

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 203**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2013 PCT/US2013/029334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134365**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13758033 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2822592**

54 Título: **Anticuerpos específicos del Tgf-1 y métodos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

08.03.2012 US 201261608393 P

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

19.12.2018

73 Titular/es:

**LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
LIMITED (100.0%)
666 Third Avenue
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**VAN SNICK, JACQUES;
UYTTENHOVE, CATHERINE y
BOON, THIERRY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 694 203 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 específicos del Tgf-1 y métodos y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen al factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), en particular, que reconocen el TGF-β1 humano y de ratón y no reconocen o unen el TGF-β2 o TGF-β3. Se proporcionan anticuerpos concretos que reconocen y neutralizan específicamente el TGF-β1. Estos anticuerpos son útiles en el diagnóstico y tratamiento de afecciones asociadas a TGF-β1 activado o elevado, incluyendo el cáncer, y para modular los inmunocitos y la respuesta inmune, incluyendo la respuesta inmune al cáncer
- 10 o los antígenos cancerosos. Los anticuerpos, regiones variables o secuencias de dominio CDR de los mismos, y fragmentos de los mismos de la presente invención también se pueden usar en terapia en combinación con quimioterapéuticos, inmunomoduladores, vacunas contra el cáncer, antígenos cancerosos o agentes anticancerígenos y/o con otros anticuerpos o fragmentos de los mismos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- El factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) regula procesos celulares normales tales como la proliferación, diferenciación y apoptosis, así como la capacidad de invasión y la diseminación metastásica de las células cancerosas. La familia TGF Beta incluye los factores de crecimiento transformante beta 1, 2, y 3 (TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3), que
- 20 son citoquinas sumamente pleiotrópicas que segregan virtualmente todas las células. Las moléculas de TGF-β actúan como interruptores celulares que regulan procesos tales como la función inmune, la proliferación y la transición epitelio-mesénquima. El TGF-β1 juega un papel importante en el control del sistema inmune. El TGF-β1 es liberado por algunas células T, las células T reguladoras (Treg), para inhibir las acciones de otras células T. El TGF-β1 impide la activación de las células T auxiliares y las células T citotóxicas quiescentes y puede inhibir la secreción y actividad de
- 25 citoquinas tales como el IFN-γ, la IL-2 y el TNF-α (Wahl S y col. (1988) J Immunol 140(9):3026-3032; Tiemessen M y col. (2003) Int Immunol 15(12):1495-1504; Wahl S y col. (2006) Immunol Rev 213:213-227).

TGFβ en el cáncer

- 30 El TGF-β es tanto un supresor tumoral como un promotor tumoral. De hecho, la pérdida o atenuación de la señalización del TGF-β en las células epiteliales y el estroma permite la transformación de las células epiteliales (Siegel, P.M. y Massague, J. (2003) Nat Rev Cancer 3:807-820; Bierie, B. and Moses, H.L. (2006) Nat Rev Cancer 6:506-520). Por otro lado, la introducción de receptores dominantes negativos del TGF-β en células cancerosas metastásicas ha demostrado inhibir la transdiferenciación epitelio-mesénquima, motilidad, capacidad de invasión y supervivencia, lo
- 35 que respalda el papel de promotor tumoral del TGF-β en células totalmente transformadas (examinado por Dumont, N. y Arteaga, C.L. (2003) Cancer Cell 3:531-536). Además, la producción y/o activación excesiva del TGF-β por las células cancerosas puede contribuir a la progresión tumoral mediante mecanismos que implican la modulación del microentorno tumoral (Siegel, P.M. y Massague, J. (2003) Nat Rev Cancer 3:807-820; Wakefield, L.M., y Roberts, A.B. (2002) Curr Opin Genet Dev 12:22-29; Arteaga, C.L. (2006) Curr Opin Genet Dev 16:30-37). Estos datos han
- 40 proporcionado una justificación lógica del bloqueo de la señalización autocrina/paracrina del TGF-β en los cánceres humanos con un propósito terapéutico. Algunos tumores resistentes a la quimioterapia anticancerígena convencional sobreexpresan los TGF-β (Lui, P y col. (2000) Int J Oncol 16:599-610; Teicher, B.A. y col. (1997) In Vivo 11:453-461), y los inhibidores de los TGF-β han demostrado revertir esta resistencia (Teicher, B.A. Y col. (1997) In Vivo 11:463-472). Además, se ha notificado sobreexpresión de ligandos del TGF-β en la mayoría de los cánceres, y los altos niveles
- 45 de estos en los tejidos tumorales y/o el suero están asociados a recidiva metastásica temprana y/o mala evolución del paciente (Wojtowicz-Praga, S. (2003) Invest New Drugs 21:21-32; Ito, N., y col. (1995) Cancer Lett 89:45-48; Shariat, S.F. y col. (2001) Cancer 92:2985-2992; Shariat, S.F. Y col. (2001) J Clin Oncol 19:2856-2864; Tsushima, H. y col. (2001) Clin Cancer Res 7:1258-1262; Rich, J.N. (2003) Front Biosci 8:e245-e260). Los estudios en animales con anticuerpo pan-TGF-β han demostrado inhibición de la recidiva o metástasis tumoral en el fibrosarcoma, cáncer de
- 50 colon y cáncer de mama (Terabe M y col. (2003) J Exp Med 198:1741-1752; Nam J-S y col. (2008) Cancer Res 68(10):3835-3843) y reducida aceleración inducida por la radiación del cáncer de mama metastásico (Biswas S y col. (2007) 117:1305-1313). Cabe destacar que, en estudios de radiación, la radiación torácica y la quimioterapia en modelos de cáncer de mama metastásico inducían específicamente niveles de TGF-β1 plasmáticos (Biswas S y col. (2007) 117:1305-1313).

55

TGF-β e inmunomodulación

- El tratamiento de inmunoterapia contra el cáncer efectivo depende de la inducción de una respuesta integrada y duradera a los antígenos cancerosos. Las pruebas indican que esto se puede conseguir superando el medio
- 60 inmunosupresor presente en el microentorno tumoral atribuido a la inmunosupresión mediada por TGFβ. Por ejemplo,

- el TGFβ suprime tanto el brazo innato como el adaptativo de la respuesta inmune. En lo que respecta a la respuesta inmune innata, el TGFβ modula la actividad citolítica de las células NK. Asimismo, el TGFβ también inhibe la maduración de las CD y la producción de citoquinas, favoreciendo de ese modo un entorno tolerogénico. Además, el TGFβ producido por las CD tolerogénicas contribuye a la diferenciación de las células Treg. El TGFβ también puede
- 5 favorecer la diferenciación del linaje macrófago, una célula M2, que produce altos niveles de TGFβ. El macrófago M2 compete con las CD por el antígeno, pero no las presenta. En lo que respecta a la respuesta inmune adaptativa, el TGFβ mitiga la función de las células CD8 y CD4 efectoras inhibiendo la actividad de las T auxiliares y los CTL y favoreciendo la apoptosis de las células T efectoras. Se ha demostrado que la sobreproducción de TGF-β por las células tumorales y las células supresoras derivadas de mieloides Gr1+CD11b+ lleva a la evasión de la vigilancia
- 10 inmune del huésped y a la progresión tumoral (Yang L y col. (2010) *J Bone Miner Res* 25(8):1701-1706). El TGF-β1 asociado a la membrana contribuye al bloqueo de la activación de las células T de memoria que existen en un estado anérgico en el interior del microentorno tumoral (Broderick L. y col. *Banket RB* (2006) *J Immunol* 177:3082-3088). La inhibición de los CTL mediada por TGF durante la inmunidad antitumoral funciona mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, el TGFβ inhibe directamente la función de los CTL suprimiendo la expresión de varios genes citolíticos,
- 15 incluyendo los genes que codifican la granzima A, granzima B, el IFNG y el ligando FAS. El TGFβ también atenúa la función efectora de las células T CD8 de memoria específicas de antígeno y bloquea la señalización por TCR de los linfocitos infiltrantes de tumor y altera la producción de citoquinas en las células T CD8 (Ahmadzadeh, M. y Rosenberg, S. A. (2005) *J. Immunol.* 174:5215-5223, diBari, M. G. y col. (2009) *Cancer Immunol Immunother* 58:1809-1818).
- 20 Además de desactivar la respuesta inmune, el TGFβ favorece la diferenciación de las células T reguladoras (Treg) y recluta su migración al sitio tumoral. En los cánceres humanos, los datos recogidos demuestran que las Treg CD4⁺FOXP3⁺ están presentes en sitios tumorales locales. Sato y col. han demostrado que la proporción de células T CD8⁺ a Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ es un indicador pronóstico importante, con una proporción baja asociada a una mala evolución en pacientes con cáncer ovárico, lo que indica el papel esencial de las Treg en las respuestas inmunes
- 25 antitumorales protectoras (Sato, E y col. (2005) *PNAS* 102(51):18538-18543). Teniendo en cuenta la importancia de las Treg en la supresión de las respuestas inmunes antitumorales, el control de las Treg es un objetivo importante y clínicamente relevante. El TGF beta induce el desarrollo de las células Treg. Como las Treg suprimen la inmunidad antitumoral, se evalúa una reducción en el porcentaje de Treg en la sangre periférica y el sitio tumoral como biomarcador para una terapia inmune efectiva.
- 30 El bloqueo de la señalización del TGFβ lleva a la mejora de la actividad antitumoral mediada por NK y CTL (Arteaga CL y col. (1993) *J Clin Invest* 92:2569-76; Bollard CM y col. (2002) *Blood* 99:1379-87). En estudios en ratones, se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ insensibles al TGF-β reactivas a tumor, que se hicieron insensibles mediante terapia génica mediada por retrovirales con un receptor de TGF-β dominante negativo, a ratones
- 35 inmunocompetentes era capaz de erradicar la metástasis al pulmón del cáncer de próstata en ratón (Zhang Q, y col. (2005) *Cancer Res* 65:1761-9; Zhang, Q y col. (2006) *Mol Cancer Ther* 5:1733-1743). El bloqueo genérico de la respuesta del TGF-β en ratones inhibió la metástasis en el cáncer de próstata, pero llevó a enfermedad inflamatoria generalizada en los animales (Shah AH y col. (2002) *J Immunol* 169:3485-91).
- 40 **Direccionamiento al TGFβ con anticuerpos neutralizantes para mejorar la inmunoterapia contra el cáncer**
- La evidencia de producción de TGFβ por las células tumorales y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) presentes en el sitio tumoral junto con la actividad inmunosupresora del TGFβ en el sitio tumoral respaldan claramente el hecho de que el bloqueo del TGFβ puede mejorar la captación, presentación y activación de la respuesta inmune
- 45 antitumoral al antígeno mediada por las vacunas terapéuticas. De hecho, estudios recientes han demostrado que el bloqueo del TGF-β, usando anticuerpo genérico de TGF-β de ratón 1D11 (que reconoce el TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3), mejora sinérgicamente las vacunas tumorales en modelos animales a través de las células T CD8⁺ (Terabe M y col. (2009) *Clin Cancer Res* 15:6560-6569; Takaku S y col. (2010) *Int J Cancer* 126(7):1666). La evaluación de indicadores inmunológicos tales como una activación de las células T efectoras en el interior del compartimento tumoral
- 50 en pacientes que reciben estas terapias puede servir como biomarcador o biofirma para monitorizar la muerte inmunomediada de células tumorales y la respuesta a la terapia.
- Las isoformas del TGFP (β1, β2 y β3) están implicadas en muchos procesos biológicos; por lo tanto, los anticuerpos que unen las tres isoformas del TGFβ pueden potenciar la toxicidad autoinmune. Para minimizar la toxicidad, los
- 55 anticuerpos que se unen específicamente al TGFβ1 pueden ser mejor tolerados. El tratamiento del cáncer u otros trastornos mediados por TGFβ se puede mejorar mediante el uso de un anticuerpo de neutralización que solo se una al TGFβ-1.
- Por consiguiente, sería deseable desarrollar anticuerpos específicos del TGFβ-1, en particular, anticuerpos que se
- 60 puedan utilizar en modelos animales de ratón y que muestren una mayor eficacia y aplicabilidad en el diagnóstico y la

terapia, y la presente invención está dirigida al logro de ese objetivo. El documento WO 2006/116002 hace algún progreso hacia este objetivo, ya que se refiere a anticuerpos que se unen preferentemente al TGFβ1, en comparación con el TGFβ1 y TGFβ3 latentes.

- 5 La mención de referencias en el presente documento no se debe interpretar como una admisión de que tales sean técnica anterior a la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 10 En un aspecto general, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que reconoce el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) humano y de ratón, no reacciona con el TGF-β2 o TGF-β3 y neutraliza la actividad del TGF-β1; y que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11)_o GYTFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), CDR2 IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) o TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4)_ y CDR3 EDSRSLYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5) y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), CDR2 YAAS (SEQ ID NO: 7) y CDR3 QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8).

- La invención proporciona anticuerpos dirigidos específicamente contra el factor de crecimiento transformante (TGF) beta 1 (TGFβ1) para fines diagnósticos y terapéuticos. Los anticuerpos de la presente invención tienen uso diagnóstico y terapéutico en el cáncer y la inmunomodulación, incluyendo la modulación de la respuesta inmune al cáncer, y en vacunas contra el cáncer. Los anticuerpos de la invención son aplicables en la caracterización y modulación de la actividad del TGF-β1, en particular, en la neutralización de la actividad del TGF-β1.

- En un aspecto concreto, los anticuerpos de la invención son aplicables en el tratamiento, la gestión y/o la prevención de cánceres, incluyendo en la recidiva y metástasis del cáncer. Los anticuerpos son aplicables para usos relativos al cáncer, incluyendo carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, cáncer de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de hueso y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor cerebral, cáncer del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de las vías ópticas centrales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide, gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Seziary, cáncer endometrial, cáncer esofágico, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de estroma gastrointestinal (TEGI), tumor de células germinales, tumor de células germinales del ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de las células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkiniano, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de las células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, cáncer de lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer epitelial de ovario, tumor ovárico de bajo potencial de malignidad, cáncer pancreático, cáncer pancreático de los islotes, cáncer de seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos

supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino, cáncer del cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilms. Los anticuerpos tienen aplicabilidad en el tratamiento o la gestión terapéutica del cáncer. Los anticuerpos tienen aplicabilidad en la mejora de la respuesta inmune anticancerígena y en la mejora de las vacunas contra el cáncer.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce el TGF- β 1 y se selecciona de entre los anticuerpos 4C3.7, 8D6, 19D8, 4A11, 19H11, 21C11, 13A1 y 4G9. En un aspecto concreto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento activo del mismo que reconoce y neutraliza el TGF- β 1 y se selecciona de entre los anticuerpos 4C3.7, 19D8, 13A1 y 4G9.

En un aspecto concreto, la invención proporciona el anticuerpo específico anti-TGF- β 1 13A1. En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo específico del TGF- β 1 capaz de unir específicamente y neutralizar el TGF- β 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) como se presenta en la Figura 1. En tal aspecto, la invención proporciona un anticuerpo del TGF- β 1 que comprende las secuencias CDR de la región variable de cadena pesada presentadas en la Figura 1. En un aspecto del mismo se proporciona anticuerpo específico del TGF- β 1 que tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio CDR 1, CDR2 y CDR3 de GYTFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4) y EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5), respectivamente. En un aspecto, se proporciona el anticuerpo específico del TGF- β 1 que tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio CDR 1, CDR2 y CDR3 de GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11), IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) y EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5), respectivamente, donde se especifica una secuencia de aminoácidos de dominio CDR1 y CDR2 aceptada más corta.

El anticuerpo de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada presentada en la Figura 1 o las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región de dominio CDR de cadena pesada de la Figura 1 y una región variable de cadena ligera. En un aspecto, la secuencia de la región variable de cadena ligera es una secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos de la secuencia de cadena ligera de la Figura 1. En un aspecto, el anticuerpo del TGF- β 1 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera (SEQ ID NO: 2) como se presenta en la Figura 1. En tal aspecto, la invención proporciona un anticuerpo del TGF- β 1 que comprende las secuencias CDR de la región variable de cadena ligera presentadas en la Figura 1. Se proporciona el anticuerpo específico del TGF- β 1 que tiene una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio CDR 1, CDR2 y CDR3 de ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), YAAS (SEQ ID NO: 7) y QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8), respectivamente.

En un aspecto concreto, se proporciona anticuerpo específico del TGF- β 1 donde dicho anticuerpo comprende las secuencias CDR de cadena pesada de la Figura 1 (SEQ ID NO: 3, 4 y 5) y las secuencias CDR de cadena ligera de la Figura 1 (SEQ ID NO: 6, 7 y 8). En tal aspecto, el anticuerpo del TGF- β 1 de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada como se presenta en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera como se presenta en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2). En un aspecto, el anticuerpo específico del TGF- β 1 de la invención que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio CDR 1, CDR2 y CDR3 de GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11), IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) y EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5), respectivamente, donde se especifica una secuencia de aminoácidos de dominio CDR1 y CDR2 aceptada más corta. Un anticuerpo del TGF- β 1 de la invención, capaz de unir específicamente el TGF- β 1 y que no une el TGF- β 2 o TGF- β 3, puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 2) como se presenta en la Figura 1.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de la invención neutraliza el TGF- β 1 y, en particular, neutraliza específicamente el TGF- β 1 y no neutraliza el TGF- β 2 o TGF- β 3. En un aspecto concreto, el anticuerpo o fragmento activo del mismo de la presente invención neutraliza el TGF- β 1 humano y de ratón. En un aspecto, el anticuerpo de la invención neutraliza y bloquea la señalización medida por el TGF- β 1 *in vivo* en un mamífero, en particular, en un humano o en un ratón.

La unión de un anticuerpo a su antígeno diana es mediada a través de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de sus cadenas pesadas y ligeras. Por consiguiente, los miembros de unión específica basados en las regiones CDR de la cadena pesada o ligera, y preferiblemente de ambas, de los anticuerpos de la invención, en particular, del anticuerpo 13A1, serán miembros de unión específica útiles para terapia y/o diagnóstico.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y las CDR del anticuerpo 13A1 se representan en la Figura 1. El anticuerpo 13A1 comprende las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 GYTFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), CDR2 TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4) y CDR3 EDSRSLYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 13A, incluyendo la secuencia de las secuencias CDR de cadena ligera, se proporciona en la Figura 1. En un aspecto, se proporciona el miembro de unión o anticuerpo, incluyendo el anticuerpo 13A1, que tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de dominio CDR 1, CDR2 y CDR3 de GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11), IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) y EDSRSLYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5), respectivamente, donde se especifica una secuencia de aminoácidos de dominio CDR1 y CDR2 aceptada más corta. El anticuerpo 13A1 comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), CDR2 YAAS (SEQ ID NO: 7) y CDR3 QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8).

Por consiguiente, las proteínas de unión específica, tales como anticuerpos, que están basadas en las CDR del uno o más anticuerpos, en particular, incluyendo las CDR de cadena pesada identificadas en el presente documento, será útiles para el direccionamiento al TGF- β 1, en particular, a células que expresan el TGF- β 1, o a la actividad del TGF- β 1 en la respuesta inmune, en enfermedades o en cánceres. Como la diana de los anticuerpos de la invención es específicamente el TGF- β 1, y no el TGF- β 2 y/o TGF- β 3, los anticuerpos de la invención no se unen significativamente a formas del TGF- β o miembros de la familia distintos del TGF- β y se prevé que habrá menos toxicidad y respuesta inflamatoria o respuesta inflamatoria o reacción adversa en las dianas celulares o en los animales con los presentes anticuerpos específicos del TGF- β 1, en particular, en comparación con un anticuerpo pan-TGF- β que reconozca más de una o todas las formas de TGF- β .

