR1 Marco conservado 2 CDR2 Marco conservado 3 CDR3 Marco conservado 4

VH

37E1 (SEQ ID NO:4)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCAAAGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSITINYTSSLLKDKPFIISRDNAKNTLYLQMNKVRSEDTALYYCACLITTTEDYWGQGTSTVTVSS

37E1B5 (SEQ ID NO:6)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSITINYTSSLLKDKPFIISRDNAKNTLYLQMNKVRSEDTALYYCACLITTTEDYWGQGTSTVTVSS

Hu37E1B5 (SEQ ID NO:8)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSITINYTSSLLKDRFTIISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCASLITTTEDYWGQGTSTVTVSS

88 Marco conservado 1 CDR1 Marco conservado 2 CDR2 Marco conservado 3 CDR3 Marco conservado 4

VL

37E1w (SEQ ID NO:5)
 QIVLTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSYLSWYFQQKPKGKSPKTLIYRANRLVDGVPSPRFSGGSGQDYSLTISLSEYEDWGIYYCLQYDEFFPYTFGGGTTKLEIKA

37E1B5 (SEQ ID NO:7)
 QIVLTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSYLSWYFQQKPKGKSPKTLIYRANRLVDGVPSPRFSGGSGQDYSLTISLSEYEDWGIYYCLQYDEFFPYTFGGGTTKLEIKA

Hu37E1B5 (SEQ ID NO:9)
 EIVLTQSPSSLSLSPGERVTITCKASQDINSYLSWYFQQKPKGKAPKLLIYYANRLVDGVPARFSGSGGQDYTLTISLSEPEDFAVYYCLQYDEFFPYTFGGGTTKLEIKR

FIGURA 1

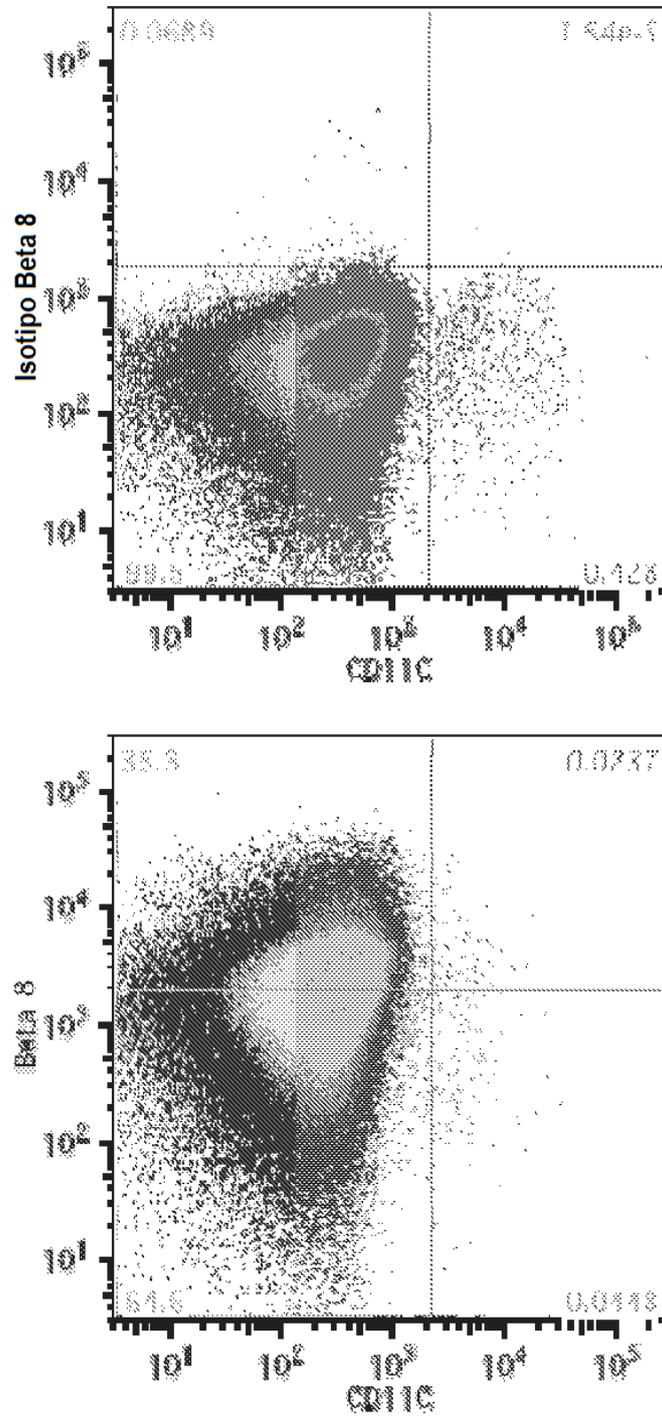
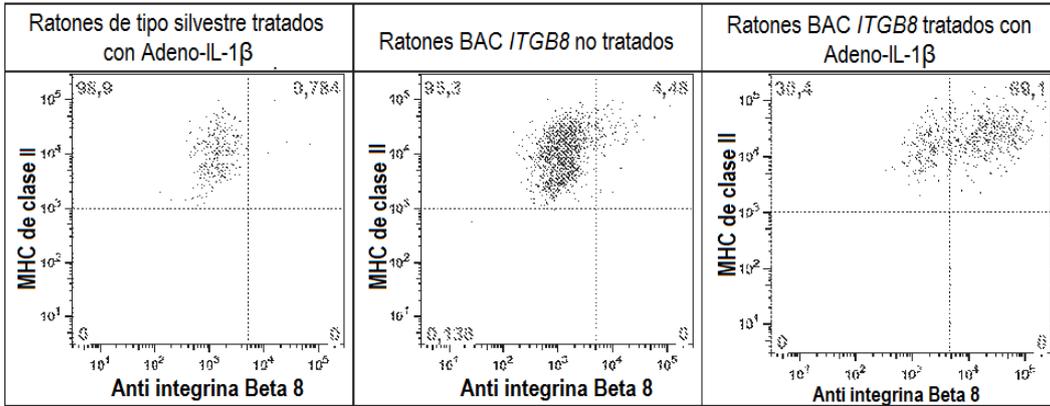
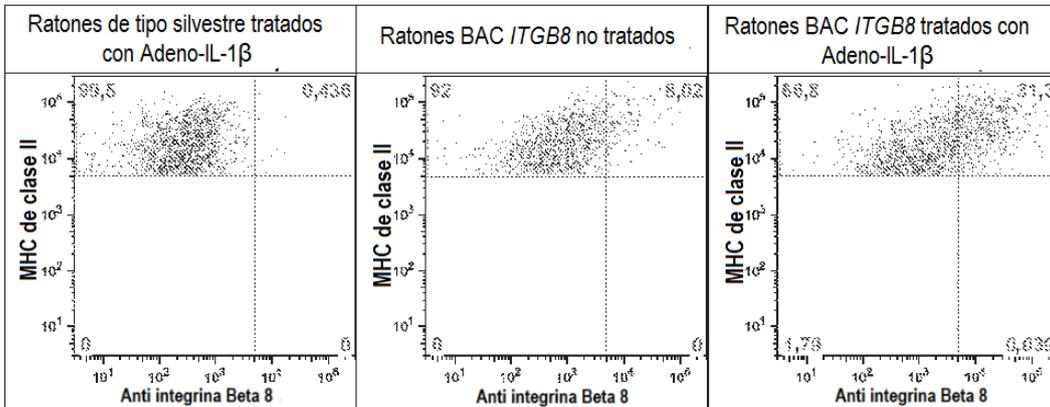


FIGURA 2

A:



B:



C:

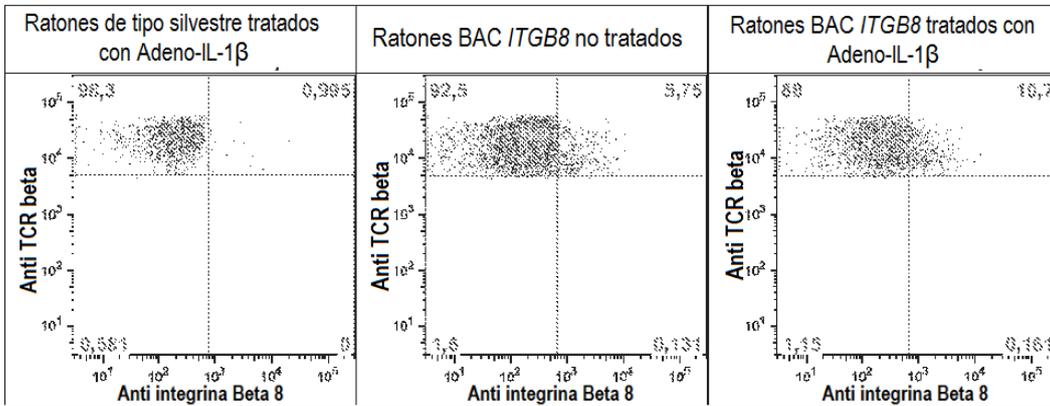
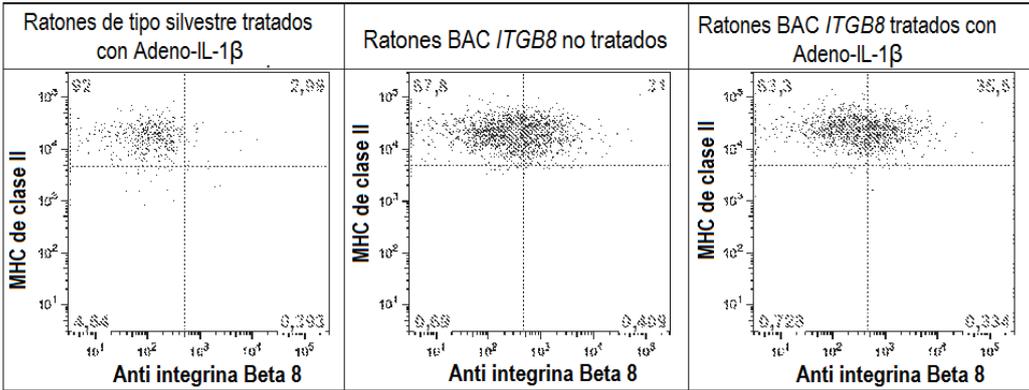
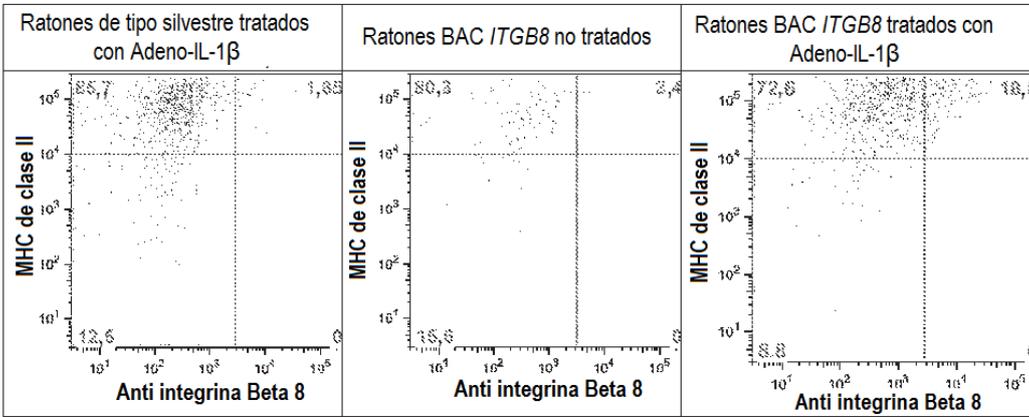


FIGURA 3

D:



E:



F:

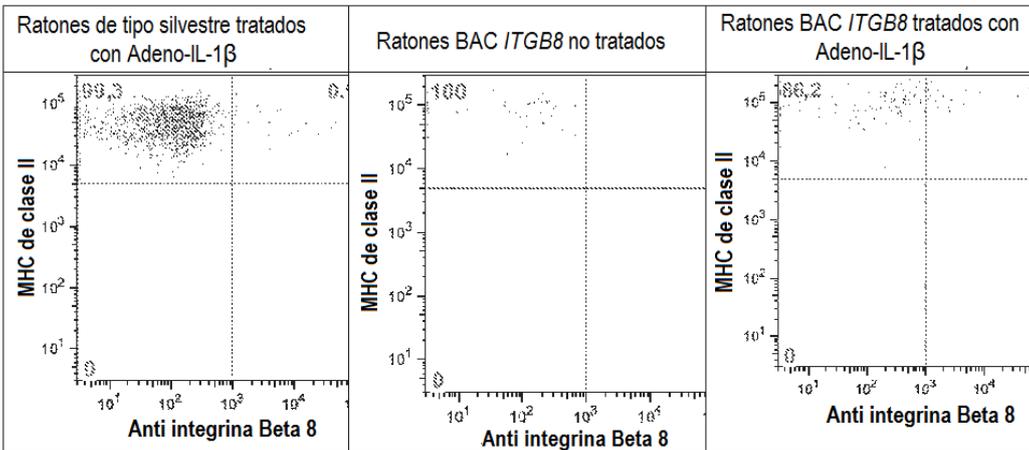


FIGURA 3 (cont.)

G: Tabla sumario

Poblaciones celulares	Pulmón	Hígado	Ganglios linfáticos	Bazo	Intestino delgado
Linfocitos T	+		+	-	+
Linfocitos B	+		+	-	+
Macrófagos	+		+	-	+
Células dendríticas	+		+	-	+
Células estrelladas	ND	+	ND	ND	ND

FIGURA 3 (cont.)