En otros aspectos, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión específica o anticuerpo como se ha definido anteriormente y métodos de preparar miembros de unión específica o anticuerpos de la invención que comprenden expresar dichos ácidos nucleicos en condiciones adecuadas para lograr la expresión de dicho miembro de unión o anticuerpo y recuperar el miembro de unión o anticuerpo. En tal aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica una secuencia de región variable de anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos de cadena pesada como se presentan en la Figura 1 o se proporciona un anticuerpo que tiene las secuencias de dominio CDR de cadena pesada como se presentan en la Figura 1. En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de cadena ligera de la Figura 1. La presente invención también se refiere a una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, o una variante degenerada de los mismos, que codifica un anticuerpo de la presente invención, preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular, una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, que codifica la VH de anticuerpo, en particular, las secuencias de la región CDR, que es capaz de codificar una secuencia mostrada en la Figura 1.

La exclusiva especificidad y afinidad de los anticuerpos y fragmentos de la invención permite su uso diagnóstico y terapéutico para identificar, caracterizar y dirigirse a afecciones asociadas a la expresión, actividad o activación del TGF- β 1. En particular, los anticuerpos de la invención que se dirigen al TGF- β 1 son útiles en la modulación de la respuesta inmune. En un aspecto de la misma, los anticuerpos de la invención que se dirigen al TGF- β 1 son útiles en la modulación de la respuesta inmune contra el cáncer, células cancerosas o tumorales y antígenos cancerosos o tumorales. Las afecciones correspondientes incluyen enfermedad infecciosa, cánceres, respuesta inmune del huésped, incluyendo en trasplantes e injertos de tejidos, y enfermedades o trastornos inmunes, tales como enfermedades autoinmune o afecciones inflamatorias. Los cánceres aplicables incluyen carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de hueso y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor cerebral, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de las vías ópticas centrales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide, gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer endometrial, cáncer esofágico, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de estroma gastrointestinal (TEGI), tumor de células germinales, tumor de células germinales de ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de las células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer

de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkiniano, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de las células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, cáncer de lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer epitelial de ovario, tumor ovárico de bajo potencial de malignidad, cáncer pancreático, cáncer pancreático de los islotes, cáncer de seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino, cáncer del cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilms.

La evidencia de producción de TGF β por las células tumorales y las células supresoras derivadas de mieloides junto con la actividad inmunosupresora del TGF β en el sitio tumoral respaldan claramente el hecho de que el bloqueo del TGF β , en particular, el bloqueo específico del TGF β 1, puede mejorar la captación, presentación y activación de la respuesta inmune antitumoral al antígeno mediada por las vacunas terapéuticas. Por tanto, en un aspecto de la invención, el uno o más anticuerpos del TGF β 1, en particular, el uno o más anticuerpos neutralizantes del TGF β 1, pueden administrarse en combinación con, o en una composición de, uno o más antígenos y adyuvantes, incluyendo a pacientes para favorecer un cebado y una activación más robustos de la respuesta antitumoral para mejorar las terapias inmunes dirigidas a los cánceres. También se pueden usar inhibidores de la actividad del TGF β adicionales, tales como moléculas pequeñas, antisentido o aptámeros, para inhibir la actividad del TGF β .

La evidencia de inmunidad antitumoral potente requiere modular múltiples brazos de la respuesta inmune del huésped y las vías de direccionamiento que contribuyen al crecimiento y la supervivencia de las células tumorales. Los agentes combinados que modulan la respuesta inmune y detienen el crecimiento y la progresión tumoral pueden generar inmunidad anticancerígena y detener el crecimiento tumoral para mejorar los resultados clínicos (Vanneman, M (2012) Nature Reviews Cancer (12):237-251). Por tanto, en un aspecto de la invención, el uno o más anticuerpos anti-TGF β 1 pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos, terapéuticos o agentes simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar. Pueden incluirse inmunomoduladores en una composición con, o administrarse con, uno o más anticuerpos del TGF β 1 y/o en un momento diferente al que se administran el uno o más anticuerpos del TGF β 1 para mejorar la inmunomodulación y/o terapia contra el cáncer, incluyendo las terapias inmunes dirigidas contra el cáncer. Los inmunomoduladores procedentes incluyenIDO, TDO (Platten M (2012) Cancer Research 72(21):5435-40), α -galactosilceramida y análogos de los mismos tales como IMM47, ligandos de TLR tales como poli I:C (TLR3), MPL (TLR4), imiquimod (TLR7), R848 (TLR8) o CpG (TLR9), iCOS, CTLA-4, PD1, ligando de PD1, OX40 y ligando de OX40, Lag3, GITR, ligando de GITR, interleuquinas, factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, moduladores de células T, incluyendo moduladores de células T CD8⁺, citoquinas u hormonas tales como dexametasona que estimulan la respuesta inmune o la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores (Mellman I (2011) Nature (480):480-489). Los inmunomoduladores adicionales son moléculas pequeñas, anticuerpos antagonistas o anticuerpos agonistas que se dirigen a los correspondientes inmunomoduladores incluyendoIDO, TDO, la familia de receptores de tipo Toll o iCOS, CTLA-4, PD1, ligando de PD1, OX40 y ligando de OX40, interleuquinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, moduladores de células T, incluyendo moduladores de células T CD8⁺, citoquinas que estimulan la respuesta inmune o la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores.

Los inmunomoduladores adicionales, incluyendo ligandos de TLR tales como poli I:C (TLR3), MPL (TLR4), imiquimod (TLR7), R848 (TLR8) o CpG (TLR9) pueden usarse en combinación con anticuerpo neutralizante específico del TGF- β 1 para producir una estimulación inmune y protección resultante mejoradas de afecciones en las que es deseable que el sistema inmune responda eficazmente tales como una enfermedad infecciosa o cáncer.

El uno o más anticuerpos específicos del TGF- β 1 también pueden usarse como inmunostimulantes o adyuvantes en

uso combinado con materiales antigénicos tales como, sin limitación, proteínas, péptidos, o ácidos nucleicos, etc., con el fin de producir una respuesta inmune protectora, tal como una respuesta de los linfocitos B y el anticuerpo IgG al antígeno administrado. El uno o más anticuerpos específicos del TGF- β 1 también pueden usarse como inmunostimulantes o adyuvantes en uso combinado con materiales antigénicos tales como, sin limitación, proteínas, péptidos, o ácidos nucleicos, etc., con el fin de producir una respuesta inmune protectora, tal como una respuesta de los linfocitos T o CTL al antígeno administrado.

Tales materiales antigénicos podrían ser, y pueden incluir, cualquier material adecuado para la prevención o terapia de una/la enfermedad concreta. Específicamente, en lo que respecta al cáncer, los ejemplos de antígenos proteínicos o peptídicos asociados a tumores que pueden administrarse para inducir o mejorar una respuesta inmune derivan de genes y proteínas codificadas asociadas a tumores que incluyen MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-A13, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), tirosinasa, glucógeno fosforilasa del cerebro, Melan-A, MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7. Por ejemplo, los péptido antigénicos característicos de tumores incluyen los listados en la solicitud PCT WO00/20581 (PCT/US99/21230).

Como se ha demostrado, los anticuerpos específicos del TGF- β 1 son eficaces tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a estimular una respuesta inmune en un sujeto administrando anticuerpo específico del TGF- β 1 con o sin una molécula antigénica en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunológica favorable en tal sujeto.

La invención incluye composiciones y/o kits que comprenden uno o más anticuerpos específicos del TGF- β 1 junto con una o más proteínas o péptidos antigénicos. Las composiciones incluyen composiciones farmacéuticas y composiciones inmunológicas.

Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden los dominios CDR según la invención pueden usarse en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento de un tumor en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden los dominios CDR según la invención pueden usarse en un método de estimular o mejorar una respuesta inmune al cáncer, las células tumorales o uno o más antígenos cancerosos o tumorales en un mamífero, en particular, en un humano, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden los dominios CDR según la invención pueden usarse en un método de inhibir o reducir la recidiva o metástasis del cáncer en un mamífero, en particular en un humano, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden los dominios CDR según la invención pueden usarse en un método de inhibir o bloquear la estimulación del TGF- β , en particular, del TGF- β 1, en respuesta a la radiación o terapia contra el cáncer en un mamífero, en particular, en un humano, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes de la invención.

Un método terapéutico se asocia a la prevención o el tratamiento del cáncer, o la estimulación o mejora de la respuesta inmune al cáncer, que incluye, pero no se limita a carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de hueso y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor cerebral, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de las vías ópticas centrales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide, gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer endometrial, cáncer esofágico, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de estroma gastrointestinal (TEGI), tumor de células germinales, tumor de células germinales

de ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de las células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkiniano, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de las células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, cáncer de lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer epitelial de ovario, tumor ovárico de bajo potencial de malignidad, cáncer pancreático, cáncer pancreático de los islotes, cáncer de seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino, cáncer del cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilms.

Los miembros de unión y anticuerpos de la presente invención y, en una forma de realización concreta, el anticuerpo que tiene la secuencia representada en la Figura 1, o fragmentos de los mismos, y los anticuerpos de cadena sencilla, recombinantes o sintéticos derivados de los mismos que comprenden, en particular, las secuencias de la región CDR de cadena pesada y las secuencias de la región CDR de cadena ligera representadas en la Figura 1, pueden prepararse en composiciones farmacéuticas, que incluyen un vehículo, excipiente o diluyente adecuado, o que incluyen un adyuvante y/o inmunomodulador, para administración en casos donde la terapia es apropiada, tal como para tratar el cáncer o estimular o mejorar la respuesta inmune, incluyendo la respuesta inmune contra el cáncer. Tales composiciones farmacéuticas también pueden incluir medios para modular la semivida de los miembros de unión, anticuerpos o fragmentos mediante métodos conocidos en la técnica tales como la pegilación. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender además anticuerpos o agentes terapéuticos adicionales.

Una composición de la presente invención puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, terapéuticos o agentes, simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar. Además, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el miembro de unión, en particular, el anticuerpo o fragmento del mismo, descritos en el presente documento y otros agentes o terapéuticos tales como agentes o terapéuticos anticancerígenos, agentes antimetabólicos, agentes o anticuerpos apoptóticos, o inmunomoduladores, o inhibidores de molécula pequeña de los inmunomoduladores. En términos más generales, estos agentes anticancerígenos pueden ser inhibidores de la tirosina quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores postraduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celular (p. ej., antimetabólicos), inhibidores o inhibidores de la transducción de señal. Otros tratamientos o terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos analgésicos tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (p. ej., aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o antiheméticos. Además, la composición puede administrarse con inmunomoduladores, tales como α -galactosilceramida, interleuquinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, citoquinas u hormonas tales como dexametasona que estimulan la respuesta inmune y la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores. La composición también puede administrarse con, o puede incluir, combinaciones con otros anticuerpos anti-TGF β , otros anticuerpos inmunomoduladores u otros anticuerpos antigénicos antitumorales.

La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de los mismos que están covalentemente unidos a, o asociados de otra forma con, otras moléculas o agentes. Estas otras moléculas o agentes incluyen, pero no se limitan a, moléculas (incluyendo anticuerpos o fragmentos de anticuerpo) con características de reconocimiento definidas, toxinas, ligandos y agentes quimioterapéuticos. En un aspecto adicional, los anticuerpos o fragmentos de la invención pueden usarse para dirigir o direccionar moléculas u otros agentes terapéuticos, por ejemplo para dirigir moléculas o agentes a células que expresan el TGF β , o células sensibles al TGF β , por ejemplo, células en sitios de heridas, sitios tumorales, áreas inflamatorias o lesiones cancerosas.

- La utilidad diagnóstica de la presente invención se extiende al uso de los anticuerpos de la presente invención en ensayos para caracterizar tumores o muestras celulares o para cribar tumores o cáncer, incluyendo ensayos diagnósticos *in vitro* e *in vivo*. En un inmunoensayo, puede prepararse una cantidad de anticuerpos de control o similares y marcarse con una enzima, un ligando específico y/o un elemento radioactivo y, a continuación, puede introducirse en una muestra celular. Una vez que el material marcado o su uno o más ligandos han tenido oportunidad de reaccionar con sitios en el interior de la muestra, la masa resultante puede examinarse mediante técnicas conocidas, que pueden variar con la naturaleza del marcador unido.
- 10 Los miembros de unión específica de la invención pueden llevar un marcador detectable o funcional. Los miembros de unión específica pueden llevar un marcador radioactivo, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re . Cuando se usan marcadores radioactivos, pueden utilizarse procedimientos de recuento actualmente comercializados conocidos para identificar y cuantificar los miembros de unión específicos. En el caso de que el marcador sea una enzima, la detección
- 15 se puede lograr mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas en la actualidad conocidas en la técnica.

- Los miembros de unión específica radiomarcados, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro* y en técnicas de radiodiagnóstico *in vivo*. En otro aspecto de la invención,
- 20 miembros de unión específica radiomarcados, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, en particular, radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, en particular, como anticuerpos radiomarcados para terapia contra el cáncer. En otro aspecto adicional, los miembros de unión específica radiomarcados, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmunoguiada, donde pueden identificar e indicar la presencia y/o ubicación de células cancerosas, células precancerosas y células hiperproliferativas antes de, durante,
- 25 o después de la cirugía para retirar tales células.

- Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos de la presente invención, donde los miembros de unión específica, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, de la presente invención están conjugados o unidos a otras moléculas o agentes, incluyen además, pero no se limitan a, miembros de unión conjugados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.
- 30

- La presente invención incluye un sistema de ensayo que puede prepararse en forma de un kit de ensayo para el análisis cuantitativo del grado de presencia de, por ejemplo, TGF β 1. El sistema o kit de ensayo puede comprender un componente marcado preparado mediante una de las técnicas radioactivas y/o enzimáticas comentadas en el presente
- 35 documento, acoplado un marcador al anticuerpo, y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales, al menos uno de los cuales es un componente libre o inmovilizado a determinar o su uno o más ligandos.

- Otros objetivos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de una revisión de la subsiguiente descripción detallada, que procede haciendo referencia a los dibujos ilustrativos siguientes, y las
- 40 consiguientes reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- FIGURA 1A y 1B:** (A) proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de TGF-beta 13A1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 2); (B) proporciona las secuencias de los dominios CDR de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 (SEQ ID NO: 3-5) y las secuencias de los dominios CDR de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 (SEQ ID NO: 6-8) para el anticuerpo 13A1.
- 45

La **FIGURA 2A** representa la unión de los anticuerpos de TGF-beta a los isotipos de TGF-beta humano β 1, β 2 y β 3.

- La **FIGURA 3** proporciona datos para la detección de TGF-beta humano mediante ELISA. La concentración de TGF-beta en ng/ml se representa gráficamente frente a la absorbancia a 40 mm². Se utilizó el anticuerpo 21C11 para recubrir las placas de ELISA, se detectó el TGF-beta usando el anticuerpo 8D6.H5.
- 50

La **FIGURA 4** muestra la neutralización del TGF-beta humano en células TMLEC, como se evalúa mediante la expresión inducida por el TGF-beta aguas abajo del gen PAI-1, a partir de un constructo de luciferasa-PAI-1. Se muestra la neutralización mediante los anticuerpos 1D11, 13A1, 4C3.7, 4G9.1 y 19D8.

- 55 **LA FIGURA 5** muestra la inhibición del TGF-beta de ratón (mTGF- β 1) por el anticuerpo 13A1 *in vivo*.

La **FIGURA 6A y B** muestra la exacerbación de la EICH en animales tratados con anticuerpo del TGF- β 1 13A1. (A) gráfica del porcentaje de supervivencia en animales a lo largo de 50 días. (B) gráfica del cambio de peso (%) a lo largo de 50 días. En cada gráfica, se comparan los datos de animales tratados con anticuerpo del TGF-beta frente a animales a los que se ha administrado anticuerpo de control de isotipo IgG1.

- 60 **La FIGURA 7** representa las características de unión del anticuerpo del TGF- β 1 como se evalúan en ensayos de unión

competitiva con anticuerpo1D11 y anticuerpo 13A1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 5 Según la presente invención, pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro del ámbito de la técnica. Tales técnicas se explican íntegramente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989); «Current Protocols in Molecular Biology» Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; «Cell Biology: A Laboratory Handbook» Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; «Current Protocols in Immunology» Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis» (M.J. Gait ed. 1984);
- 10 «Nucleic Acid Hybridization» [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; «Transcription And Translation» [B.D. Hames & S.J. Higgins, ed. (1984)]; «Animal Cell Culture» [R.I. Freshney, ed. (1986)]; «Immobilized Cells And Enzymes» [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, «A Practical Guide To Molecular Cloning» (1984).

Por lo tanto, de aparecer en el presente documento, los términos siguientes tendrán las definiciones presentadas a

15 continuación.

A. TERMINOLOGÍA

El término «miembro de unión específica» describe un miembro de un par de moléculas que tiene especificidad de

20 unión por el otro. Los miembros de un par de unión específica pueden ser de origen natural o producirse total o parcialmente de forma sintética. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente y, por lo tanto, es complementario a una organización espacial y polar concreta del otro miembro del par de moléculas. Por tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Ejemplos de tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de

25 hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta solicitud trata de las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

El término «anticuerpo» describe una inmunoglobulina, ya sea natural o producida parcial o totalmente por síntesis. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es un dominio de unión de

30 anticuerpo o es homólogo al mismo. Este término también contempla anticuerpos injertados con CDR. Un «anticuerpo» es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de las mismas, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, estos últimos descritos en mayor detalle en las patentes de EE. UU. n.º 4.816.397 y 4.816.567. El término «anticuerpo(s)» incluye una molécula de inmunoglobulina (Ig) de tipo silvestre, que comprende generalmente cuatro cadenas polipeptídicas de longitud completa, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o un homólogo de Ig equivalente de la misma (p. ej.,

35 un nanoanticuerpo de camélido, que comprende solo una cadena pesada); incluyendo mutantes, variantes o derivados funcionales de longitud completa de los mismos, que retienen las características esenciales de unión de epítipo de una molécula de Ig, e incluyendo anticuerpos de doble especificidad, biespecíficos, multiespecíficos y de doble dominio variable; las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El significado del término «anticuerpo» también incluye cualquier

40 «fragmento de anticuerpo».

Un «fragmento de anticuerpo» significa una molécula que comprende al menos una cadena polipeptídica que no es de longitud completa, incluyendo (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios

45 ligero variable (VL), pesado variable (VH), ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1); (ii) un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab conectados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) una porción de cadena pesada de un fragmento Fab (Fd), que consiste en los dominios VH y CH1 ; (iv) un fragmento variable (Fv), que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAc), que comprende un único dominio variable (Ward, E.S. y col., *Nature* 341, 544-546 (1989)); (vi) un anticuerpo de camélido; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; (viii) un

50 fragmento Fv de cadena sencilla donde un dominio VH y un dominio VL están conectados mediante un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird y col., *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston y col., *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988); (ix) un dianticuerpo, que es un anticuerpo bivalente biespecífico en el que los dominios VH y VL son expresados en una sola cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento de los dos dominios en la misma cadena, forzando

55 de ese modo a que los dominios se apareen con los dominios de complementariedad de otra cadena y creen dos sitios de unión de antígeno (WO94/13804; P. Holliger y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, (1993)); y (x) un anticuerpo lineal, que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión de antígeno; (xi) fragmentos de anticuerpo multivalentes (dímeros, trímeros y/o tetrámeros de scFv (Power and Hudson, *J Immunol. Methods* 242: 193-204 9

60 (2000)); (xii) un minianticuerpo, que es una molécula bivalente compuesta por un scFv fusionado a dominios

constantes de inmunoglobulina, CH3 o CH4, donde los dominios constantes CH3 o CH4 funcionan como dominios de dimerización (Olafsen T y col. (2004) Prot Eng Des Sel 17(4):315-323; Hollinger P and Hudson PJ (2005) Nature Biotech 23(9):1126-1136); y (xiii) otras porciones de longitud no completa de cadenas pesadas y/o ligeras, o mutantes, variantes, o derivados de las mismas, solas o en cualquier combinación.