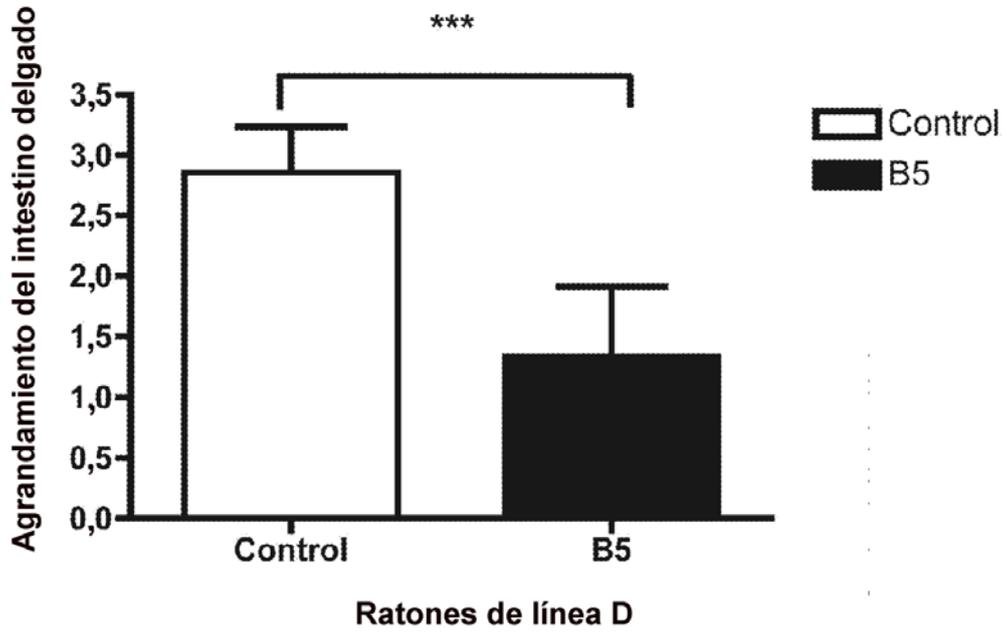


FIGURA 4

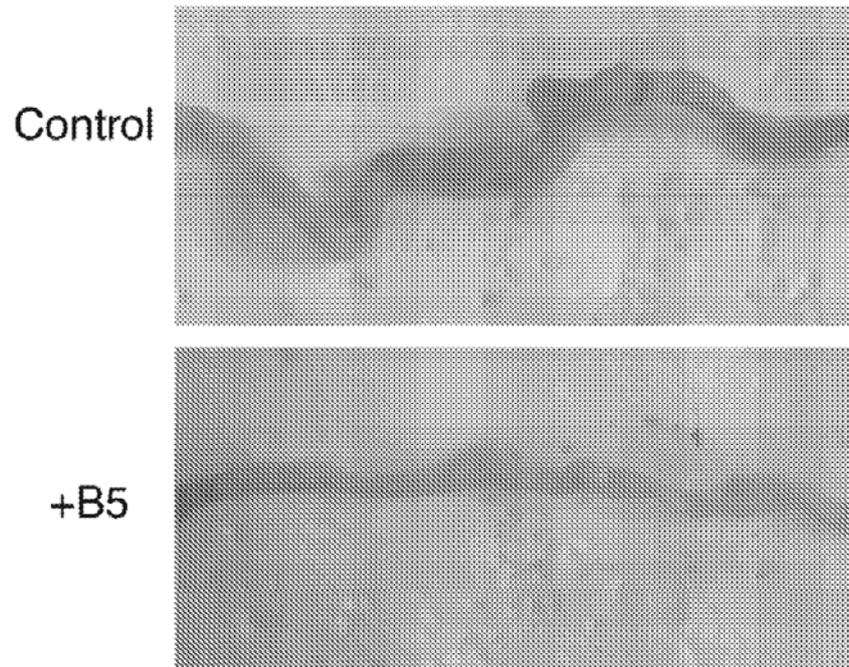


FIGURA 5

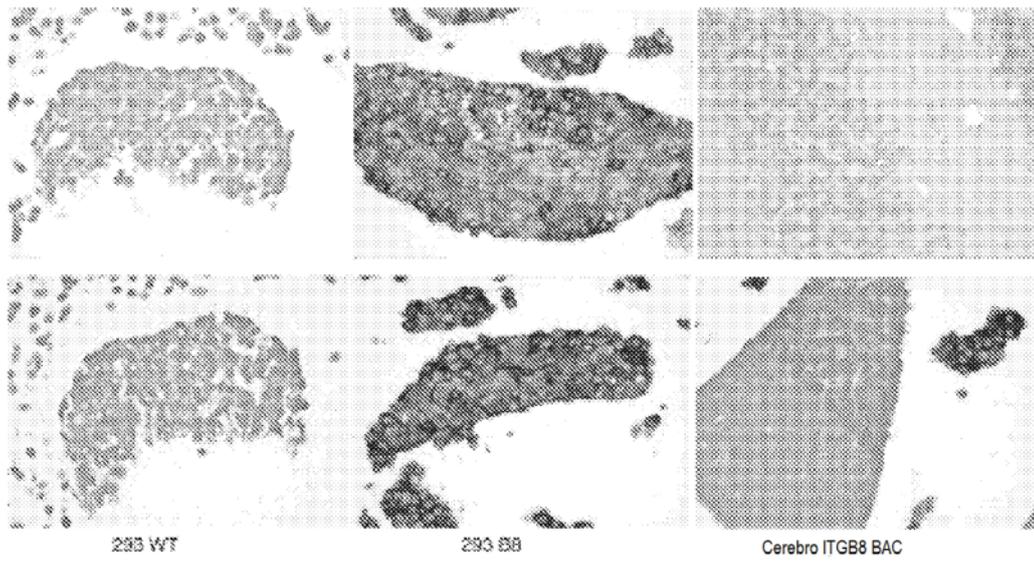


FIGURA 6

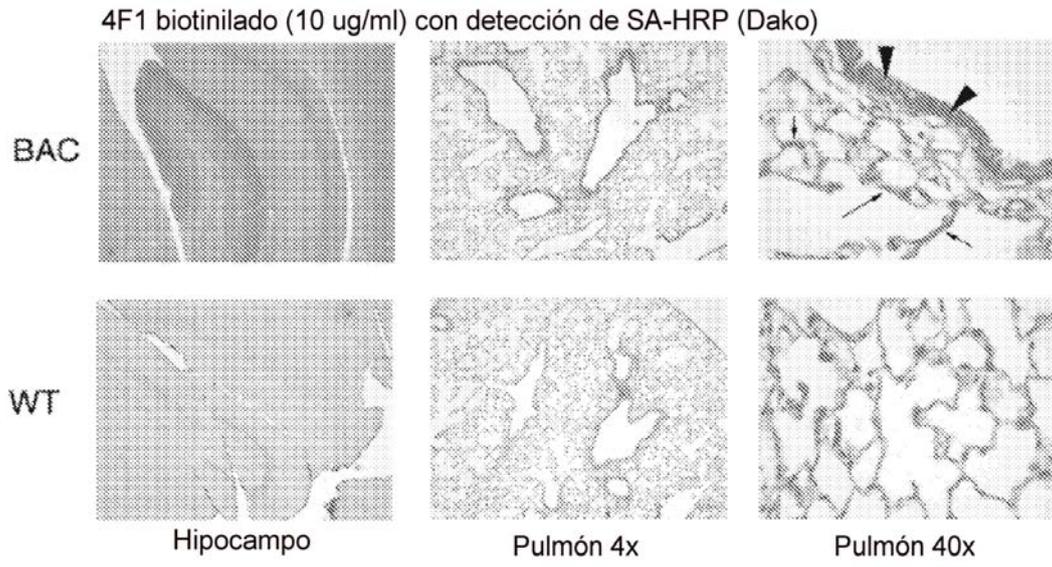
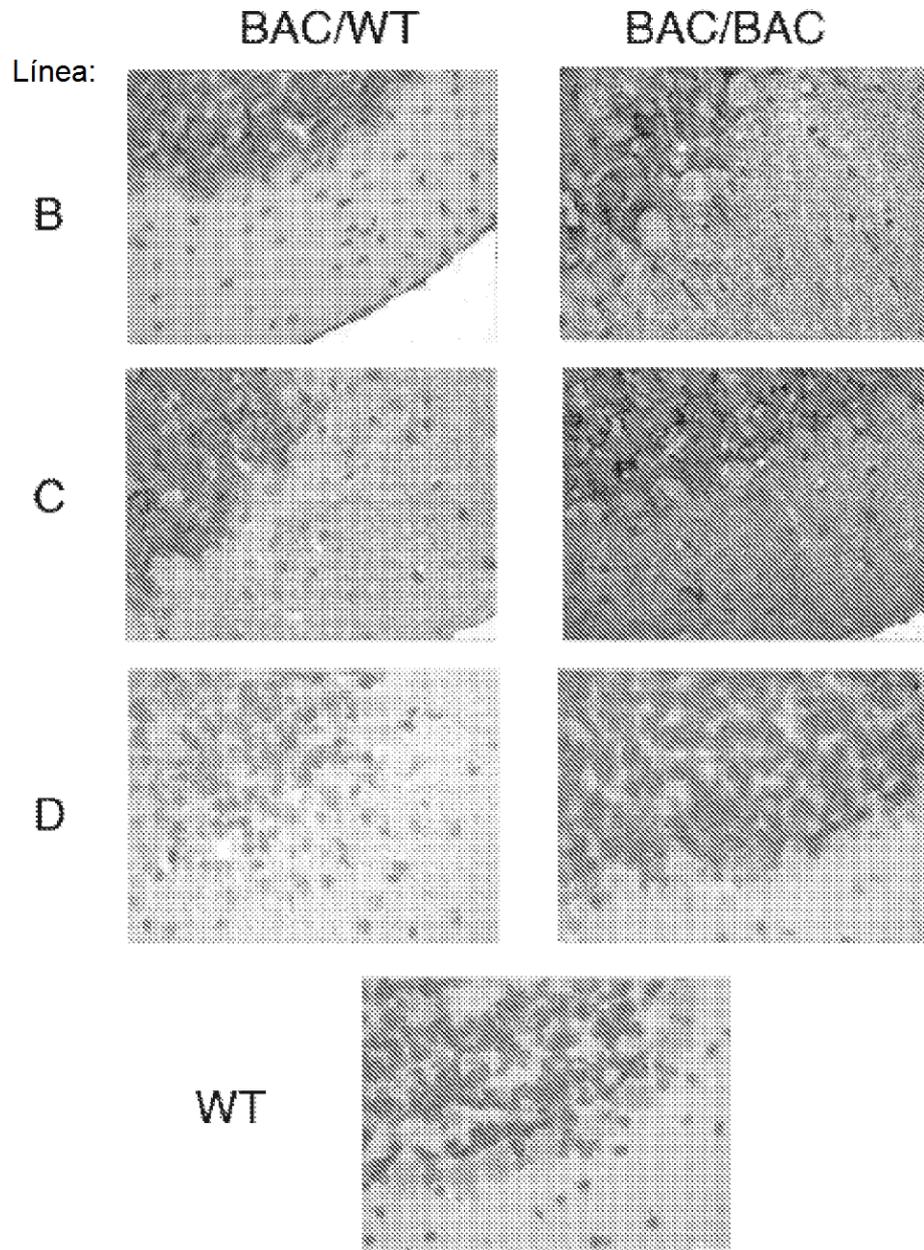