5

Como los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras, se debe considerar que el término «anticuerpo» cubre cualquier miembro de unión específico o sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. De esta manera, este término abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido compuesto por un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sean naturales o parcial o totalmente sintéticos. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las patentes de EE. UU. n.º 4.816.397 y 4.816.567.

10

15 Un «sitio de combinación de anticuerpo» es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones variables e hipervariables de cadena ligera o cadena pesada y ligera que se unen específicamente al antígeno.

La expresión «molécula de anticuerpo» en sus diversas formas gramaticales, como se usa en el presente documento, contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

20

Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, incluyendo las porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v); dichas porciones son preferidas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

25

Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, donde un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica de la invención y el otro dominio de unión tiene una especificidad diferente, p. ej., para conseguir una función efectora o similares. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen aquellos donde un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica de la presente invención, incluyendo un fragmento del mismo, y el otro dominio de unión es un anticuerpo o fragmento del mismo diferente, incluyendo el de un anticuerpo anticancerígeno o antitumoral específico diferente. El otro dominio de unión puede ser un anticuerpo que reconoce o se dirige a un tipo de célula concreto, como en un anticuerpo específico de las células neurales o gliales. En los anticuerpos biespecíficos de la presente invención, el dominio de unión del anticuerpo de la invención puede combinarse con otros dominios de unión o moléculas que reconocen receptores celulares concretos y/o modulan de una forma concreta como, por ejemplo, un inmunomodulador (p. ej., interleuquina(s), un modulador de crecimiento o citoquina o una toxina (p. ej., ricina) o un agente o factor antimitótico o apoptótico. Por tanto, los anticuerpos del TGFbeta-1 de la invención pueden utilizarse para dirigir o direccionar agentes, marcadores, otras moléculas o compuestos o anticuerpos en indicaciones tales como curación de heridas, inflamación, cáncer o tumores.

30

35

La expresión «anticuerpo monoclonal» en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solo un sitio de combinación de una especie de anticuerpo capaz de reaccionar inmunológicamente con un antígeno concreto. Por tanto, un anticuerpo monoclonal habitualmente presenta una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunoreacciona. Un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente; p. ej., un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

45

El término «dominio de unión de antígeno» describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte de un antígeno o a su totalidad. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solo a una parte concreta del antígeno, dicha parte se denomina un epítipo. Un dominio de unión de antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpo. Preferiblemente, un dominio de unión de antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

55

Los inmunocombinados o proteínas de fusión de anticuerpos de la presente invención, donde los anticuerpos, moléculas de anticuerpo, o fragmentos de los mismos, para uso en la presente invención están combinados o unidos a otras moléculas o agentes incluyen además, pero no se limitan a, tales anticuerpos, moléculas o fragmentos combinados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico, agente o péptido antimicrobiano, disruptor de la pared celular y/o la membrana celular, o fármaco.

60

El término «adyuvante(s)» describe una sustancia, compuesto, agente o material útil para mejorar una respuesta inmune o la estimulación de un inmunocito o componente y, en algunos casos, puede combinarse con cualquier antígeno concreto en una composición farmacéutica o de vacuna inmunológica. Los adyuvantes pueden usarse para aumentar la cantidad de anticuerpo y células T efectoras producida y para reducir la cantidad de antígeno o inmunoestimulante o inmunomodulador y la frecuencia de inyección. Aunque algunos antígenos se administran sin un adyuvante, hay muchos antígenos que carecen de inmunogenicidad suficiente para estimular una respuesta inmune útil en ausencia de un adyuvante efectivo. Los adyuvantes también mejoran la respuesta inmune de los antígenos «autosuficientes», en los que puede aumentarse la respuesta inmune obtenida o puede reducirse la cantidad de antígeno administrada. Un adyuvante puede funcionar como un depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que mejora no específicamente la respuesta inmune (Hood y col., Immunology, Segunda ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). En un aspecto preferido, un adyuvante es fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptable en un mamífero, en particular, un humano. El adyuvante estándar para uso en animales de laboratorio es el adyuvante de Freund. El adyuvante completo de Freund (FCA) es una emulsión que contiene aceite mineral y micobacterias muertas en solución salina. El adyuvante incompleto de Freund (FIA) omite las micobacterias. Tanto el FIA como el FCA inducen buena inmunidad humoral (anticuerpo), y el FCA induce además altos niveles de inmunidad mediada por células. Sin embargo, ni el FCA ni el FIA son aceptables para su uso clínico debido a los efectos secundarios. En particular, se sabe que el aceite mineral causa granulomas y abscesos y la *Mycobacterium tuberculosis* es el agente responsable de la tuberculosis. Los adyuvantes ya conocidos y utilizados incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, polipéptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los adyuvantes de sales minerales incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, hidróxido de zinc e hidróxido de calcio. Preferiblemente, la composición adyuvante comprende además una emulsión lipídica o grasa que comprende aproximadamente un 10 % (en peso) de aceite vegetal y aproximadamente un 1-2 % (en peso) de fosfolípidos. Preferiblemente, la composición adyuvante comprende opcionalmente además una forma de emulsión que tiene partículas oleosas dispersas en una fase acuosa continua, que tiene un poliol formador de emulsión en una cantidad de aproximadamente un 0,2 % (en peso) a aproximadamente un 49 % (en peso), opcionalmente, un aceite metabolizable en una cantidad formadora de emulsión de hasta un 15 % (en peso) y, opcionalmente, un tensioactivo a base de éter glicólico en una cantidad estabilizante de emulsión de hasta aproximadamente un 5 % (en peso). Ha habido muchas sustancias que se han intentado usar como adyuvantes, tales como la porción de lípido A de endotoxinas bacterianas gram negativas y el dimicolato de trehalosa micobacteriano. El fosfolípido lisolecitina exhibió actividad adyuvante (Arnold y col., Eur. J Immunol. 9:363-366, 1979). Algunos tensioactivos sintéticos exhibieron actividad adyuvante, incluyendo el bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y ciertos polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (POP-POE) (Snippe y col., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 65:390-398, 1981 y Hunter y col., J. Immunol. 127:1244-1250, 1981).

El término «específico/a» se puede usar para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no mostrará unión significativa a moléculas diferentes de su uno o más ligandos de unión específicos. El término también es aplicable cuando, p. ej., un dominio de unión de antígeno es específico para un epítipo concreto portado por varios antígenos, en cuyo caso, el miembro de unión específico que porta el dominio de unión de antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que portan el epítipo.

El término «comprende» se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

El término «que consiste esencialmente en» se refiere a un producto, en particular, una secuencia peptídica, de un número definido de residuos que no están unidos covalentemente a un producto más grande. En el caso del péptido de la invención antes mencionado, los expertos en la materia comprenderán que se pueden contemplar modificaciones menores del extremo N- o C-terminal del péptido, tales como la modificación química del extremo terminal para añadir un grupo protector o similares, p. ej., la amidación del extremo C-terminal.

El término «aislado» se refiere al estado en el que estarán los miembros de unión específica de la invención, o el ácido nucleico que codifica tales miembros de unión, según la presente invención. Los miembros y ácidos nucleicos estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están asociados naturalmente, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su medio natural, o el medio en el que se preparan (p. ej., un cultivo celular) cuando tal preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes e incluso, a efectos prácticos, aislarse, por ejemplo, los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas

de microtitulación para uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia.

Como se usa en el presente documento, «pg» significa picogramo, «ng» significa nanogramo, «ug» o «µg» significa microgramo, «mg» significa miligramo, «ul» o «µl» significa microlitro, «ml» significa mililitro y «l» significa litro.

Los términos «anticuerpo», «anticuerpo anti-TGFβ1», «anticuerpo del TGFbeta1», «anticuerpo del TGF-β1», «anticuerpo del TGFβ1 humano/de ratón» y cualquier variante no mencionada específicamente pueden usarse indistintamente en el presente documento y, como se usan a lo largo de la presente solicitud y reivindicaciones, se refieren al material proteináceo que incluye proteínas únicas o múltiples, y se extienden a aquellas proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento y presentados en la Figura 1 y el perfil de actividades expuesto en el presente documento y en las reivindicaciones. Tales anticuerpos del TGFβ1 ejemplares proporcionados en el presente documento incluyen los anticuerpos 4C3.7, 8D6, 19D8, 4A11, 19H11, 21C11, 13A1 y 4G9 como se proporcionan y caracterizan en el presente documento. En el presente documento se caracteriza, en particular, el anticuerpo ejemplar 13A1 y se extiende a los anticuerpos o proteínas, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento y presentados en la Figura 1 y el perfil de actividades expuesto en el presente documento y en las reivindicaciones. Por consiguiente, se contemplan asimismo las proteínas que presentan actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tal como modificaciones obtenidas por medio de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como las obtenidas por medio de mutaciones en los huéspedes que son productores del complejo o sus subunidades mencionadas. Los términos «anticuerpo», «anticuerpo anti-TGFβ1», «anticuerpo del TGFbeta1», «anticuerpo del TGF-β1», «anticuerpo del TGFβ1 humano/de ratón» y los anticuerpos ejemplares 4C3.7, 8D6, 19D8, 4A11, 19H11, 21C11, 13A1 y 4G9, en particular, incluyendo el anticuerpo 13A1, también están destinados a incluir en su alcance proteínas específicamente citadas en el presente documento, así como todos sus análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogos.

Los residuos de aminoácido descritos en el presente documento se prefiere que estén en la forma isomérica «L». Sin embargo, los residuos en la forma isomérica «D» pueden ser sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre y cuando la propiedad funcional deseada de unión de inmunoglobulina sea retenida por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo terminal amino de un polipéptido COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo terminal carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura estándar de los polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas de residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencia:

35

TABLA DE CORRESPONDENCIA

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
Una letra	Tres letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Cabe señalar que todas las secuencias de residuos de aminoácido están representadas en el presente documento

mediante fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional de extremo terminal amino a extremo terminal carboxilo. Asimismo, cabe señalar que un guion al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido. La Tabla anterior se presenta para correlacionar las notaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer alternativamente en este documento.

Un «replicón» es cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*; es decir, capaz de replicación bajo su propio control.

10 Un «vector» es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede unir otro segmento de ADN con el fin de lograr la replicación del segmento unido.

Una «molécula de ADN» se refiere a la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma monocatenaria o de una hélice bicatenaria. Este término se refiere únicamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula y no se limita a cualquier forma terciaria concreta. Por tanto, este término incluye ADN bicatenario encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineales (p. ej., fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al comentar la estructura de moléculas de ADN bicatenarias concretas, las secuencias pueden describirse en el presente documento según la convención normal de dar únicamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

Un «origen de replicación» se refiere a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

Una «secuencia codificadora» de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que es transcrita y traducida a un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora son determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (p. ej., de mamífero), e incluso a secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción normalmente estarán ubicadas en dirección 3' a la secuencia codificadora.

Las secuencias de control transcripcional y traduccional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores y similares, que posibilitan la expresión de una secuencia codificadora en una célula huésped.

Una «secuencia promotora» es una región reguladora de ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora aguas abajo (dirección 3'). A efectos de definición de la presente invención, la secuencia promotora está unida en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesario para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del nivel de fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente mapeando con nucleasa S1), así como dominios de unión de proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa. Los promotores eucariotas frecuentemente, pero no siempre, contendrán cajas «TATA» y cajas «CAT». Los promotores procariotas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35.

Una «secuencia de control de la expresión» es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificadora está «bajo el control» de secuencias de control transcripcional y traduccional en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que es traducido, a continuación, en la proteína codificada por la secuencia codificadora.

Se puede incluir una «secuencia señal» antes de la secuencia codificadora. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal al polipéptido, que se comunica con la célula huésped para dirigir al polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido en el medio, y este péptido señal es cortado por la célula huésped antes de que la proteína deje la célula. Las secuencias señal pueden encontrarse asociadas a una variedad de proteínas nativas para procariotas y eucariotas.

El término «oligonucleótido», como se usa en el presente documento al hacer referencia a la sonda de la presente invención, se define como una molécula compuesta por dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y uso final del oligonucleótido.

El término «cebador», como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, ya sea natural como en un producto de la digestión con enzimas de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador, que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser monocatenario o bicatenario y debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, que incluyen la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el oligonucleótido cebador habitualmente contiene 15-25 nucleótidos o más, aunque puede contener menos nucleótidos.

Los cebadores del presente documento se seleccionan para que sean «sustancialmente» complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de ADN diana concreta. Esto significa que los cebadores deben ser lo suficientemente complementarios para hibridarse con sus respectivas cadenas. Por lo tanto, la secuencia de cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, se puede unir un fragmento de nucleótido no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementaria a la cadena. Como alternativa, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre y cuando la secuencia del cebador tenga la suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena para hibridarse con la misma y, de ese modo, formar el molde para la síntesis del producto de extensión.

Tal como se usan en el presente documento, los términos «endonucleasas de restricción» y «enzimas de restricción» se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN bicatenario en, o cerca de, una secuencia de nucleótidos específica.

Una célula ha sido «transformada» por ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN ha sido introducido en la célula. El ADN transformante puede o no ser integrado (conectado covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariontes, levaduras y células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener sobre un elemento episomal tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada establemente es aquella en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de tal forma que es heredado por las células hijas por medio de replicación del cromosoma. Esta estabilidad es demostrada por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un «clon» es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común mediante mitosis. Una «línea celular» es un clon de una célula primaria que es capaz de tener un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son «sustancialmente homólogas» cuando al menos aproximadamente el 75 % (preferiblemente al menos aproximadamente el 80 %, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o 95 %) de los nucleótidos concuerdan sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias con software convencional disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación Southern en, por ejemplo, condiciones estrictas como las definidas para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas es del dominio del experto en la materia. Véase, p. ej., Maniatis y col., arriba; DNA Cloning, Vol. I y II, arriba; Nucleic Acid Hybridization, arriba.

Se entenderá que también se encuentran dentro del alcance de la presente invención las secuencias de ADN que codifican miembros de unión específica (anticuerpos) de la invención que codifican para, p. ej., un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos como se proporciona en la Figura 1, o que comprenden las secuencias de la región de dominio CDR presentadas en el presente documento o en la Figura 1 pero que están degeneradas para la misma. Por «degeneradas» se entiende que se usa un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido concreto. Es bien sabido en la técnica que los codones siguientes pueden usarse indistintamente para codificar para cada aminoácido específico:

Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
Metionina (Met o M)	AUG
Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG

Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
Histidina (His o H)	CAU o CAC
Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
Triptófano (Trp o W)	UGG
Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

Se entenderá que los codones especificados anteriormente son para secuencias de ARN. Los codones correspondientes para ADN tienen una T sustituida por U.

- 5 Pueden hacerse mutaciones en las secuencias que codifican los aminoácidos, fragmentos de anticuerpo y secuencias de región CDR presentadas en la Figura 1 y en las SEQ ID NO: 1-8 y 11-12, de tal forma que un codón concreto se cambia por un codón que codifica para un aminoácido diferente. Tal mutación generalmente se realiza haciendo los menos cambios posibles de nucleótidos. Se puede hacer una mutación de sustitución de este tipo para cambiar un aminoácido de la proteína resultante de manera no conservadora (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tienen un tamaño o característica concreta por un aminoácido que pertenece a otro grupo), o de manera conservadora (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tienen un tamaño o característica concreta por un aminoácido que pertenece al mismo grupo). Tal cambio conservador generalmente lleva a un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Se debe considerar que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

El siguiente es un ejemplo de diversos grupos de aminoácidos:

20 **Aminoácidos con grupos R no polares**

Alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina

Aminoácidos con grupos R polares no cargados

- 25 Glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina

Aminoácidos con grupos R polares cargados (cargados negativamente a pH 6,0)

- 30 Ácido aspártico, ácido glutámico

Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0)

- 35 Lisina, arginina, histidina (a pH 6,0)

Otros grupos pueden ser los aminoácidos con grupos fenilo: fenilalanina, triptófano, tirosina

Otro grupo puede ser según su peso molecular (es decir, el tamaño de los grupos R):

40

Glicina	75	Alanina	89
Serina	105	Prolina	115
Valina	117	Treonina	119
Cisteína	121	Leucina	131
Isoleucina	131	Asparagina	132
Ácido aspártico	133	Glutamina	146

Lisina	146	Ácido glutámico	147
Metionina	149	Histidina (con pH de 6,0)	155
Fenilalanina	165	Arginina	174
Tirosina	181	Triptófano	204

Las sustituciones particularmente preferidas son:

- Lys por Arg y viceversa, de tal forma que se pueda mantener una carga positiva;
- 5 • Glu por Asp y viceversa, de tal forma que se pueda mantener una carga negativa;
- Ser por Thr, de tal forma que se pueda mantener un -OH libre; y
- Gln por Asn, de tal forma que se pueda mantener un NH₂ libre.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos ejemplares y preferidas incluyen cualquiera de:

- 10 glutamina (Q) por ácido glutámico (E) y viceversa; leucina (L) por valina (V) y viceversa; serina (S) por treonina (T) y viceversa; isoleucina (I) por valina (V) y viceversa; lisina (K) por glutamina (Q) y viceversa; isoleucina (I) por metionina (M) y viceversa; serina (S) por asparagina (N) y viceversa; leucina (L) por metionina (M) y viceversa; lisina (L) por ácido glutámico (E) y viceversa; alanina (A) por serina (S) y viceversa; tirosina (Y) por fenilalanina (F) y viceversa; ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D) y viceversa; leucina (L) por isoleucina (I) y viceversa; lisina (K) por arginina
- 15 (R) y viceversa.

- También se pueden introducir sustituciones de aminoácidos para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, se puede introducir una Cys como un sitio potencial de puentes disulfuro por otra Cys. Se puede introducir una His como un sitio particularmente «catalítico» (es decir, His puede actuar como un
- 20 ácido o una base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Se puede introducir una Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce giros β en la estructura de la proteína.

- Dos secuencias de aminoácidos son «sustancialmente homólogas» cuando al menos aproximadamente el 70 % de los residuos de aminoácidos (preferiblemente, al menos aproximadamente el 80 %, y lo más preferiblemente al menos
- 25 aproximadamente el 90 % o 95 %) son idénticos, o representan sustituciones conservadoras. Las regiones CDR de dos anticuerpos son sustancialmente homólogas cuando uno o más aminoácidos están sustituidos con una sustitución de aminoácidos conservadora o similar, y donde el uno o más anticuerpos tienen el perfil de unión y las actividades de uno o más de los anticuerpos, particularmente del anticuerpo 13A1 desvelado en el presente documento. Un anticuerpo puede ser sustancialmente homólogo donde uno, dos o tres aminoácidos, o hasta tres aminoácidos, de las
- 30 regiones de dominio CDR están sustituidos por otro aminoácido y donde el anticuerpo retiene el perfil de unión de antígeno y actividades.