FIGURA 7



30 uM

FIGURA 8

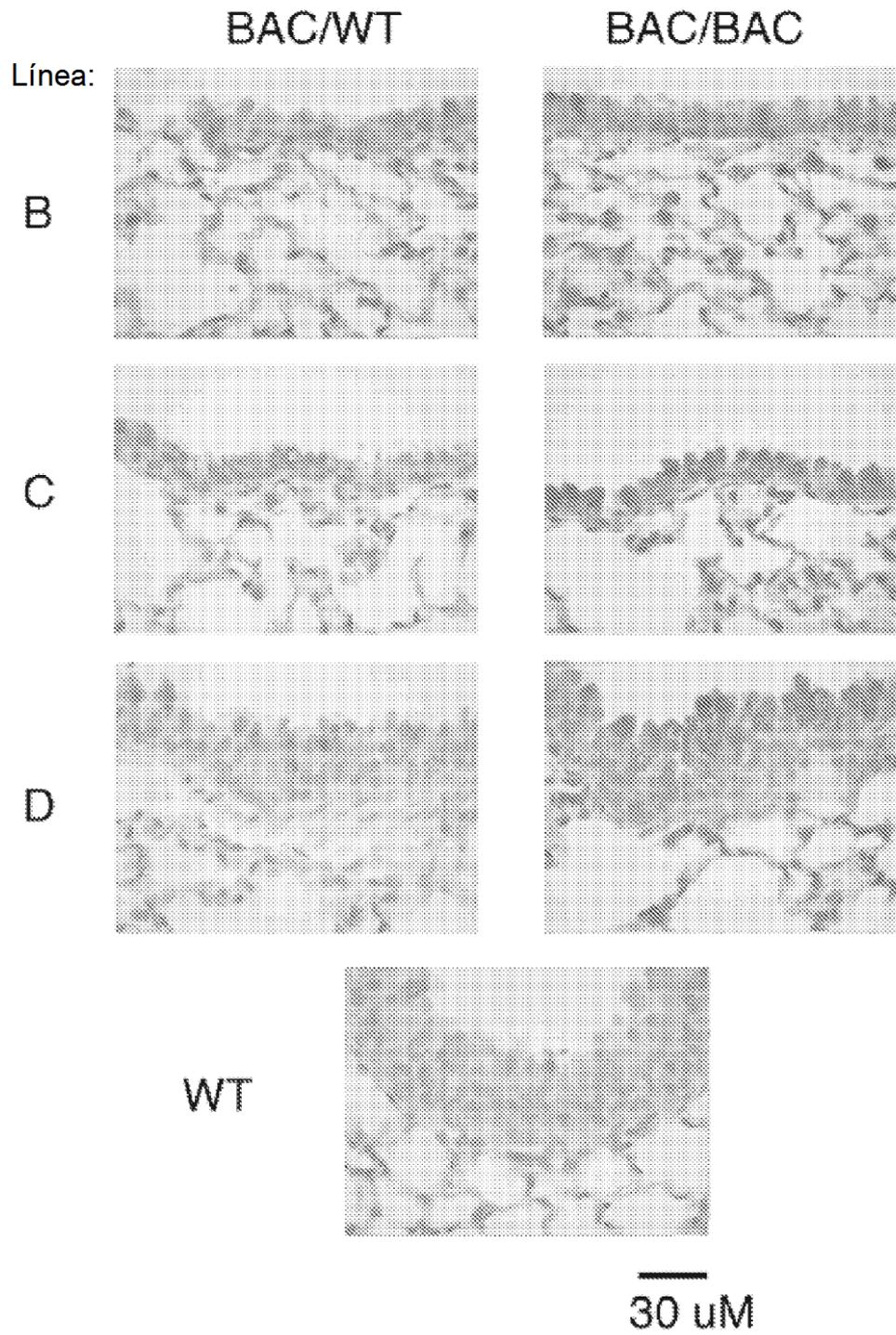


FIGURA 9

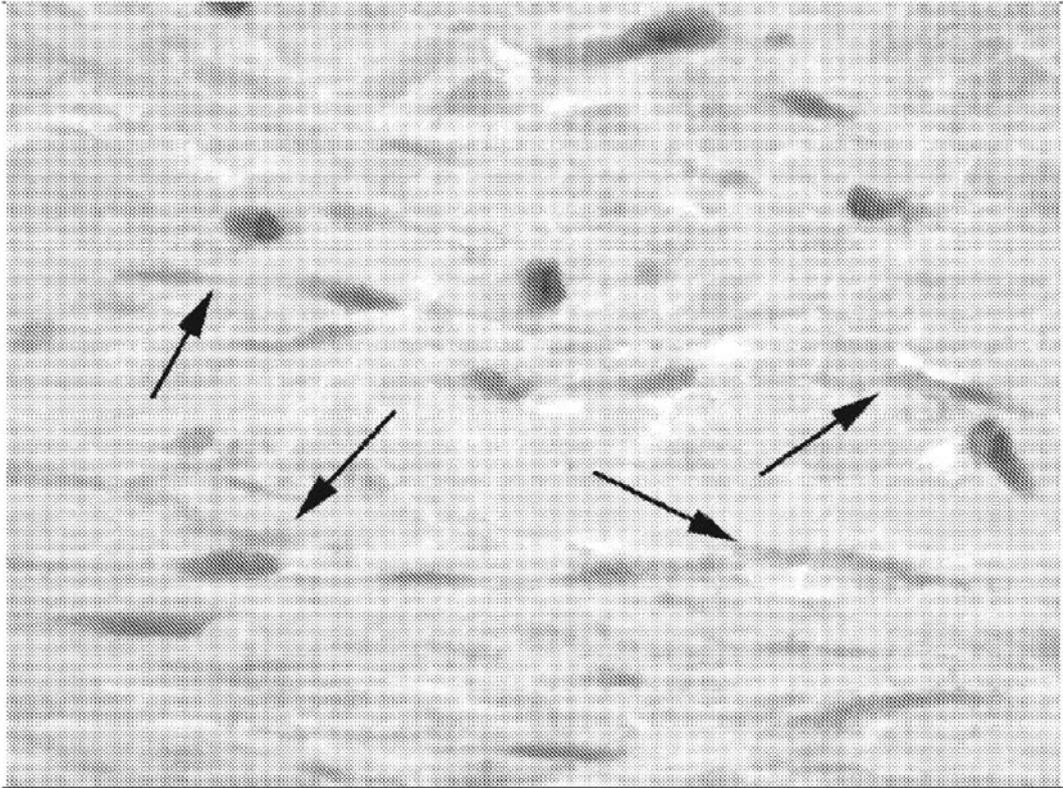


FIGURA 10

VH (cadena pesada)		Marco conservado 3	CDR3	Marco conservado 4
wt 4F1	SEQ ID NO:20	KATLTADKSSSTAYMQLGGLTFDDSAVYFCAR	EGNARTYYAMDY	WGQGTSVTVSS
wt 6B9	SEQ ID NO:18	KATLTADKSSSSAYMQLSSLTSGDSAVYFCAR	EAGNYIYAMDY	WGQGTSVTVSS
6B9Mut1	SEQ ID NO:31	KATLTADKSSSSAYMQLSSLTSGDSAVYFCAR	EAGNYIYAMDY	WGQGTSVTVSS
wt 11E8	SEQ ID NO:10	RATVTADRSSNTAYMQLSSLLTYGDSAVYYCAT	WGWDTY	WDQGTSVTVSS
11E8Mut28	SEQ ID NO:32	KAAITADTSSNTSYQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
11E8Mut94	SEQ ID NO:88	RAAITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
11E8Mut39	SEQ ID NO:102	RATITADR P SNTSYMQLSSLLTYGDSAV F YCAT	WGWDTY	WD H GTSVTVSS
wt 14E5	SEQ ID NO:12	KAAITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut11	SEQ ID NO:33	KAAITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut42	SEQ ID NO:34	KAAITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut54	SEQ ID NO:35	KAAITADTSSNTSYMQL T SLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut68	SEQ ID NO:36	RATVTADR SSNTAYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut65	SEQ ID NO:37	KAAITADTSSNTSYMQLSSLLT DD SAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut83	SEQ ID NO:38	KAAITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut93	SEQ ID NO:135	KAAITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS
14E5Mut95	SEQ ID NO:39	KAVITADTSSNTSYMQLSSLLTSEDSAVYYCAR	WGWD SY	WGQGTLLVTVSS