- Una región «heteróloga» del constructo de ADN es un segmento de ADN identificable dentro de una molécula de ADN más grande que no se encuentra en la naturaleza asociado a la molécula más grande. Por tanto, cuando la región
- 35 heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará normalmente flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificadora heteróloga es un constructo en el que la propia secuencia codificadora no se encuentra en la naturaleza (p. ej., un ADNc en el que la secuencia codificadora genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes al gen nativo). Las variaciones alélicas o eventos mutacionales naturales no dan lugar a una región heteróloga de ADN
- 40 como se define en el presente documento.

- Una secuencia de ADN está «conectada operativamente» a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia de ADN. La expresión «conectada operativamente» incluye tener una señal de inicio apropiada (p. ej., ATG) delante de la
- 45 secuencia de ADN a expresar y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de la expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si un gen que se desea introducir en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de inicio apropiada, tal señal de inicio puede ser introducida delante del gen.

- 50 El término «condiciones de hibridación estándar» se refiere a las condiciones de salinidad y temperatura sustancialmente equivalentes a 5 x SCC y 65 °C tanto para hibridación como para lavado. Sin embargo, un experto en la materia comprenderá que tales «condiciones de hibridación estándar» son dependientes de condiciones concretas, que incluyen la concentración de sodio y magnesio en el tampón, la longitud de la secuencia de nucleótidos y la concentración, el porcentaje de falta de identidad, el porcentaje de formamida y similares. También es importante
- 55 en la determinación de las «condiciones de hibridación estándar» si las dos secuencias que se hibridan son ARN-ARN, ADN-ADN o ARN-ADN. Tales condiciones de hibridación estándar son fácilmente determinadas por un experto

en la materia según fórmulas bien conocidas, donde la hibridación es habitualmente a 10-20 °C por debajo de la T_m prevista o determinada con lavados de exigencia más alta, si se desea.

5 El término «agente» significa cualquier molécula, incluyendo polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, compuestos químicos y moléculas pequeñas. En particular, el término agente incluye compuestos tales como compuestos de ensayo o compuestos de fármacos candidatos.

10 El término «agonista» se refiere a un ligando que estimula el receptor al que se une el ligando en el sentido más amplio.

El término «ensayo» significa cualquier procedimiento usado para medir una propiedad específica de un compuesto. Un «ensayo de cribado» significa un proceso usado para caracterizar o seleccionar compuestos de una biblioteca de compuestos en función de su actividad.

15 El término «prevenir» o «prevención» se refiere a una reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, que provoca que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle) en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad, con antelación al inicio de la enfermedad.

20 El término «profilaxis» está relacionado con el término «prevención» y es abarcado por el mismo, y se refiere a una medida o procedimiento cuyo propósito es prevenir, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitantes de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalarios con riesgo de trombosis debido a, por ejemplo, inmovilización; y la administración de un agente contra la malaria, tal como cloroquina, con antelación a una visita a una región geográfica
25 en la que la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

«Cantidad terapéuticamente efectiva» significa aquella cantidad de un fármaco, compuesto, antimicrobiano, anticuerpo o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto buscada por un doctor especialista u otro médico. En particular, con respecto a las infecciones por bacterias gram positivas y el crecimiento de bacterias
30 gram positivas, el término «cantidad efectiva» está destinado a incluir una cantidad efectiva de un compuesto o agente que logrará una reducción biológicamente significativa de la cantidad o magnitud de regresión tumoral y/o aumentará el tiempo de supervivencia de un sujeto, o el periodo libre de enfermedad o de remisión. La expresión «cantidad terapéuticamente efectiva» se usa en el presente documento para indicar una cantidad suficiente para prevenir, y preferiblemente reducir en al menos aproximadamente un 30 por ciento, más preferiblemente al menos un 50 por
35 ciento, lo más preferiblemente al menos un 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o la cantidad del tamaño tumoral, o mejorar la supervivencia o el periodo libre de enfermedad en al menos aproximadamente un 30 por ciento, más preferiblemente en al menos un 50 por ciento, lo más preferiblemente en al menos un 90 por ciento.

40 El término «tratar» o «tratamiento» de cualquier enfermedad o infección se refiere, en una forma de realización, a mejorar la enfermedad o infección (es decir, detener la enfermedad o el crecimiento del agente infeccioso o la bacteria o reducir la manifestación, magnitud o gravedad de al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra forma de realización, «tratar» o «tratamiento» se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otra forma de realización más, «tratar» o «tratamiento» se refiere a modular la enfermedad o infección,
45 ya sea físicamente (p. ej., estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (p. ej., estabilización de un parámetro físico) o ambas. En una forma de realización adicional, «tratar» o «tratamiento» se refiere a ralentizar la progresión de una enfermedad o reducir una infección.

La expresión «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que son
50 fisiológicamente tolerables y habitualmente no producen reacción alérgica o adversa similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un humano.

Como se usa en el presente documento, «pg» significa picogramo, «ng» significa nanogramo, «ug» o «µg» significa microgramo, «mg» significa miligramo, «ul» o «µl» significa microlitro, «ml» significa mililitro y «l» significa litro.
55

B. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona anticuerpos dirigidos contra el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) para fines diagnósticos y terapéuticos. En particular, se proporcionan anticuerpos específicos para el TGF-β1, donde dichos
60 anticuerpos reconocen y son capaces de unir el TGF-β1 humano y de ratón, y no reconocen o se unen a otras formas

de TGF beta, en particular, los anticuerpos no reconocen o unen el TGF- β 2 o TGF- β 3. En el presente documento se proporcionan, en particular, anticuerpos del TGF- β 1 ejemplares. Los anticuerpos ejemplares incluyen los anticuerpos 4C3.7, 8D6, 19D8, 4A11, 19H11, 21C11, 13A1 y 4G9. La invención proporciona, en particular, un anticuerpo o fragmento activo del mismo que reconoce y neutraliza el TGF- β 1. Los anticuerpos ejemplares capaces de reconocer específicamente el TGF- β 1 y neutralizar el TGF- β 1 incluyen los anticuerpos 4C3.7, 19D8, 13A1 y 4G9. Los anticuerpos de la presente invención tienen un uso diagnóstico y terapéutico en la inmunomodulación y el cáncer. En un aspecto concreto, los anticuerpos de la invención son aplicables en cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de hueso y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor cerebral, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de las vías ópticas centrales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide, gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneo, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer endometrial, cáncer esofágico, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de estroma gastrointestinal (TEGI), tumor de células germinales, tumor de células germinales de ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de las células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkiniano, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de las células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, cáncer de lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer epitelial de ovario, tumor ovárico de bajo potencial de malignidad, cáncer pancreático, cáncer pancreático de los islotes, cáncer de seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino, cáncer del cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilms.

En un aspecto general, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo aislado o fragmento del mismo que reconoce el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) humano y de ratón, no reacciona con el TGF- β 2 o TGF- β 3 y neutraliza la actividad del TGF- β 1; y que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 GYFTNYW (SEQ ID NO: 11)_o GYFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), CDR2 IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) o TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4)_ y CDR3 EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5) y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), CDR2 YAAS (SEQ ID NO: 7) y CDR3 QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8). En un aspecto concreto, el anticuerpo de la presente invención bloquea la señalización mediada por el TGF- β 1 y/o la respuesta celular o proliferación celular mediada por el TGF- β 1. En un aspecto concreto, la invención proporciona el anticuerpo específico anti-TGF- β 1 13A1. En un aspecto concreto adicional, la invención proporciona un anticuerpo específico del TGF- β 1 capaz de unir específicamente y neutralizar el TGF- β 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se presenta en la Figura 1. En tal aspecto, la invención proporciona un anticuerpo del TGF- β 1 que comprende las secuencias CDR de la región variable de cadena pesada presentadas en la Figura 1. El anticuerpo de la invención

puede comprender la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) presentada en la Figura 1 o las secuencias de la región de dominio CDR de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 de la Figura 1 y una región variable de cadena ligera. El anticuerpo de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 2) o las secuencias CDR de cadena ligera como se presentan en la Figura 1. En un aspecto de la misma, se proporciona anticuerpo específico del TGF-β1 que tiene una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos del dominio CDR 1, CDR2 y CDR3 de ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), YAAS (SEQ ID NO: 7) y QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8), respectivamente.

Se pueden cribar paneles de anticuerpos monoclonales que reconocen el TGF-β1 humano y de ratón para determinar diversas propiedades; es decir, isotipo, epítipo, afinidad, etc. De particular interés son los anticuerpos que simulan la actividad de los anticuerpos ejemplares 4C3.7, 19D8, 13A1 y/o 4G9 y tienen afinidad por el TGF-β1 humano y de ratón, no reaccionan con el TGF-β2 o TGF-β3, e influyen directamente en la actividad del TGF-β1, en particular, neutralizan el TGF-β1. Tales anticuerpos pueden identificarse y/o cribarse fácilmente en ensayos de actividad de miembros de unión específica.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención puede comprender una región variable de cadena pesada, tal como se ilustra en la Figura 1, y opcionalmente una región variable de cadena ligera. En general, las regiones CDR, que comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente como las presentadas como las regiones CDR de la Figura 1, serán portadas en una estructura que permita la unión de las regiones CDR al TGF-β1 y, en particular, al TGF-β1 humano y de ratón.

Por «sustancialmente como se presentan» se entiende que las secuencias de la región variable y/o, en particular, las secuencias CDR de la invención serán idénticas o muy homólogas a las regiones especificadas de la Figura 1. Por «muy homólogas» se contempla que solo se pueden hacer unas pocas sustituciones, preferiblemente de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2 sustituciones en la secuencia de la región variable y/o en las secuencias CDR. El término sustancialmente como se presentan incluye, en particular, sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan materialmente o significativamente a la especificidad y/o actividad de los presentes anticuerpos. En el presente documento se contemplan sustituciones conservadoras y no conservadoras de aminoácidos para las secuencias de la región variable y también para las secuencias de la región CDR.

Las sustituciones se pueden hacer en la secuencia de la región variable no perteneciente a las CDR con el fin de retener las secuencias CDR. Por tanto, pueden introducirse o utilizarse cambios en la secuencia de la región variable o las secuencias de la región variable no homólogas o inactivadas alternativas de tal forma que las secuencias CDR se mantengan y el resto de la secuencia de la región variable se pueda sustituir.

Como alternativa, se pueden hacer sustituciones, en particular, en las CDR. Las secuencias CDR para el anticuerpo, en particular, el anticuerpo 13A1, de la presente invención se presentan y describen en el presente documento, incluyendo en la Figura 1. El anticuerpo 13A1 comprende las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 GYTFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), CDR2 TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4) y CDR3 EDSRSLYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5), como se presentan en la Figura 1. Cuando se especifica un grupo de CDR aceptado más corto, el anticuerpo comprende las secuencias CDR de cadena pesada CDR1 GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11), CDR2 IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) y CDR3 EDSRSLYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5). El anticuerpo 13A1 comprende las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), CDR2 YAAS (SEQ ID NO: 7) y CDR3 QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8).

Los anticuerpos de la invención que tienen sustituciones como se han descrito y contemplado anteriormente se seleccionan para que mantengan las actividades y especificidad acordes a los anticuerpos ejemplares, incluyendo el anticuerpo 13A1, y tengan las características presentadas en el presente documento y en las reivindicaciones.

La estructura para portar las CDR de la invención generalmente será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma en la que las regiones CDR están ubicadas en ubicaciones que corresponden a la región CDR de los dominios variables de anticuerpo VH y VL naturales codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse consultando Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. Departamento de Salud y Servicios Sociales de Estados Unidos. 1987, y actualizaciones del mismo, actualmente disponible en internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>).

Los dominios variables pueden derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o pueden ser un dominio variable sintético a base de secuencias de consenso de dominios variables humanos conocidos. Las secuencias derivadas de CDR de la invención, como se definen en el párrafo anterior, pueden introducirse en un

repertorio de dominios variables carentes de regiones CDR usando tecnología de ADN recombinante.

- Por ejemplo, Marks y col. (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) describen métodos de producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que los cebadores consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable se usan en combinación con cebadores consenso para la tercera región marco de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH carentes de una o más CDR. Marks y col., describen además cómo puede combinarse este repertorio con una CDR de un anticuerpo concreto. A continuación, el repertorio puede ser expresado en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de expresión en fago del documento WO92/01047 de tal forma que se puedan seleccionar miembros de unión específica adecuados. Un repertorio puede consistir en algo como de 10^4 miembros a más, por ejemplo, de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros. Técnicas transposicionales o combinatoriales análogas también son descritas por Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa, pero advierte que la estrategia puede usarse para la generación de anticuerpos.
- Una alternativa adicional es general regiones VH o VL novedosas que lleven las secuencias derivadas de las CDR de la invención usando mutagénesis aleatoria de, por ejemplo, los genes VH o VL de Ac para generar mutaciones en todo el dominio variable. Tal técnica es descrita por Gram y col. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 89:3576-3580), que usaron RCP propenso a error. Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a las regiones CDR de genes VH o VL. Tales técnicas son desveladas por Gram y col. (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 91:3809-3813) y Schier y col. (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

Todas las técnicas antes descritas son conocidas como tales en la técnica y, en sí mismas, no forman parte de la presente invención. El experto en la materia será capaz de usar tales técnicas para proporcionar miembros de unión específica de la invención usando metodología rutinaria en la técnica.

- Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente un 50 % de las regiones marco primera o cuarta, o ambas, siendo el 50 % el 50 % del C-terminal de la primera región marco y el 50 % del N-terminal de la cuarta región marco. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos normalmente no asociados a regiones de dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específica de la presente invención fabricados mediante técnicas de ADN recombinante puede derivar en la introducción de residuos C-terminales de Nor codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Las otras etapas de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables de la invención a secuencias proteicas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de dianticuerpos) o marcadores proteicos como se proporcionan en el presente documento y/o son conocidos por los expertos en la materia.

Aunque, en un aspecto preferido de la invención, se prefieren miembros de unión específica que comprenden un par de dominios de unión basados en secuencias sustancialmente presentadas en la Figura 1, los dominios de unión únicos basados en cualquiera de estas secuencias, en particular, basados en la cadena pesada y las CDR de cadena pesada, constituyen aspectos adicionales de la invención. En el caso de los dominios de unión basados en la secuencia sustancialmente presentada en la Figura 1, tales dominios de unión pueden usarse como agentes de direccionamiento para el TGF- β 1, ya que se sabe que los dominios VH de inmunoglobulina son capaces de unir antígenos diana de una forma específica.

Esto puede conseguirse mediante métodos de cribado de expresión en fago usando la denominada estrategia combinatorial dual jerárquica como se desvela en la patente de EE. UU. 5.969.108, en la que se usa una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específica de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de expresión en fago tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también es desvelada en Markset y col., en el mismo lugar. La biblioteca de fagos y los sistemas y técnicas de selección de expresión en fago también se proporcionan en el presente documento.

Se contemplan e incorporan porciones o dominios de los anticuerpos de la invención, incluyendo cualquier porción o dominio, que incluyen aquellas modificadas o fusionadas a reactivos, marcadores u otros dominios o fragmentos, donde las porciones o dominios retienen las características de los anticuerpos del presente documento, incluyendo la unión específica al TGF- β 1 y, opcionalmente, incluyendo la neutralización específica del TGF- β 1, como se ilustra en el anticuerpo 13A1 del presente documento. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención incluyen fragmentos de anticuerpo recombinante más pequeños (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo monovalentes (Fab,

scFv) y variantes diseñadas (dianticuerpos, trianticuerpos, minianticuerpos y anticuerpos de dominio único) que retienen la especificidad de direccionamiento de los anticuerpos completos (mAc) (para consultar esto, véase Hollinger P and Hudson PJ (2005) *Nature Biotech* 23(9):1126-1136). Estos incluyen, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio (dAc), que comprende un único dominio variable (Ward, E.S. y col., *Nature* 341, 544-546 (1989)); un anticuerpo de camélido; una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; fragmentos Fv de cadena sencilla donde un dominio VH y un dominio VL están conectados mediante un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird y col., *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston y col., *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988); un dianticuerpo, que es un anticuerpo biespecífico bivalente en el que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de ese modo a que los dominios se aparen con los dominios de complementariedad de otra cadena y creen dos sitios de unión de antígeno (WO94/13804;P. Holliger y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90 6444-6448, (1993)); un anticuerpo lineal, que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de complementariedad de cadena ligera, forman un par de regiones de unión de antígeno; fragmentos de anticuerpo multivalentes [dímeros, trímeros y/o tetrámeros de scFv (Power and Hudson, *J Immunol. Methods* 242: 193-204 9 (2000)); y un minianticuerpo, que es una molécula bivalente que comprende un scFv fusionado a dominios constantes de inmunoglobulina, CH3 o CH4 (por ejemplo, IgG1 (CH3) e IgE (CH4), donde los dominios constantes CH3 o CH4 funcionan como dominios de dimerización (Olafsen T y col. (2004) *Prot Eng Des Sel* 17(4):315-323;Hollinger P and Hudson PJ (2005) *Nature Biotech* 23(9):1126-1136). Estos anticuerpos más pequeños y variantes o fragmentos diseñados pueden producirse de una forma más económica y pueden poseer otras propiedades únicas y superiores para un abanico de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Por ejemplo, los scFv2-Fc pueden acumularse con más abundancia en tumores o tejidos, y un minianticuerpo es de aproximadamente 80 kDa y puede ser ideal para terapia debido a su mayor absorción en los tejidos, a que tiene una eliminación más rápida y tiene mejores proporciones de tejido a sangre que la inmunoglobulina intacta (150 kDa) o el Fab'2 (110 kDa) Los fragmentos de anticuerpo pueden forjarse en reactivos multivalentes y multispecíficos, conectados a cargas terapéuticas efectivas (tales como radionúclidos, toxinas, enzimas, liposomas y virus) y diseñados para una eficacia terapéutica mejorada. Recientemente, los dominios de anticuerpo sencillos han sido diseñados y seleccionados como agentes de direccionamiento contra las, hasta ahora, cavidades inmunosilenciosas de enzimas, receptores y agentes infecciosos.

Los miembros de unión específica de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, los miembros de unión específicos basados en las secuencias de la Figura 1 pueden unirse en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo que incluyen las cadenas C_κ o C_λ humanas, preferiblemente las cadenas C_λ. De forma similar, los miembros de unión específica basados en las secuencias de la Figura 1 pueden unirse en su extremo C-terminal a toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, p. ej., IgG, IgA, IgE, IgD e IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, en particular, IgG1, IgG2b e IgG4. Se prefiere la IgG1.

Los anticuerpos, o cualquier fragmento de los mismos, pueden conjugarse o fusionarse recombinantemente a cualquier toxina celular, bacteriana u otras, p. ej., exotoxina de *Pseudomonas*, ricina o toxina de difteria. La parte de la toxina usada puede ser la toxina completa o cualquier dominio concreto de la toxina. Tales moléculas anticuerpo-endotoxina se han usado con éxito para el direccionamiento y la terapia de diferentes clases de cánceres, véase, p. ej., Pastan, *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24;1333(2):C1-6; Kreitman y col., *N Engl J Med*. 2001 Jul 26;345(4):241-7; Schnell y col., *Leukemia*. 2000 Jan;14(1):129-35; Ghetie y col., *Mol Biotechnol*. 2001 Jul;18(3):251-68.

Los multímeros bi- y trispecíficos pueden formarse mediante asociación de diferentes moléculas de scFv y han sido diseñados como reactivos de reticulación para el reclutamiento de células T en tumores (inmunoterapia), el redireccionamiento viral (terapia génica) y como reactivos de aglutinación de glóbulos rojos (inmunodiagnóstico), véase, p. ej., Todorovska y col., *J Immunol Methods*. 2001 Feb 1;248(1-2):47-66; Tomlinson y col., *Methods Enzymol*. 2000;326:461-79; McCall y col., *J Immunol*. 15 de mayo de 2001;166(10):6112-7.

Los anticuerpos humanos completos pueden prepararse inmunizando ratones transgénicos que portan porciones grandes de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humana. Estos ratones, ejemplos de tales ratones son los Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) (patentes de Estados Unidos n.º. 6.075.181 y 6.150.584), los HuMAb-Mouse™ (Medarex, Inc./GenPharm) (patentes de Estados Unidos 5.545.806 y 5.569.825), los TransChromo Mouse™ (Kirin) y los KM Mouse™ (Medarex/Kirin), son bien conocidos en la técnica. A continuación, pueden prepararse los anticuerpos mediante, p. ej., la técnica del hibridoma o mediante expresión en fago. Estos anticuerpos contendrán solo secuencias de aminoácidos completamente humanas. Los anticuerpos completamente humanos también pueden generarse usando expresión en fago a partir de bibliotecas humanas. La expresión en fago puede realizarse usando métodos bien conocidos por el experto en la materia y, como se proporciona en el presente documento, como en Hoogenboom y col. y Marks y col. (Hoogenboom HR and Winter G. (1992) *J Mol Biol*. 227(2):381-8; Marks JD y col. (1991) *J Mol*

Biol. 222(3):581-97; y también en las patentes de Estados Unidos 5.885.793 y 5.969.108).

Los anticuerpos de la invención pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Los marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, radiomarcadores tales como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re , que pueden unirse a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica del diagnóstico por imágenes con anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo Texas) y marcadores usados convencionalmente en la técnica del diagnóstico por imágenes IRM-TC. También incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, ureasa. Los marcadores incluyen además restos químicos tales como biotina que pueden detectarse a través de su unión a un resto detectable de receptor específico, p. ej., avidina marcada. Los marcadores funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para ser direccionadas al sitio de un tumor con el fin de provocar la destrucción de tejido tumoral. Tales marcadores funcionales incluyen fármacos citotóxicos tales como 5-fluorouracilo o ricina y enzimas tales como carboxipeptidasa o nitroreductasa bacteriana, que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de un tumor.

El TGF- β 1 juega un papel importante en el control del sistema inmune y es un promotor tumoral y un supresor tumoral. Los estudios del TGF- β en el cáncer proporcionan una lógica para el bloqueo de la señalización del TGF- β en cánceres humanos con efecto terapéutico. Se ha notificado sobreexpresión de ligandos del TGF- β en la mayoría de cánceres, incluyendo en tumores resistentes a la quimioterapia convencional, y los altos niveles de estos en los tejidos tumorales y/o el suero están asociados a recidivas metastásicas tempranas y/o mala evolución del paciente (Teicher, B.A. y col. (1997) *In Vivo* 11:463-472; Wojtowicz-Praga, S. (2003) *Invest New Drugs* 21:21-32; Ito, N., y col. (1995) *Cancer Lett* 89:45-48; Shariat, S.F. y col. (2001) *Cancer* 92:2985-2992; Shariat, S.F. Y col. (2001) *J Clin Oncol* 19:2856-2864; Tsushima, H. y col. (2001) *Clin Cancer Res* 7:1258-1262; Rich, J.N. (2003) *Front Biosci* 8:e245-e260). Los estudios en animales con anticuerpo pan-TGF- β han demostrado inhibición de la recidiva o metástasis tumoral en el fibrosarcoma, cáncer de colon y cáncer de mama (Terabe M y col. (2003) *J Exp Med* 198:1741-1752; Nam J-S y col. (2008) *Cancer Res* 68(10):3835-3843) y reducida aceleración inducida por la radiación del cáncer de mama metastásico (Biswas S y col. (2007) 117:1305-1313). Las evidencias hasta la fecha respaldan el hecho de que el bloqueo del TGF β puede mejorar la captación, presentación y activación de la respuesta inmune antitumoral al antígeno mediada por las vacunas terapéuticas. De hecho, estudios recientes han demostrado que el bloqueo del TGF- β , usando anticuerpo TGF- β genérico de ratón ID11 (que reconoce el TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), mejora sinérgicamente las vacunas tumorales en modelos animales por medio de las células T CD8⁺ (Terabe M y col. (2009) *Clin Cancer Res* 15:6560-6569; Takaku S y col. (2010) *Int J Cancer* 126(7):1666).

Cabe destacar que, en estudios de radiación, la radiación torácica y la quimioterapia en modelos de cáncer de mama metastásico inducían específicamente niveles plasmáticos del TGF- β 1 (Biswas S y col. (2007) 117:1305-1313), y que el bloqueo genérico de la respuesta del TGF- β inhibía la metástasis del cáncer de próstata, pero llevaba a enfermedad inflamatoria generalizada en los animales (Shah AH, y col. (2002) *J Immunol* 169:3485-91). Por lo tanto, la disponibilidad de un inhibidor específico del TGF- β 1, en particular, un anticuerpo específico del TGF- β 1, puede proporcionar una intervención y un control de la respuesta inmune y la modulación del cáncer más dirigida y direccionada, sin tal riesgo de enfermedad inflamatoria generalizada o efectos no deseados en un animal o paciente.

Se han generado anticuerpos del TGF- β y un ejemplo concreto denominado 1D11, y su equivalente humanizado GC1008, se han evaluado en modelos animales y ensayos clínicos en humanos en fase temprana y se proporcionan y desvelan en solicitudes de patente, incluyendo en los documentos WO2007076391, WO2005097832, WO2006086469 y 5.571.714. El anticuerpo 1D11 y su equivalente, sin embargo, son anticuerpos del TGF- β genéricos, que reconocen todas las formas del TGF- β , incluyendo el TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. El anticuerpo 1D11 y su equivalente humanizado, por lo tanto, no proporcionan modulación específica y dirigida del TGF- β 1. En los documentos WO2006116002 y WO2000066631 se desvelan anticuerpos específicos del TGF- β 1, pero son diferentes de cualquiera de los anticuerpos ejemplares descritos en el presente documento.

Los anticuerpos monoclonales derivados mediante la técnica del hibridoma a partir de otras especies distintas de la humana, tales como de ratón, pueden humanizarse, lo que significa que un anticuerpo no humano se diseña mediante ingeniería genética para que sea más humano con el fin de evitar AHAR cuando se infunde a humanos. Los métodos de humanización de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, entre los métodos más conocidos están el trasplante y la remodelación superficial o «veneering» (también conocido como «resurfacing») de regiones determinantes de complementariedad (CDR). Estos métodos se han descrito ampliamente en la bibliografía y las patentes, véase, p. ej., King "Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies" Taylor & Francis, 1998; las patentes de Estados Unidos 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089, 5.859.205 y 6.797.492, cada uno de ellos incorporado en el presente documento como referencia. Otro método común es la tecnología de remodelación superficial (veneering) (v) (Daugherty y col.

(1991). Nucleic Acids Res. 19(9), 2471-6; patente de Estados Unidos 6.797.492; Padlan, E.A. (1991) Mol. Immunol. 28(4-5), 489-98; patente europea n.º519596), donde se realiza una sustitución de los residuos expuestos superficialmente de las regiones marco, que difieren de los normalmente encontrados en los anticuerpos humanos, con el fin de minimizar la inmunogenicidad de los dominios variables de un anticuerpo, a la vez que se preservan las propiedades de unión de ligando.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos, y fármacos que modulan la producción o actividad de los miembros de unión específicos, los anticuerpos y/o sus subunidades pueden poseer ciertas aplicaciones diagnósticas y pueden utilizarse, por ejemplo, con el fin de detectar y/o medir afecciones tales como cáncer, lesiones precancerosas, afecciones relacionadas con, o derivadas de, crecimiento celular hiperproliferativo o similares. Por ejemplo, los miembros de unión específicos, anticuerpos o sus subunidades, pueden usarse para producir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales para sí mismos en una variedad de medios celulares mediante técnicas conocidas tales como la técnica del hibridoma, que utiliza, por ejemplo, linfocitos de bazo de ratón y células de mieloma fusionadas. Asimismo, se pueden descubrir o sintetizar moléculas pequeñas que simulen o antagonicen la una o más actividades de los miembros de unión específica de la invención y se pueden usar en protocolos diagnósticos y/o terapéuticos.

Los miembros de unión específica radiomarcados, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro*, en técnicas de radiodiagnóstico *in vivo* y en radioinmunoterapia. En el caso del diagnóstico por imágenes *in vivo*, los miembros de unión específica de la presente invención pueden conjugarse a un agente para el diagnóstico por imágenes en lugar de a uno o más radioisótopos, que incluye, pero no se limita a, un agente potenciador de imágenes de resonancia magnética donde, por ejemplo, se carga una molécula de anticuerpo con un gran número de iones paramagnéticos por medio de grupos quelantes. Los ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, éteres corona de poliaminas y polioximas. Los ejemplos de iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y ferbio. En otro aspecto de la invención, los miembros de unión específica radiomarcados, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, en particular, radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, en particular, como anticuerpos radiomarcados para terapia contra el cáncer. En otro aspecto adicional, los miembros de unión específica radiomarcados, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmunoguiada, donde pueden identificar e indicar la presencia y/o ubicación de células cancerosas, células precancerosas y células hiperproliferativas antes de, durante, o después de la cirugía para retirar tales células.

Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos de la presente invención, donde los miembros de unión específica, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, de la presente invención están conjugados o unidos a otras moléculas o agentes, incluyen además, pero no se limitan a, miembros de unión conjugados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

La radioinmunoterapia (RIT) se ha introducido en la clínica y ha demostrado eficacia usando diversos inmunoconjugados de anticuerpos. El anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado marcado con ¹³¹I hMN-14 se ha evaluado en el cáncer colorrectal (Behr TM y col. (2002) Cancer 94(4Suppl): 1373-81) y el mismo anticuerpo marcado con ⁹⁰Y se ha evaluado en el cáncer medular de tiroides (Stein R y col. (2002) Cancer 94(1):51-61). La radioinmunoterapia usando anticuerpos monoclonales también se ha evaluado y notificado para el linfoma no Hodgkiniano y el cáncer pancreático (Goldenberg DM (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2):195-201; Gold DV y col. (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39 (1-2) 147-54). También se describen métodos de radioinmunoterapia con anticuerpos concretos en las patentes de Estados Unidos 6.306.393 y 6.331.175. La cirugía radioinmunoguiada (CRIG) también se ha introducido en la clínica y ha demostrado eficacia y utilidad, incluyendo con anticuerpos anti-CEA y anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores (Kim JC y col. (2002) Int J Cancer 97(4):542-7; Schneebaum S y col. (2001) World J Surg 25(12): 1495-8; Avital S y col. (2000) Cancer 89(8): 1692-8; McIntosh DG y col. (1997) Cancer Biother Radiopharm 12 (4):287-94).

Los expertos en la materia pueden utilizar modelos animales *in vivo* o estudios de xenoinjertos animales para cribar, evaluar y/o verificar adicionalmente los miembros de unión específica y anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención, incluyendo la evaluación adicional de la modulación e inhibición del TGF-β1 *in vivo* y la inhibición de la progresión, recidiva, metástasis o respuesta inmune contra células tumorales o la respuesta a antígenos o vacunas, incluyendo antígenos tumorales o cancerosos o vacunas. Tales modelos animales incluyen, pero no se limitan a, modelos de respuesta inmune, inmunomodulación, vacunación, cáncer, metástasis del cáncer. Los modelos de cánceres cuya recidiva o metástasis están asociadas a elevados niveles de TGF-β1 son particularmente susceptibles a, y están direccionados por, los anticuerpos de la presente invención. Tales cánceres incluyen melanomas, cáncer de mama, pulmón y próstata. Los expertos en la materia conocen y disponen fácilmente de modelos ejemplares y adecuados e incluyen aquellos a los que se ha hecho referencia y/o descritos en el presente

- documento y conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos activos de los mismos pueden evaluarse en modelos de cáncer de mama, incluyendo tumorigenicidad de las células del cáncer de mama humanas en ratones atímicos (Arteaga CL y col. (1993) Cell Growth Diff 4:193-201), o en tumores mamarios inducidos por Neu (Muraoka-Cok RS y col. (2004) Cancer Res 64:2002-2011), o en la evaluación de tumores mamarios transgénicos (Siegel PM y col. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:8430-8435). También, a modo de ejemplo, puede examinarse el efecto antitumoral del anticuerpo del TGF- β 1 sobre una vacuna de células completas en la profilaxis contra tumores de carcinoma de colon CT26 inyectados en ratones singénicos usando un método similar al notificado por Takaku y col. (Takaku S y col. (2010) Int J Cancer 126(7):1666).
- 10 Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse a un paciente con necesidad de tratamiento a través de cualquier vía adecuada, incluyendo mediante inyección intramuscular, subcutánea, en el torrente sanguíneo o en el LCR, o directamente en el sitio del tumor. La dosis exacta dependerá de varios factores, incluyendo de si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y localización del tumor, la naturaleza exacta del anticuerpo (si es un anticuerpo completo, fragmento, dianticuerpo, etc.) y la naturaleza del marcador detectable o
- 15 funcional unido al anticuerpo. Cuando se usa un radionúclido para terapia, una dosis única máxima adecuada puede ser de aproximadamente 45 mCi/m² a un máximo de aproximadamente 250 mCi/m². La dosificación preferible está en el intervalo de 15 a 40 mCi, con un intervalo de dosificación más preferido de 20 a 30 mCi, o de 10 a 30 mCi. Tal terapia puede requerir sustitución de médula espinal o células madre. Una dosis de anticuerpo habitual para diagnóstico por imágenes de tumores o tratamiento de tumores estará en el intervalo de 0,5 a 40 mg, preferiblemente
- 20 de 1 a 4 mg de anticuerpo en forma de F(ab')₂. Los anticuerpos desnudos se administran preferiblemente en dosis de 20 a 1000 mg de proteína por dosis, o de 20 a 500 mg de proteína por dosis, o de 20 a 100 mg de proteína por dosis. Esta es una dosis para un tratamiento único de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también puede ajustarse para otros formatos de anticuerpo, en proporción, por ejemplo, al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse diariamente, dos veces a la semana, semanalmente o mensualmente, a
- 25 criterio del médico.

Composiciones farmacéuticas y terapéuticas

- Los miembros de unión específica de la presente invención normalmente se administrarán en forma de una
- 30 composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica. Por tanto, las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para uso según la presente invención, pueden comprender, además de ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá
- 35 de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, p. ej., intravenosa, o mediante deposición en el sitio tumoral.

- Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones
- 40 farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

- Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de aflicción, el ingrediente activo puede estar en forma de una
- 45 solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los expertos en la materia correspondientes son bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según sea necesario.

- 50 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, terapéuticos o agentes, simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar. Además, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el miembro de unión, en particular, el anticuerpo o fragmento del mismo, descrito en el presente documento y otros agentes o terapéuticos tales como agentes o terapéuticos anticancerígenos,
- 55 hormonas, agentes antimitóticos, agentes antiapoptóticos, anticuerpos o inmunomoduladores. De forma más general, estos agentes anticancerígenos pueden ser, pero no se limitan a, inhibidores de la tirosina quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores postraduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celular (p. ej., antimitóticos) o inhibidores de la transducción de señal. Otros tratamientos o terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos analgésicos tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (p.
- 60 ej., aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o antiheméticos. La composición

- puede administrarse en combinación (secuencialmente (es decir, antes o después) o simultáneamente) con inhibidores de la tirosina quinasa (que incluyen, pero no se limitan a AG1478 y ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorubicina, temozolomida, cisplatino, carboplatino, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxiurea, 5-fluoruracilo, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, lomustina y/o otros agentes quimioterapéuticos. Por tanto, estos agentes pueden ser agentes anticancerígenos o moduladores de la respuesta inmune celular específicos o pueden ser agentes anticancerígenos o antineoplásicos más generales tales como doxorubicina, cisplatino, temozolomida, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxiurea, 5-fluoruracilo, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina o lomustina. Además, la composición puede administrarse con hormonas tales como dexametasona, inmunomoduladores, tales como interleuquinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, citoquinas, anticuerpos agonistas o antagonistas a reguladores de la respuesta inmune que estimulan, mejoran o deprimen la respuesta inmune y la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores. La composición también puede administrarse con, o puede incluir, combinaciones con otros anticuerpos antitumorales.
- 15 Además, la presente invención contempla e incluye composiciones terapéuticas para el uso de miembro de unión en combinación con radioterapia convencional.

La presente invención contempla además composiciones terapéuticas útiles en la puesta en práctica de los métodos terapéuticos de esta invención. Una composición terapéutica en cuestión incluye, mezclado, un excipiente (vehículo) farmacéuticamente aceptable y uno o más de un miembro de unión específica, análogo polipeptídico del mismo o fragmento del mismo, como se describen en el presente documento como ingrediente activo. En una forma de realización preferida, la composición comprende un antígeno capaz de modular la unión específica del presente miembro de unión/anticuerpo con una célula diana. En una forma de realización, la composición comprende un antígeno o formulación de vacuna, en particular, un antígeno tumoral o vacuna contra el cáncer.

La preparación de composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos, análogos o fragmentos activos como ingredientes activos se entiende bien en la técnica. Habitualmente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o como suspensiones líquidas. Sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas para solución en, o suspensión en, líquidos previa a la inyección. La preparación también se puede emulsionar. Con frecuencia, el ingrediente terapéutico activo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, que mejoran la efectividad del ingrediente activo.

Un polipéptido, análogo o fragmento del mismo puede formularse en la composición terapéutica como formas de sal farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido o molécula de antibiótico) y que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

Las composiciones terapéuticas que contienen anticuerpo o fragmento activo se administran convencionalmente intravenosamente, como mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término «dosis unitaria», cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para humanos, conteniendo cada unidad una cantidad de material activo predeterminada calculada para que produzca el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido, es decir, vehículo o excipiente.

Las composiciones se administran de una forma compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad por administrar depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema inmune del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de capacidad de unión del péptido/CMH o antígeno tumoral deseado. Las cantidades exactas de ingrediente activo que se necesita administrar dependen del criterio del facultativo y son diferentes para cada individuo. Los regímenes de administración inicial y administración subsiguiente adecuados también son variables, y pueden incluir una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección u otra administración posterior. Como alternativa, se contempla una infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones apropiadas y suficientes en la sangre o en el sitio de terapia deseado.

60

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de 5 sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los expertos en la materia correspondientes son bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por 10 ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según sea necesario.

Ensayos diagnósticos

15 La presente invención también se refiere a una variedad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo métodos para detectar la expresión de, o la elevada presencia de, TGF- β 1, cáncer mediado por el TGF- β 1 o cáncer de forma más general, evaluando la presencia o cantidad de células sensibles al TGF- β 1, mediante referencia a su capacidad para ser reconocidas por el uno o más miembros de unión específica presentes. Los complejos peptídicos pueden 20 identificarse, direccionarse, marcarse y/o cuantificarse en las células, incluyendo los inmunocitos y/o las células tumorales.