FIGURA 11B

VK (cadena ligera)		Seq ID	Seq ID NO	Marco conservado 1	CDR1	Marco conservado 2	CDR2
wt	4F1	SEQ ID NO: 21		DIEMTQTPASLSASVGETVTITC	RASENIYSYLV	WYQQKQKGKSPQVLIVY	NAKTLAE
wt	6B9	SEQ ID NO: 19		DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	RASVNIYSYLV	WYQQKQKGKSPQLLVH	NAKTLAE
6B9Mut1		SEQ ID NO: 22		DI V MTQSPASLSASVGETVTITC	RASVNIYSYLV	WYQQKQKGKSPQLLVH	NAKTLAE
wt	11E8	SEQ ID NO: 11		DI V MTQSPSSLSASLGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLLHS
11E8Mut28		SEQ ID NO: 23		DI V MTQSPSSLSASLGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLLHS
11E8Mut94		SEQ ID NO: 89		DI K MTQ T IPSSLSASLGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLLHS
11E8Mut39		SEQ ID NO: 104		DI E MTQSPSSLSASLGDRVTISC	ST S QD V SS S YLN	WYQQKPDGTV T LLIY	Y A SNLHS
wt	14E5	SEQ ID NO: 13		DIEMTQSPSSLSASLGDRVTISC	STSQDISSSLN	WYQQKPDGTVTLLIY	YTSNLHS
14E5Mut11		SEQ ID NO: 24		DI L MTQSPSSLSASLGDRVTISC	S A SQGIS K YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS
14E5Mut42		SEQ ID NO: 25		DI V MTQ T IPSSLSASLGDRVTISC	S A SQGIS N YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS
14E5Mut54		SEQ ID NO: 26		DI V MTQ T IPSSLSASLGDRVTIRC	S A SQGIS N YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS
14E5Mut68		SEQ ID NO: 27		DI K MTQSPSSLSASLGDRVTISC	S A SQGIS N YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS
14E5Mut65		SEQ ID NO: 28		DI K MTQSPSSLSASLGDRVTISC	S A SQGIS N YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS
14E5Mut83		SEQ ID NO: 29		DI L MTQSPSSLSASLGDRVTISC	S A SQGIS N YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS
14E5Mut93		SEQ ID NO: 136		DI M MTQSPSSLSASLGDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSLLHS
14E5Mut95		SEQ ID NO: 30		DI E MTQSPSSLSASLGDRVTISC	SBSQGIS N YLN	WYQQKPDGTV K LLIY	YTS S LLHS

FIGURA 12A

VK (cadena ligera)		Marco conservado 3	CDR3	Marco conservado 4
wt 4F1	SEQ ID NO:21	GVPSRFRSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYIC	QH H NGT P Y T	FGGGTKLEIKR
wt 6B9	SEQ ID NO:19	GVPSRFRSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYIC	QH H HG T P Y T	FGGGTKLEIKR
6B9Mut1	SEQ ID NO:22	GVPSRFRSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYIC	QH H HG T P Y T	FGGGTKLEIKR
wt 11E8	SEQ ID NO:11	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYSNLPYT	FGGGTKLEIKR
11E8Mut28	SEQ ID NO:23	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQ F SNLPYT	FGGGTKLEIKR
11E8Mut94	SEQ ID NO:89	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYSNLPYT	FGGGTKLEIKR
11E8Mut39	SEQ ID NO:104	GVPSRFRSGSGSGTDYSLA I SNLEPEDIATYYC	QQYSNLPYT	FGGGTKLEI K A
wt 14E5	SEQ ID NO:13	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYSKLPYT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut11	SEQ ID NO:24	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYSN L PYT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut42	SEQ ID NO:25	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYS D L P YT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut54	SEQ ID NO:26	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYSN L PYT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut68	SEQ ID NO:27	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYS E L P YT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut65	SEQ ID NO:28	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQ F S N L P YT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut83	SEQ ID NO:29	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYS D L P YT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut93	SEQ ID NO:136	GVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYSNLPYT	FGGGTKLEIKR
14E5Mut95	SEQ ID NO:30	GVPSRFRSGSRSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYS D L P YT	FGGGTKLEIKR

FIGURA 12B