Las aplicaciones diagnósticas de los miembros de unión específica de la presente invención, en particular, anticuerpos y fragmentos de los mismos, incluyen aplicaciones *in vitro* e *in vivo* bien conocidas y estándar para el experto en la materia y basadas en la presente descripción. Pueden utilizarse ensayos y kits diagnósticos para evaluación y análisis 25 *in vitro* del estado de tumores y cánceres, y la respuesta tumoral o respuesta inmune, para evaluar y monitorizar muestras de pacientes, incluyendo aquellos que se sabe que padecen o se sospecha que padecen cáncer, una afección precancerosa, una afección relacionada con crecimiento celular hiperproliferativo, o una muestra tumoral. La evaluación y análisis del estado del cáncer, tumor y la enfermedad metastásica también es útil en la determinación de la idoneidad de un paciente para un ensayo clínico de un fármaco o para la administración de un agente 30 quimioterapéutico o miembro de unión específica concreto, en particular un anticuerpo, de la presente invención, incluyendo combinaciones del mismo, frente a un agente o miembro de unión diferente. Este tipo de monitorización y evaluación diagnóstica ya está en práctica utilizando anticuerpos contra la proteína HER2 en el cáncer de mama (HercepTest, Dako Corporation), donde el ensayo también se usa para evaluar los pacientes para terapia con anticuerpos usando Herceptin. Las aplicaciones *in vivo* incluyen el diagnóstico por imágenes de tumores o la 35 evaluación del estado del cáncer de los individuos, incluyendo el radiodiagnóstico.

Preferiblemente, el anticuerpo usado en los métodos diagnósticos de esta invención es anticuerpo de ratón, humano, humanizado o recombinante. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o anticuerpo de dominio. Además, las moléculas de anticuerpo usadas en el presente documento pueden estar en forma de porciones 40 de moléculas de anticuerpo completo Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v), en particular, Fab.

La presencia de TGF- β 1 en las células o células sensibles al TGF- β 1 o genes o proteínas sensibles al TGF- β 1 puede determinarse mediante los procedimientos inmunológicos *in vitro* o *in vivo* aplicables a tales determinaciones. Se conocen varios procedimientos útiles. Los procedimientos y su aplicación son familiares para los expertos en la materia 45 y, por consiguiente, se pueden utilizar dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento «competitivo» se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 3.654.090 y 3.850.752. El procedimiento «sándwich» se describe en las patentes de Estados Unidos n.º RE 31.006 y 4.016.043. Se conocen otros procedimientos, tales como el procedimiento de «doble anticuerpo» o «DASP».

50 En una forma de realización adicional de esta invención, pueden prepararse kits de ensayo comerciales adecuados para su uso por parte de un especialista médico para determinar la presencia o ausencia de expresión aberrante de, que incluye, pero no se limita a, TGF- β 1 amplificado, en células diana sospechosas. Según las técnicas de ensayo comentadas anteriormente, una clase de tales kits contendrá al menos el marcador o su ligando, por ejemplo, un anticuerpo específico para el mismo, e instrucciones, por supuesto, dependiendo del método seleccionado, p. ej., 55 «competitivo», «sandwich», «DASP» y similares. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc.

Por consiguiente, puede prepararse un kit de ensayo para la puesta en evidencia de la presencia de, o elevados niveles de, TGF- β 1 o un elemento o proteína sensible al TGF- β 1 que comprende: 60

(a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado, obtenido mediante la unión directa o indirecta del miembro de unión específica, o un ligando específico del mismo, a un nivel detectable;

(b) otros reactivos; e

5 (c) instrucciones de uso de dicho kit.

Puede prepararse un kit de ensayo para la puesta en evidencia de la presencia de cáncer mediado por el TGF- β 1, en particular, seleccionado de entre cáncer de mama, pulmón, hígado, próstata, vejiga que comprende:

10 (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado, obtenido mediante la unión directa o indirecta del miembro de unión específica, o un ligando específico del mismo, a un nivel detectable;

(b) otros reactivos; e

(c) instrucciones de uso de dicho kit.

15

Según lo anterior, puede prepararse un sistema de ensayo para cribar fármacos potenciales efectivos para modular la presencia o actividad del TGF- β 1 y/o la actividad o unión del anticuerpo de la presente invención. El péptido antigénico o el miembro de unión o anticuerpo pueden introducirse en un sistema de ensayo, y el futuro fármaco también puede introducirse en el cultivo celular resultante y, después examinarse el cultivo para observar cualquier cambio en la

20 actividad de las células, la unión del anticuerpo o la cantidad y magnitud de TGF- β 1, debido a la adición del futuro fármaco solo, o debido al efecto de cantidades añadidas del uno o más agentes conocidos.

Ácidos nucleicos

25 La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específica de la presente invención. Ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención como se ha definido anteriormente, incluyendo un polipéptido como se presenta en la Figura 1 o capaz de codificar las regiones CDR del mismo.

30 La presente invención también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión, que comprenden al menos un polinucleótido como el anterior. La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos como los anteriores. Un ácido nucleico que codifica cualquier miembro de unión específica como se proporcionan, forma por sí mismo un aspecto de la presente invención, así como también lo hace un método de producción del miembro de unión específico, método que

35 comprende la expresión a partir de un ácido nucleico codificador del mismo. La expresión puede conseguirse convenientemente cultivando células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico en condiciones apropiadas. Tras la producción mediante expresión, puede aislarse y/o purificarse un miembro de unión específica usando cualquier técnica adecuada y, a continuación, usarse según proceda.

40 Los miembros de unión específica y moléculas de ácido nucleico y vectores codificadores según la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados, p. ej., de su medio natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de los ácidos nucleicos, libres o sustancialmente libres de ácidos nucleicos o genes de origen diferente a la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico según la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético.

45

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huéspedes adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células cancerosas,

50 células de cáncer de ovario y muchas otras. Un huésped bacteriano preferido habitual es la *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está bien consolidada en la técnica.

Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias de promotor, secuencias de terminador, secuencias de poliadenilación, secuencias de potenciador, genes

55 marcadores y otras secuencias, según proceda. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, p. ej., «fagos», o fagémidos, según proceda. Para conocer más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición*, Sambrook y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, de preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas se describen en detalle en

60 *Short Protocols in Molecular Biology*, Segunda edición, Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992. Las

divulgaciones de Sambrook y col. y Ausubel y col. se incorporan en el presente documento como referencia.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula huésped que contiene un ácido nucleico como se desvela en el presente documento. Otro aspecto adicional proporciona un método que comprende introducir tal ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección mediante fosfato cálcico, electroporación con DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, p. ej., vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro cálcico, electroporación y transfección usando bacteriófagos. La introducción puede ir seguida de provocar o permitir la expresión desde el ácido nucleico, p. ej., cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen. La presente invención también proporciona un método que comprende usar un constructo como se ha indicado anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión específica o polipéptido como se ha comentado anteriormente.

Otra característica de esta invención es la expresión de las secuencias de ADN desveladas en el presente documento. Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de ADN se pueden expresar conectándolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado. Se puede utilizar una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados del SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., los plásmidos de *E. coli*, colEI, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, p. ej., los numerosos derivados del fago λ , p. ej., NM989, y otro ADN de fago, p. ej., M13 y ADN de fago filamentoso monocatenario; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2u o derivados del mismo; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

Puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión, secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN conectada operativamente a ella, para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos del SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, las regiones de operador y promotor del fago λ principales, las regiones de control de la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (p. ej., Pho5), los promotores de los factores de apareamiento de la levadura, y otras secuencias conocidas para el control de la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

Una amplia variedad de células huésped unicelulares también son útiles en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariontas muy conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (p. ej., COS-1, COS-7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insecto (p. ej., Sf9), y células humanas y células de plantas en cultivo tisular.

Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Tampoco todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia será capaz de seleccionar los vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes correctos sin experimentación excesiva para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta invención. En la selección de una secuencia de control de la expresión, normalmente se considerarán una variedad de factores. Esos incluyen, por ejemplo, la fortaleza relativa del sistema, su controlabilidad y su compatibilidad con la secuencia de ADN o el gen concreto a expresar, en particular, en lo que respecta a estructuras secundarias potenciales. Los huéspedes unicelulares adecuados se seleccionarán mediante consideración de, p. ej., su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar correctamente proteínas y sus requisitos de fermentación, así como de la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN a expresar y la facilidad de purificación de los productos de expresión. Teniendo en cuenta estos y otros factores, un experto en la materia será capaz de construir una variedad de combinaciones de vector/secuencia de control de la expresión/huésped que expresarán las secuencias de ADN de esta invención en la fermentación o el cultivo animal a gran escala.

Como se ha mencionado anteriormente, una secuencia de ADN que codifica un miembro de unión específica puede

prepararse sintéticamente en lugar de por clonación. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos del miembro de unión específica. En general, si la secuencia se va a usar para expresión, se seleccionarán los codones preferidos para la expresión en el huésped previsto. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos estándar y ensamblados en una secuencia codificadora completa. Véase, p. ej., Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair y col., Science, 223:1299 (1984); Jay y col., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984). Las secuencias de ADN sintéticas permiten la construcción conveniente de genes que expresarán análogos del miembro de unión específica o «muteínas». Como alternativa, el ADN que codifica muteínas puede fabricarse mediante mutagénesis sitio-dirigida de genes o ADNs del miembro de unión específica nativo, y las muteínas pueden fabricarse directamente usando síntesis polipeptídica convencional.

La invención se puede entender mejor consultando los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar completamente las formas de realización de la invención preferidas y de ninguna manera se deben considerar, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLO 1

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS DEL TGFbeta-1

Se generaron anticuerpos del TGF-beta usando un procedimiento en ratones que hemos denominado «autovacunación». La autovacunación se utilizó con éxito para generar anticuerpos en ratones contra varias proteínas implicadas en el control de las respuestas inmune e inflamatoria. En este procedimiento, se fabricaron multímeros de OVA grandes tratando ovalbúmina (OVA) con glutaraldehído para generar OVAglu y, tras purificar los productos polimerizados mediante cromatografía de exclusión por tamaño, estos multímeros de OVA se hacen reaccionar con la citoquina diana (en este caso, TGF-beta) antes de saturar los sitios de glutaraldehído restantes con péptido PADRE (aKXVAAWTLKAAC) (SEQ ID NO: 9) (Alexander, J. y col. (1994) Immunity 1:751-761) para maximizar la inmunogenicidad. La eficacia de OVAglu para romper la tolerancia contra autoantígenos se demostró mediante detección de anticuerpos específicos para el TGF-beta 1 mediante ELISA a diluciones séricas de 10^4 - 10^6 .

Los anticuerpos para el TGF-beta-1 humano se prepararon mediante vacunación subcutánea de ratones C57BL/6 en las almohadillas plantares con 2-5 ug de complejos TGF-beta1 humano-OVA-PADRE con adyuvante GERBU100 5 veces a intervalos de 2 semanas. Los ratones se sangraron dos semanas después de la última dosis de refuerzo. Tras un descanso de 2 a 6 semanas, se administró una dosis de refuerzo intravenosa e intraperitoneal combinada con 2-5 ug de complejos para la producción de mA.

El complejo TGF-beta1-OVA-PADRE se generó acoplado citoquina TGF-beta-1 humana a polímeros de ovalbúmina reactivos a aminos mediante incubación con agitación a 4 °C con una cantidad equimolar de proteína diana a pH 8,5 y con tampón carbonato 0,1 M para desprotonar los grupos amino de la citoquina y permitir su reacción con los componentes de glutaraldehído libres. Tras 6 h a temperatura ambiente seguidas de una noche a 4 °C, se añadió péptido de toxina del tétanos (CQYIKANSKFIGITEL) (SEQ ID NO: 10). Tras incubación adicional de 6 a 12 h, se añadió un exceso molar de péptido PADRE de diez veces (aKXVAAWTLKAAC) y se incubó la muestra adicionalmente durante la noche antes de su diálisis contra tampón glicina 0,1 M, pH 5,8. En la secuencia PADRE, X = ciclohexilamina, a = D-aminoácido.

Se aisló un grupo de anticuerpos del TGF-β1 de ratón: MTGF-beta-1.4C3.7 (también denominado Ac 4C3.7), MTGF-beta1.8D6 (también denominado anticuerpo 8D6), MTGF-beta-1.19D8 (también denominado anticuerpo 19D8), MTGF-beta-1.4A11 (también denominado anticuerpo 4A11), MTGF-beta-1.19H11 (también denominado anticuerpo 19H11), MTGF-beta-1.21C11 (también denominado anticuerpo 21C11), MTGF-beta1.13A1 (también denominado anticuerpo 13A1) y MTGF-beta 1.4G9 (también denominado anticuerpo 4G9). Los anticuerpos son todos anticuerpos de clase IgG y difieren en la subclase. Los anticuerpos 4C3.7, 8D6, 19D8 y 13A11 son IgG1. Los anticuerpos 4A11 y 4G9 son IgG2b. Los anticuerpos 19H11 y 21C11 son IgG2a. Posteriormente, se evaluó la unión de TGFβ1 y la neutralización de TGF-β1 de los anticuerpos como se describe en los ejemplos siguientes.

55 MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y ratones

Todas las vacunaciones se realizaron en ratones C57BL/6 mantenidos en condiciones libres de patógenos específicas en nuestras instalaciones para animales (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer, sede de Bruselas, Bruselas,

Bélgica). El TGF- β 1 humano, que difiere de la proteína madura de ratón en un solo aminoácido (A en humano y S en ratón en la posición 354) (Derynck R y col. (1986) J Biol Chem 261:4377-4379), fue de R&D Systems o fue producido y purificado por el Dr. Peter Sun (Sección de Inmunología Estructural, Laboratorio de Inmunogenética, Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas/Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.).

5

Producción de vehículo activado

Se polimerizó OVA (Producto A2512, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), a una concentración de 0,22 mM, mediante incubación durante la noche con glutaraldehído 20 mM en tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 6, a 4 °C.

10 Tras diálisis contra el mismo tampón, se fraccionó el producto soluble en una columna de exclusión por tamaño de Superose 12 (GE Healthcare, Diegem, Bélgica) y se equilibró a pH 6 en tampón fosfato 50 mM. Los productos de gran tamaño (> 1000 kD), en lo sucesivo denominados OVAglu, se recogieron y congelaron en alícuotas a -80 °C.

El acoplamiento de citoquinas a OVAglu se realizó mediante incubación con agitación a 4 °C con una cantidad equimolar de proteína diana (TGF- β 1 humano) a pH 8,5 en tampón carbonato 0,1 M para desprotonar los grupos amino de la citoquina y permitir su reacción con los componentes de glutaraldehído libres. Tras una incubación de 6-12 h, se añadió un exceso de diez veces de péptido PADRE (aKXVAAWTLKAAC) (Alexander, J. y col. (1994) Immunity 1:751-761) y se incubó la mezcla adicionalmente durante la noche antes de su diálisis contra tampón de glicina 0,1 M, pH 5,8.

20

Inmunizaciones

Las inmunizaciones se realizaron mediante de cuatro a cinco inyecciones SC bisemanales en las almohadillas plantares de 2-5 μ g de complejos emulsionados en adyuvante GERBU100, según las instrucciones del proveedor (GERBU Biochemicals, Gaiberg, Alemania). Los ratones se sangraron 2 semanas después de la última dosis de refuerzo. Tras un descanso de 2-6 semanas, se administró una dosis de refuerzo IV e IP combinada con 2-5 μ g de complejos para la producción de mAc.

25

EJEMPLO 2

30

LA UNIÓN DE ANTICUERPOS DE TGF-BETA AISLADOS ES ESPECÍFICA PARA EL TGF-BETA-1

Los anticuerpos anti-TGF-beta aislados generados mediante el protocolo anterior se cribaron por su capacidad de unión a diferentes isoformas de TGF-beta. Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorb durante la noche a 4 °C con TGF-beta-1, TGF-beta-2 o TGF-beta-3 humano (20-200 ng/ml en tampón de glicina 50 mM, pH 9) o se recubrieron primero con neutravidina a 2 μ g/ml en PBS, seguida de antígenos biotinilados (100 ng/ml). A diferencia del anticuerpo anti-TGF-beta monoclonal de ratón 1D11.16 (también denominado 1D11), un anticuerpo anti-TGF- β de referencia consolidado que reconoce el TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (Dasch JR y col. (1989) J Immunol 142:1536-1541), todos los anticuerpos aislados, MTGF-beta-1.4C3.7, MTGF-beta1.8D6, MTGF-beta-1.19D8, MTGF-beta-1.4A11, MTGF-beta-1.19H11, MTGF-beta-1.21C11, MTGF-beta1.13A1 y MTGF-beta 1.4G9, se unen solo al TGF-beta-1 (FIGURA 2). La detección del TGF-beta-1 humano mediante ELISA sándwich se consigue mejor usando el anticuerpo 21C11, que se recubre sobre una placa inmunoabsorbente para capturar el TGF- β 1. A continuación, se detecta el TGF- β 1 con el anticuerpo 8D6.H5 (FIGURA 3).

35

40

45 **Cribado de anticuerpos mediante ELISA.** Los anticuerpos específicos para la citoquina TGF- β 1 se ensayaron mediante ELISA sobre inmunoplasmas Maxisorb (Nunc, Roskild, Dinamarca), se recubrieron durante la noche a 4 °C con el antígeno diana, p. ej., TGF- β 1 (20-200 ng/ml en tampón de glicina 50 mM, pH 9), o se recubrieron primero con neutravidina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE. UU.) a 2 g/ml en PBS, seguida de antígenos biotinilados (100 ng/ml). Tras saturación de la placa con BSA al 1 %, se procesaron los sueros como se describe (Uyttenhove C y col. (2006) Eur J Immunol 26:2868-2874).

50

EJEMPLO 3

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL TGF-beta-1

55

Se ensayó la actividad neutralizante de los anticuerpos del TGF- β 1 evaluando la inducción mediada por el TGF- β 1 del gen PAI-1 aguas abajo en un ensayo de luciferasa en células. MTGF-beta1.4C3.7, MTGF-beta1.4G9.1, MTGF-beta1.19D8 y MTGF-beta1.13A1 neutralizan la actividad del TGFbeta-1, ya sea humano o de ratón. Los anticuerpos MTGF-beta1.8D6, MTGF-beta1.4A11, MTGF-beta1.19H11 y MTGF-beta1.21C11 no mostraron neutralización de la actividad del TGF-beta en este ensayo (datos no mostrados). La neutralización de la actividad del TGF-beta-1 se

60

demonstró evaluando la pérdida de inducción mediada por TGF-beta de genes aguas abajo usando métodos descritos por Abe M y col. (Anal Biochem 1994 Feb 1;216(2):276-84). La expresión del gen PAI-1 se usó para monitorizar la actividad del TGF-beta.

- 5 Se transfectó de forma estable la línea de células epiteliales de pulmón de visón (TMLEC) con un promotor de PAI-1 truncado fusionado al gen reportero de luciferasa de luciérnaga. Se incubaron 500 pg/ml de TGFbeta-1 humano con diluciones séricas en serie de anticuerpo del TGFb1 aislado recuperado de suero de ratones durante 4 h a 37° antes de transferirlo a un volumen igual de medio de cultivo (DMEM + FCS al 10 %) en el que se habían sembrado 50 000 células TMLEC 4 h antes. Tras incubación adicional durante 24 h, se midió la actividad de la luciferasa con el kit
- 10 Britelite de Perkin-Elmer y se midió la luminiscencia en un TopCount NXT de Perkin Elmer. Los títulos séricos inhibitorios se definen como las diluciones séricas que dan una inhibición del 50 % de las actividades biológicas de la citoquina. La significación estadística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney o de Student como se indica.
- 15 En presencia de anticuerpos del TGF-beta-1 en suero de ratón, la inducción del promotor de PAI-1 mediada por TGF-beta se reduce de forma dependiente de la dosis. Los títulos séricos inhibitorios variaron de 10^3 a 10^4 . En particular, el anticuerpo 13A1 es muy potente inhibiendo la bioactividad del TGF-beta-1 (FIGURA 4). Los datos indican que aquí parece haber una tendencia a la mejora del 13A1 sobre el anticuerpo 1D11.16 (1D11) de la técnica anterior en la neutralización del TGF-beta-1.

20

El anticuerpo 13A1 también se une al TGF- $\beta 1$ *in vivo*, lo que deriva en la eliminación de la actividad del TGF-beta de suero de ratón (FIGURA 5). Esto fue demostrado en estudios en los que se trataron ratones FVB con 13A1 (500 μ g) y se recogieron los sueros 6 h después para el ensayo, tras tratamiento ácido, de la inducción mediada por TGF-beta de la actividad de la luciferasa en células TMLEC. Para evaluar la actividad del TGF-beta, se incubaron sueros con

25 HCl 0,16 M durante 10 min y se neutralizaron con NaOH. Este tratamiento ácido es necesario para liberar TGF-beta activo y, de ese modo, permitir su interacción con el receptor del TGF-beta en la célula respondedora. También debería disociar el TGF-beta de cualquier anticuerpo unido y desnaturalizarlo. Por lo tanto, el hecho de que el tratamiento *in vivo* con 13A1 aboliera la actividad sérica del TGF-beta sugiere que el 13A1 impulsaba la eliminación del TGF-beta de la sangre, porque no es probable que el 13A1 restante pudiera haber resistido la exposición a tal ácido fuerte.

30

EJEMPLO 4

ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED

- 35 Se ha demostrado que la neutralización del TGF-beta tras el trasplante de células madre aumenta significativamente la gravedad de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda (Banovic T y col. (2005) Blood 106(6):2206-2214). Por tanto, se ensayó la actividad neutralizante del 13A1 *in vivo* en un modelo de EICH. La enfermedad injerto contra huésped (EICH) se produce en los trasplantes cuando se transfieren células donantes inmunocompetentes a
- 40 receptores o huéspedes que son incapaces de rechazar las células donantes debido a inmunotolerancia, sistema inmune inmaduro del huésped o inmunodeficiencia. Una reacción de injerto contra huésped se produce tras la respuesta de las células T vírgenes del donante a estímulos alogénicos que provocan diferenciación en células efectoras. Los efectos sistémicos de esta reacción antihuésped inicial del donante puede derivar en fallo multiorgánico.

- Para entender la inmunobiología de los trasplantes, se usan modelos de EICH murinos. Específicamente, se usó la
- 45 inducción de EICH en ratones huésped F1 adultos inmunocompetentes para evaluar la actividad neutralizante del 13A1 contra el TGF- $\beta 1$. Se inyectaron intraperitonealmente células del bazo (70×10^6) de donantes C57BL/6 procedentes de la cepa parental en C57BL/6xDBA/2 adultos inmunocompetentes en el día 0 y el día 6. El donante difiere del receptor en los loci del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tanto de clase I como de clase II. En el huésped F1, las células T del donante parental se expanden y producen efectores citotóxicos, lo que deriva en la
- 50 eliminación del sistema linfematopoyético del huésped semialogénico. Posteriormente, la quimera donante/huésped es repoblada por células de donante derivadas de células madre en el inóculo esplénico original. Se observa una grave deficiencia en la función de las células tanto T como B durante varias semanas.

- Se prevé que, si la inmunosupresión es mitigada mediante anticuerpo neutralizante para el TGF- $\beta 1$ 13A1, entonces la
- 55 EICH se agrava. Para evaluar la actividad de neutralización del 13A1 durante la EICH, se administraron intraperitonealmente anticuerpos para el TGF-beta 13A1 (0,5 mg) o Ac de control de isotipo IgG1 (0,5 mg) en los días 0, 5, 10, 14 y 19. Se usaron dos brazos de tratamiento para determinar el efecto de bloquear el TGF- $\beta 1$. En un brazo, cinco ratones recibieron Ac de control de isotipo IgG1. En el segundo brazo, 4 ratones recibieron anticuerpos 13A1. La respuesta EICH se evaluó monitorizando la supervivencia (FIGURA 6A) y pérdida de peso (FIGURA 6B) entre los
- 60 grupos de tratamiento. La adición de anticuerpo 13A1 agravó la EICH. Aunque la pérdida de peso en ambas

condiciones de tratamiento es comparable, los ratones que recibieron anticuerpos 13A1 neutralizantes del TFG-beta murieron aproximadamente en el día 15, mientras que el 80 % de los ratones del grupo de control permanecieron vivos en ese momento.

5 EJEMPLO 5

EVALUACIÓN IN VIVO DEL ANTICUERPO ESPECÍFICO DEL TGF- β 1

En cánceres humanos, los datos recopilados muestran que las células T reguladoras, Treg CD4⁺FOXP3⁺ (Treg), están presentes en sitios tumorales locales. Sato y col. han demostrado que la proporción de células T CD8⁺T a Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ es un indicador pronóstico importante, con una baja proporción asociada a una mala evolución en pacientes con cáncer ovárico. Esto indica el papel esencial de las Treg en la contribución a respuestas inmunes antitumorales no protectoras. (Sato, E y col. (2005) PNAS 102(51):18538-18543). La citoquina TGF β 1 induce la conversión de células T a Treg. A través de la conversión a Treg y la inhibición de la activación de linfocitos T, el TGF β 1 también favorece la invasión tumoral y la progresión de la enfermedad metastásica en etapas más tardías de la tumorigénesis. Como la conversión a Treg inducida por el TGF β 1 contribuye a la atenuación de las respuestas inmunes y a un pronóstico malo, un inhibidor del TGF β puede contribuir a la reducción del número de células T-reg, la mejora de las respuestas inmunes antitumorales y la reducción de la progresión tumoral.

Los trabajos anteriores en modelos de tumor en ratón mostraron que el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de pan-TGF β antagonistas derivaba en estimulación de la actividad de las células T específicas de antígeno tumoral y reducía las poblaciones de Treg. Se determinó que estos anticuerpos reducían las poblaciones de células T reguladoras FoxP3⁺ infiltrantes de tumores, lo que indicaba que los anticuerpos neutralizantes de pan-TGF β bloqueaban la conversión de las células T a células T reguladoras y reducía la metástasis tumoral (Liu VC y col. (2007) J Immunol 178(5): 2883-92).

Hay múltiples formas de TGF β , por lo tanto, es necesario bloquear selectivamente el TGF β 1 con el fin de conseguir el potencial terapéutico total del bloqueo de la inmunosupresión inducida por el TGF β 1 para el tratamiento del cáncer. Evaluamos bloquear específicamente el TGF β 1 con anticuerpos neutralizantes que se dirigen solo al TGF β 1 y no se unen a otras formas de TGF β . Se ha ensayado la actividad inhibitoria de los anti-TGF β 1 sobre el crecimiento y la metástasis tumoral en modelos de ratón. Los modelos se utilizan para investigar la protección, mejora e inmunosupresión tumoral.

Se han evaluado anticuerpos neutralizantes del TGF β 1 en tumores consolidados en modelos subcutáneos o modelos de metástasis con el fin de determinar la actividad antitumoral de los anti-TGF β 1 contra tumores primarios y metastásicos. Se permite que los tumores crezcan hasta aproximadamente 200 mm de tamaño y, a continuación, los ratones se aleatorizan en grupos de tratamiento. En modelos de metástasis al pulmón, se inyectan intravenosamente células tumorales a los ratones a través de la vena caudal. Se ensaya el anticuerpo anti-TGF β 1 en un ratón que recibe anticuerpo anti-TGF β 1 administrado IP o IV en un intervalo de dosificaciones con diferencias de 2-10 veces en comparación con las dosificaciones usadas en el modelo de EICH (0,5 mg). Los ratones de los grupos de control reciben un volumen igual de solución salina o solución de IgG1 normal. El tratamiento de los animales se continúa durante toda la duración del experimento. Se calculan los volúmenes tumorales usando cualquier método estándar bien conocido en la técnica.

Se analizan los datos de volumen tumoral para determinar las diferencias significativas de tamaño tumoral entre los tratamientos, momentos temporales e interacciones tratamiento-tiempo. Un valor P inferior a 0,05 se considera que es estadísticamente significativo. El anticuerpo anti-TGF β 1 inhibe significativamente el crecimiento del tumor primario y la metástasis pulmonar espontánea en un modelo de tumor.

Se evalúa la actividad inhibitoria de anti-TGF β 1 de ratón contra la conversión de células T a células Treg CD4/CD25/Foxp3 Treg en modelos de tumor. En resumen, se activan células CD4⁺ vírgenes purificadas aisladas de muestras de tumor procedentes de los grupos de anticuerpo anti-TGF β -1 o IgG1 de control mediante estimulación usando métodos bien conocidos en la técnica. Se determina mediante análisis FACS el efecto inhibitorio del anticuerpo anti-TGF β 1 sobre la conversión de células T en Treg en ratones con tumores para evaluar los cambios en la población de CD4/CD25/Foxp3 tras el tratamiento de los ratones con anticuerpo anti-TGF β 1. El anticuerpo anti-TGF β 1 de ratón reduce significativamente el número de células Treg CD4/CD25/Foxp3 en los ratones con tumores tratados en comparación con el control de IgG1. Estos resultados indican que los anticuerpos anti-TGF β 1 pueden controlar la población de CD4/CD25/Foxp3 mediante inhibición y/o depleción de Treg.

La contribución de la actividad inhibitoria del anticuerpo anti-TGF β 1 a la mejora inmune se evalúa analizando células

T asociadas a tumor derivadas de muestras de biopsias tumorales para activación del TCR. En resumen, se activan células CD4+ vírgenes purificadas aisladas de muestras de tumor procedentes de los grupos de anticuerpo anti-TGFβ-1 o IgG1 de control mediante estimulación de las células T usando métodos bien conocidos en la técnica. Se evalúan las células para determinar actividad de las células T mejorada buscando pérdida de energía de las células T inducida por Treg, incluso monitorizando la producción de citoquinas y marcadores de activación mediante métodos bien conocidos en la técnica (Broderick L. y col. (2006) *J Immunol* 177:3082-3088). El anticuerpo anti-TGFβ1 mejora la activación de las células T en comparación con las células tratadas con IgG1 de control.

Se ha descubierto que el mAc del CTLA-4 humano provoca respuestas clínicas objetivas y duraderas en un subgrupo de pacientes con melanoma. Estudios anteriores han demostrado que el bloqueo de la acción del CTLA-4 mediante anticuerpos monoclonales mejora las respuestas de las células T efectoras e induce rechazo tumoral mediado por las células T en modelos de ratón (Fong L y col. (2008) *J Clin Oncol* 26:5275-5283). Sin embargo, la efectividad de tal inmunoterapia puede ser atenuada por las Treg. El bloqueo del CLTA-4 induce un aumento del número de Treg, así como del número de células T CD8+. Teniendo en cuenta la importancia de las Treg en la supresión de las respuestas inmunes antitumorales, el control de las Treg es un objetivo importante y clínicamente relevante. Por lo tanto, hemos buscado aumentar las respuestas inmunes mediante modulación combinatorial de moléculas reguladoras que incluyenIDO, TDO, α-galactosilceramida y análogos de las mismas tales como IMM47 Lag3, iCOS, GITR, ligando de GITR, CTLA-4, PD1, ligando de PD1, OX40 y ligando de OX40. Los agonistas del OX40 se enumeran en la solicitud de patente publicada US2012/0141465 basada en USSN 11/867.621. Garison K y col. notificaron que los anti-TGFβ1 mejorados recíprocamente por anti-OX40 provocaban un potente efecto antitumoral contra tumores primarios consolidados (Garrison K y col. (2012) *Cancer Immunol Immunother* Apr;61 (4):511-21). Los inmunomoduladores adicionales son moléculas pequeñas, anticuerpos antagonistas o anticuerpos agonistas que se dirigen a los correspondientes inmunomoduladores incluyendo IDO, TDO, la familia de receptores de tipo Toll, iCOS, CTLA-4, PD1, ligando de PD1, OX40 y ligando de OX40, interleuquinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, moduladores de células T, incluyendo moduladores de células T CD8+, citoquinas que estimulan la respuesta inmune o la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores.

Además, los anticuerpos anti-TGFβ1 de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con un agente antineoplásico distinto de los anticuerpos anti-TGFβ1, radiación, otros antagonistas del TGFβRII, antagonistas del TGFβ, anticuerpos para otras dianas y moléculas pequeñas. La administración de los anticuerpos con otros anticuerpos y/o tratamientos puede producirse simultáneamente, o por separado, a través de la misma vía o una diferente, en el mismo o diferentes momentos.

Dadas las limitaciones clínicas notificadas para las estrategias de vacunas contra el cáncer terapéuticas, la combinación de la inhibición del TGFβ1 derivado de tumores y la inmunosupresión mediada por Treg con una vacuna o estrategia inmunogénica direccionada puede proporcionar la sinergia necesaria para superar los mecanismos de evasión inmune tumoral. Por lo tanto, hemos buscado aumentar las respuestas inmunes combinando anticuerpos anti-TGFβ1 con antígenos del cáncer de testículos, incluyendo los antígenos del cáncer de testículos MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-A13, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), tirosinasa, glucógeno fosforilasa del cerebro, Melan-A, MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7. Por ejemplo, los péptidos antigénicos característicos de tumores incluyen los enumerados en la solicitud PCT publicada WO00/20581(PCT/US99/21230), en la solicitud de Estados Unidos publicada US2012/0328660 basada en USSN 13/484.884 y 61/493.164 y en Sabbatini PJ y col. (2012) *Clin Cancer Res* 18; 6497.

EJEMPLO 6

50 CARACTERÍSTICAS DE UNIÓN DE LOS ANTICUERPOS DEL TGF-β1

Se compararon las características de unión relativa de los anticuerpos del TGF-β1 aislados en experimentos de unión competitiva frente a 1D11, que une todas las formas de TGF-β, y al anticuerpo específico del TGF-β1 13A1. En cada caso, se incubó TGF-β1 humano biotinilado (20 ng/ml) durante la noche con anticuerpo monoclonal del TGF-β1 13A1 (20 μg/ml) o pananticuerpo 1D11 o BSA. Tras el periodo de preincubación de una noche, se transfirieron las mezclas de unión de anticuerpo a placas recubiertas con anticuerpos 1D11, 4A11, 4C3, 4G9, 8D6, 13A1, 19D8, 19H11, 21C11 o BSA. Se incubaron las placas durante 2 h. Tras 2 h a 37°, se añadió estreptavidina-HRP durante 1 h. Si el TGF-β1 biotinilado se une a la placa, los Ac recubiertos reaccionan con un sitio sobre el TGF-β1 que no se enmascaró durante la preincubación con 1D11 o 13A1. Los resultados se presentan en la Figura 7.

60

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Van Snick, Jacques
 5 <120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL TGF-B1 Y MÉTODOS Y USOS DE LOS MISMOS
 <130> 2332-1-026PCT
 10 <140> SIN ASIGNAR
 <141> 06-03-2013
 <150> 61/608.393
 <151> 08-03-2012
 15 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.5
 20 <210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 1

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly
 20 25 30

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

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr
 50 55 60

Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp
 65 70 75 80

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

Asn Gly Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 2

ES 2 694 203 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 2

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

<210> 3
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3
 15

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His
 1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn
 1 5 10

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus

<400> 5

ES 2 694 203 T3

Glu Asp Ser Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Gly Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 6
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 10

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe
 1 5 10

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 7

Tyr Ala Ala Ser
 1

20

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25

<400> 8

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Arg Thr
 1 5

30 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido PADRE

<220>
 <221> misc_feature

40 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 9

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Cys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la toxina del tétanos

55 <400> 10

Cys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu

ES 2 694 203 T3

	1	5	10	15
	<210> 11			
	<211> 8			
5	<212> PRT			
	<213> Mus musculus			
	<400> 11			
10		Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp		
		1 5		
	<210> 12			
	<211> 8			
	<212> PRT			
15	<213> Mus musculus			
	<400> 12			
20		Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr		
		1 5		

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo aislado o fragmento del mismo que reconoce el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) humano y de ratón, no reacciona con el TGF-β2 o TGF-β3, y neutraliza la actividad del TGF-β1; y que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11)_o GYTFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), CDR2 IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) o TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4)_ y CDR3 EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5) y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), CDR2 YAAS (SEQ ID NO: 7) y CDR3 QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8).
2. El anticuerpo aislado o fragmento de la reivindicación 1 que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 GYTFTNYW (SEQ ID NO: 11), CDR2 IYPGNSDT (SEQ ID NO: 12) y CDR3 EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5) o CDR1 GYTFTNYWMH (SEQ ID NO: 3), CDR2 TIYPGNSDTN (SEQ ID NO: 4) y CDR3 EDSRSLYYNGWDYFDY (SEQ ID NO: 5) y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de dominio CDR CDR1 ESVDNYGISF (SEQ ID NO: 6), CDR2 YAAS (SEQ ID NO: 7) y CDR3 QQSKEVPRT (SEQ ID NO: 8).
3. El anticuerpo aislado o fragmento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada seleccionada de entre la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 presentada en la Figura 1, o variantes de la misma que tienen al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 o comprenden de 1 a 3 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones CDR de cadena pesada de la Figura 1, donde dichas variantes retienen la reactividad contra y la neutralización del TGF-β1 y carecen de reactividad contra el TGF-β2 y TGF-β3.
4. El anticuerpo aislado de la reivindicación 3 que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la secuencia de aminoácidos como se presenta en la SEQ ID NO: 2, o variantes de la misma que tienen al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2 o comprenden de 1 a 3 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones CDR de cadena ligera de la Figura 1, donde dichas variantes retienen la reactividad contra y la neutralización del TGF-β1 y carecen de reactividad contra el TGF-β2 y TGF-β3.
5. El anticuerpo aislado o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es un anticuerpo o fragmento del mismo donde dicho anticuerpo aislado está en forma de un F(ab')₂ de anticuerpo, fragmento scFv, anticuerpo de dominio, minianticuerpo, dianticuerpo, trianticuerpo o tetranticuerpo.
6. El anticuerpo aislado o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende además un marcador detectable o funcional.
7. El anticuerpo aislado de la reivindicación 6, donde dicho marcador detectable o funcional es un fármaco unido covalentemente o es un radiomarcador.
8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Un método de preparación de un anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende expresar el ácido nucleico de la reivindicación 8 en células *in vitro* en condiciones que logran la expresión de dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.
10. Un anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método de tratamiento del cáncer o prevención de la recidiva o metástasis del cáncer en un mamífero, para uso en la estimulación o mejora de una respuesta inmune a una vacuna contra el cáncer o un antígeno canceroso, para uso como agente inmunomodulador en un mamífero, para uso en el bloqueo de la inmunosupresión mediada por Treg en un mamífero, o para uso en un método de diagnóstico del cáncer en un mamífero.
11. Un kit para el diagnóstico o pronóstico *in vitro* del cáncer en el que se expresa antígeno TGF-β1, comprendiendo dicho kit un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.
12. Una composición farmacéutica o composición inmunológica que comprende un anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente

aceptable, que comprende opcionalmente un adyuvante y/o uno o más antígenos, un anticuerpo inmunoregulador, o un inhibidor de molécula pequeña de un inmunomodulador.

13. Una forma de dosificación farmacéutica de la composición farmacéutica o la composición inmunológica de la reivindicación 12 para uso en un kit para el tratamiento de un tumor en un paciente humano, que comprende además una forma de dosificación farmacéutica independiente que comprende un agente anticancerígeno adicional seleccionado del grupo que consiste en antígeno(s) canceroso(s) o tumoral(es), agentes quimioterapéuticos, agentes radioinmunoterapéuticos y combinaciones de los mismos.
- 10 14. Un método *in vitro* para detectar la presencia de cáncer o determinar el pronóstico de un cáncer en un mamífero donde dicho cáncer se mide o se determina su pronóstico determinando la presencia y/o cantidad de TGF-β1 que comprende:
- 15 A. poner en contacto una muestra biológica de un mamífero en el que se sospecha la presencia de cáncer con el anticuerpo o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en condiciones que permiten que se produzca la unión de dicho TGF-β1 a dicho anticuerpo; y
- B. detectar si se ha producido unión entre dicho TGF-β1 de dicha muestra y el anticuerpo o determinar la cantidad de unión que se ha producido de dicho TGF-β1 de dicha muestra y el anticuerpo;
- 20 donde la detección de unión indica la presencia de cáncer en dicha muestra y la cantidad de unión indica el pronóstico del cáncer en dicha muestra.
15. Un anticuerpo o fragmento para uso según la reivindicación 10 en un método de tratamiento del cáncer o prevención de la recidiva o metástasis del cáncer en un mamífero, para estimular o mejorar una respuesta inmune a una vacuna contra el cáncer o antígeno canceroso o para diagnóstico del cáncer en un mamífero o un método según la reivindicación 14 donde el cáncer se selecciona de entre melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y fibrosarcoma.
- 25

FIGURA 1

A

13A1 CADENA PESADA

Secuencia de aminoácidos

**LARPGASVKMSCKTSGYTFTNYWMHWVRQRPGQGLEWIGTIYPGNS
DTNYNQKFKDKAKLTAVTSATTAYMELSSLTNEDSAVYFCTREDSRS
YYNGWDYFDYWGQGTTLTVSS**

13A1 CADENA LIGERA

Secuencia de aminoácidos

**LTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQPPKLLI
YAASNQSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTGMYFCQQSKEVPI
TFGGGTKLEII**

B

CDRs

CDRH1 GYTFTNYWMH o GYTFTNYW

CDRH2 TIYPGNSDTN o IYPGNSDT

CDRH3 EDSRSLYYNGWDYFDY

CDRL1 ESVDNYGISF

CDRL2 YAAS

CDRL3 QQSKEVPRT

FIGURA 2

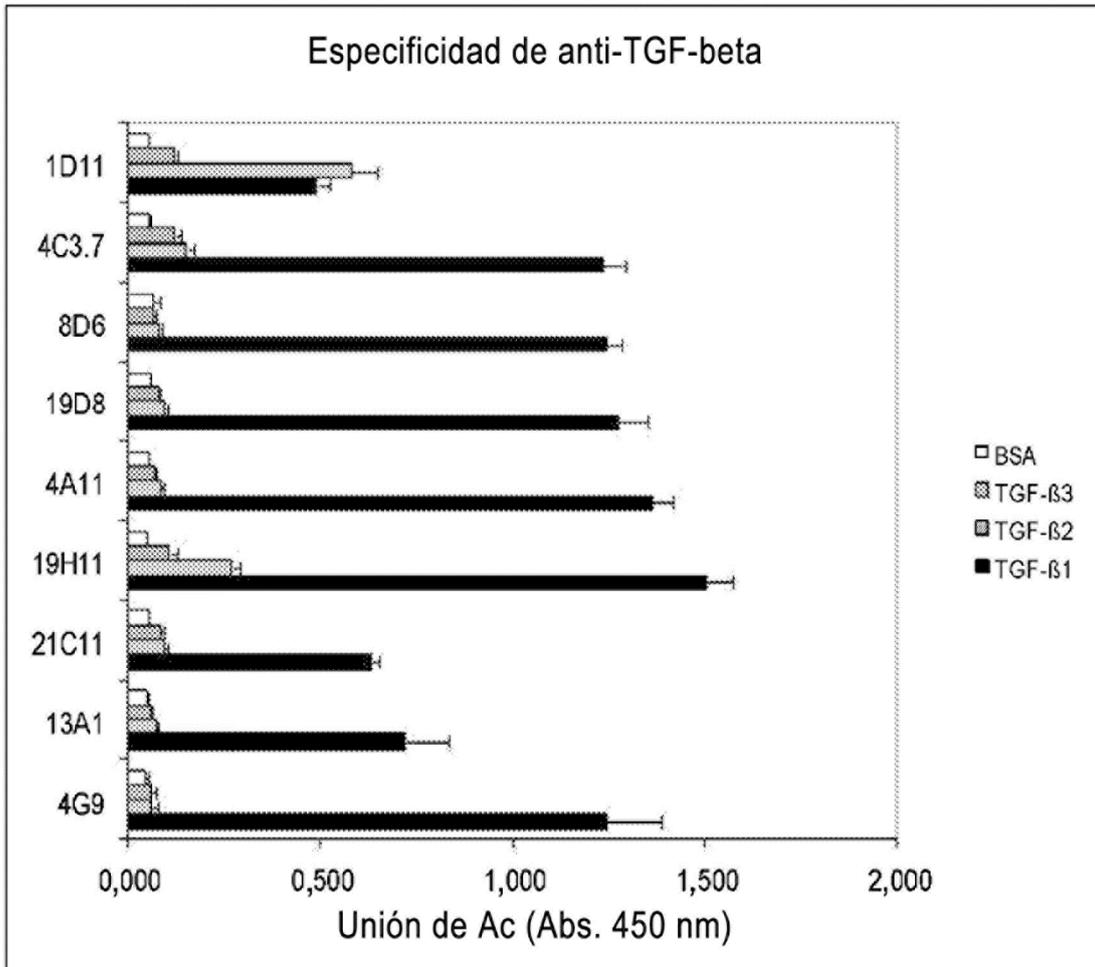


FIGURA 3

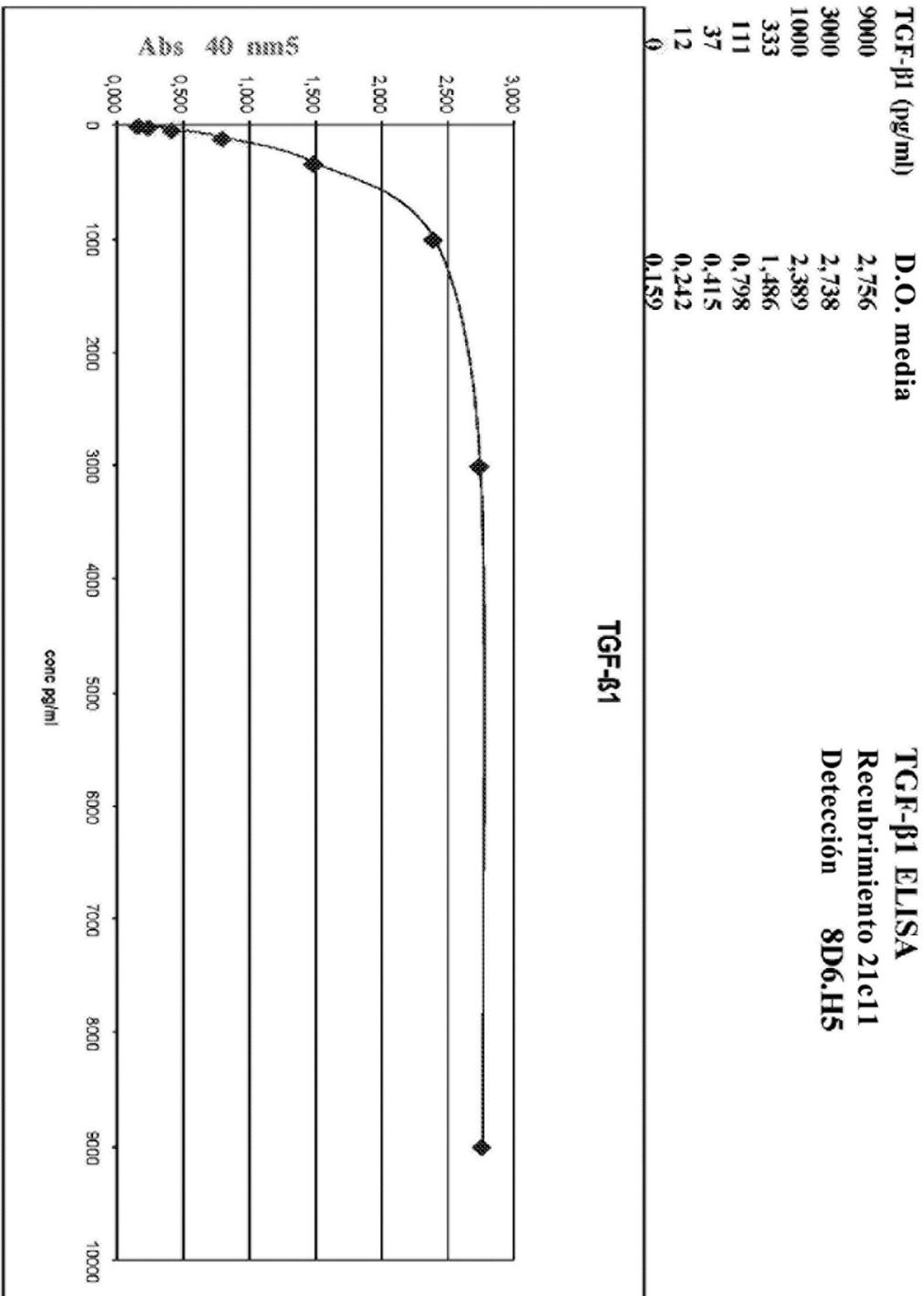


FIGURA 4

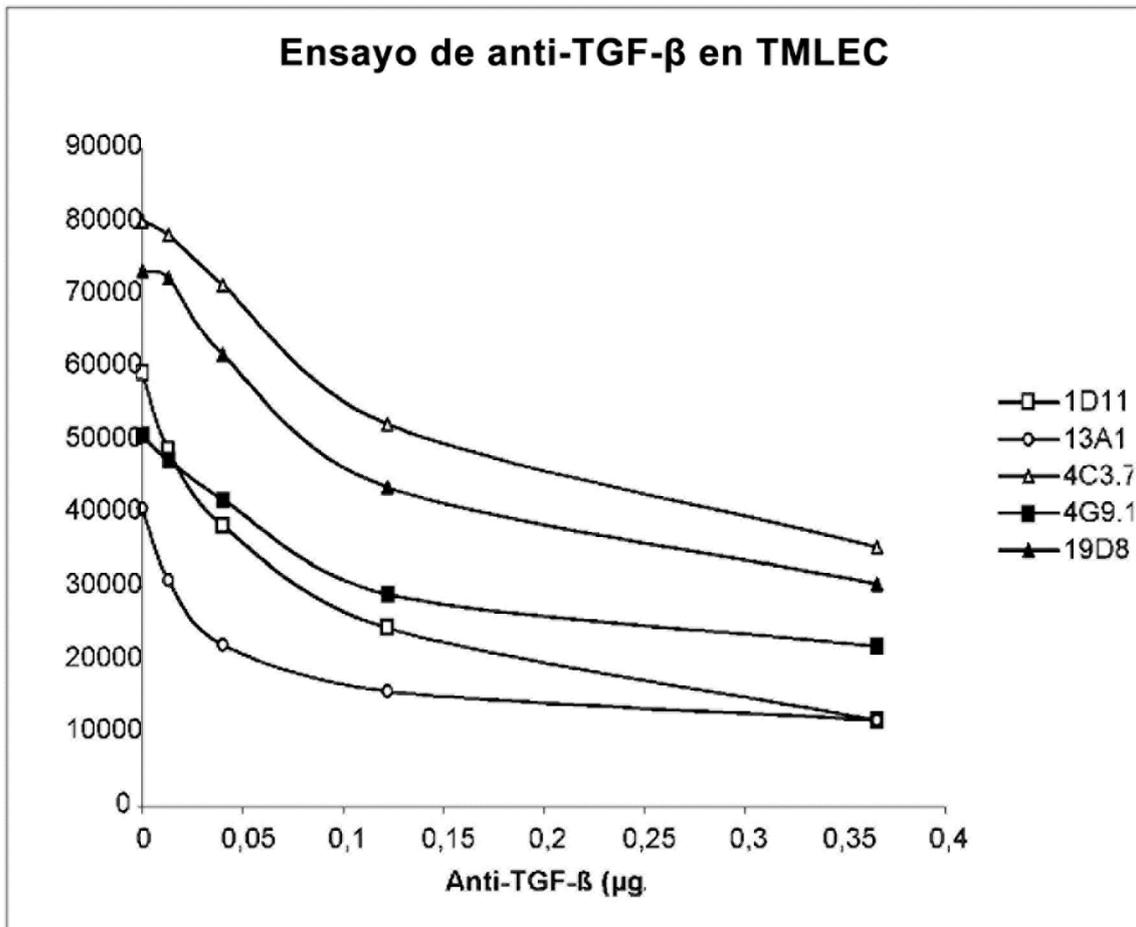


FIGURA 5

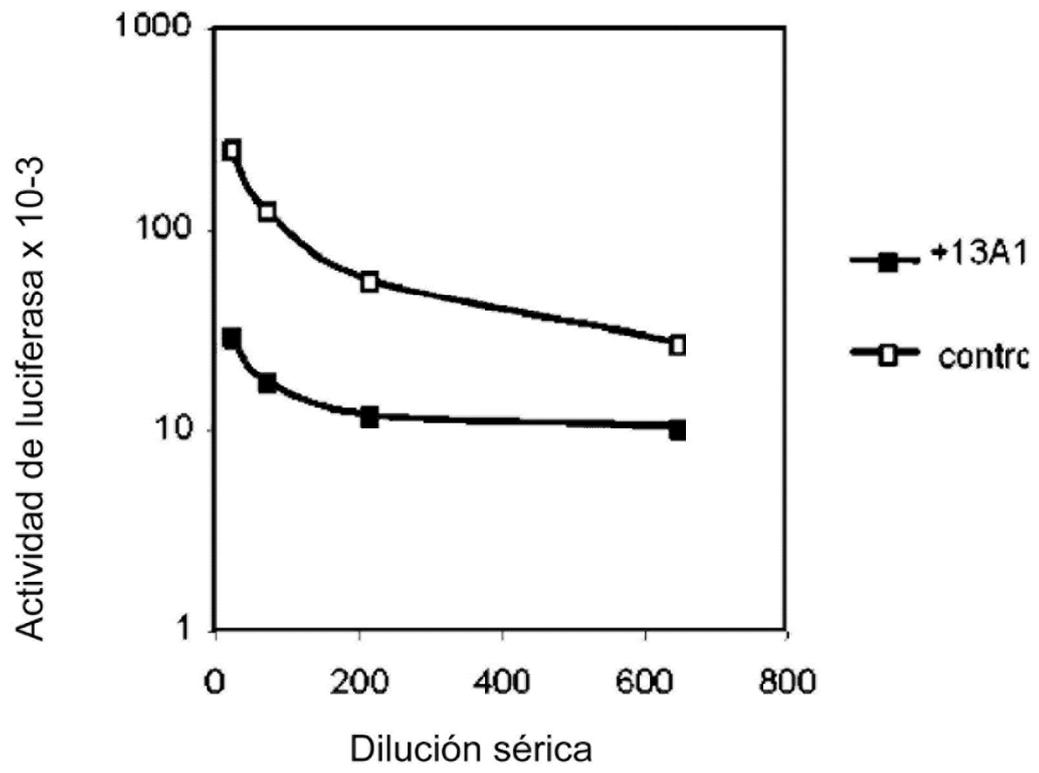


FIGURA 6

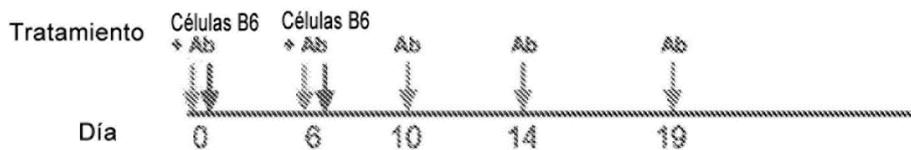
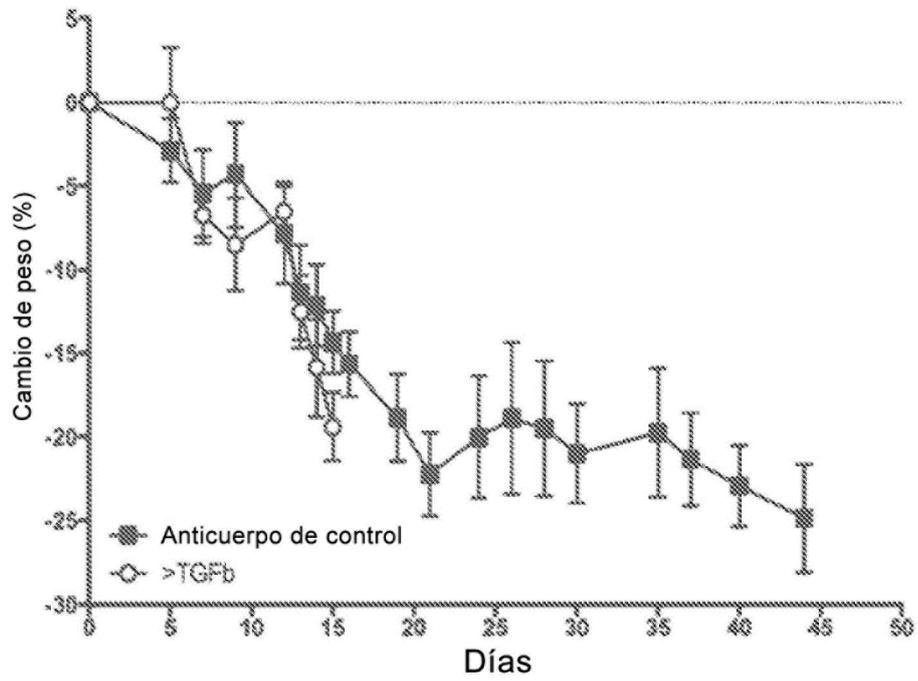
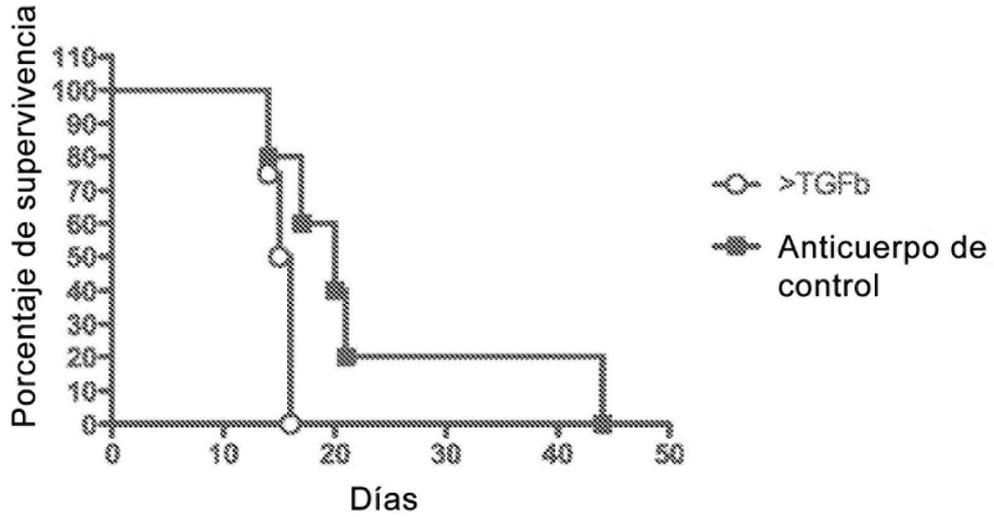


FIGURA 7

Ensayo de unión competitiva de anticuerpos

