

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 213**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2006 PCT/US2006/004424**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2006 WO06086469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2006 E 06734583 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 1850873**

54 Título: **Anticuerpos de TGFβ**

30 Prioridad:  
**08.02.2005 US 651343 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.04.2019**

73 Titular/es:  
**GENZYME CORPORATION (50.0%)  
50 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US y  
OPTEIN, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**LEDBETTER, STEVEN R.;  
HART, CELIA P.;  
HOLGATE, ROBERT G.;  
JERMUTUS, LUTZ U.;  
BUCHANAN, CATRIONA L.;  
DUNCAN, ALEXANDER R. y  
FINCH, DONNA K.**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 711 213 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 de TGF $\beta$

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpos, en particular, a moléculas de anticuerpos que se unen al factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), y a usos de estas. Más particularmente, la invención se refiere a moléculas de anticuerpos que se unen y, preferiblemente, neutralizan las moléculas de anticuerpos de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, denominadas "pan-específicas", y a usos de dichas moléculas de anticuerpos

Antecedentes

10 El TGF $\beta$  se identificó por primera vez en 1981 (Roberts *et al.*, 1981). En los seres humanos existen tres isoformas: El TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 (números de acceso Swiss Prot P01137, P08112 y P10600 respectivamente) que, en su estado biológicamente activo, son homodímeros de 25 kDa que comprenden dos monómeros de 112 aminoácidos unidos por medio de un puente disulfuro intercatenario. TGF $\beta$ 1 difiere de TGF $\beta$ 2 en 27 y de TGF $\beta$ 3 en 22 cambios de aminoácidos principalmente conservadores. Estas diferencias se han mapeado en la estructura 3D de TGF $\beta$  determinada por cristalografía de rayos X (Schlunegger *et al.*, 1992; Peer *et al.*, 1996) y se han definido las regiones de unión al receptor (Griffith *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1996).

15 Los TGF $\beta$  humanos son muy similares a los TGF $\beta$  de ratón: el TGF $\beta$ 1 humano tiene solo una diferencia de aminoácidos con respecto al TGF $\beta$ 1 de ratón, el TGF $\beta$ 2 solo tiene tres diferencias de aminoácidos con respecto al TGF $\beta$ 2 de ratón y el TGF $\beta$ 3 humano es idéntico al TGF $\beta$ 3 de ratón. Como resultado, la producción de anticuerpos de TGF $\beta$  humanos en ratones, incluidos ratones transgénicos, puede ser difícil.

20 Los TGF $\beta$  son citocinas multifuncionales que están implicadas en proliferación y diferenciación celular, en desarrollo embrionario, formación de matriz extracelular, desarrollo óseo, cicatrización de heridas, hematopoyesis, y respuestas inmunes e inflamatorias (Border *et al.*, 1995a). La desregulación de los TGF $\beta$  lleva a procesos patológicos que, en seres humanos, han estado implicados en numerosas condiciones, por ejemplo, defectos de nacimiento, cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunes y fibróticas (Border *et al.*, 1994; Border *et al.*, 1995b).

25 Se han llevado a cabo estudios en muchos modelos animales fibróticos (Border *et al.*, 1995b; Border *et al.*, 1994), utilizando anticuerpos neutralizantes como antagonistas, por ejemplo, glomerulonefritis (Border *et al.*, 1990), cicatrización neural (Logan *et al.*, 1994), cicatrización dérmica (Shah *et al.*, 1994) y fibrosis pulmonar (Giri *et al.*, 1993). Todas las enfermedades representadas por estos modelos representan una necesidad no cubierta de nuevos productos terapéuticos (Bonewald, 1999; Jackson, 1998). Sin embargo, los anticuerpos utilizados en estos y otros estudios en animales se han producido en animales y su beneficio terapéutico en seres humanos puede ser limitado debido a su potencial a inducir respuestas inmunogénicas y a su rápido aclaramiento farmacocinético (Vaughan *et al.*, 1998). Los anticuerpos humanos son más deseables para tratamiento de enfermedades mediadas por TGF $\beta$ .

35 Se conoce que una variedad de fragmentos de anticuerpo son capaces de unirse a una proteína diana específicamente y con buena afinidad. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo que comprenden solo los dominios variables de cadena pesada (VH) y variables de cadena ligera (VL) unidos conjuntamente por medio de un péptido de unión corto, conocido como Fv de cadena sencilla (scFv), se han utilizado ampliamente. Los anticuerpos humanos que neutralizan TGF $\beta$ 1 (CAT-192) o TGF $\beta$ 2 (CAT-152 o Trabio<sup>TM</sup>) se han generado anteriormente (EP 0 945 464, EP 0 853 661, Thompson *et al.* 1999). Sin embargo, la mayoría de anticuerpos de TGF $\beta$  disponibles en la técnica son no humanos. Además, antes de esta invención, los únicos anticuerpos monoclonales pan-específicos contra el TGF $\beta$  eran de roedores.

40 Los anticuerpos policlonales que se unen a TGF $\beta$ 1 humano y TGF $\beta$ 2 humano contra tanto epítopes neutralizantes como no neutralizantes se han producido en conejos (Danielpour *et al.* 1989b; Roberts *et al.*, 1990), pollos (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) y pavos (Danielpour *et al.*, 1989c). Los péptidos que representan secuencias de TGF $\beta$  parciales también se han utilizado como inmunógenos para producir antisueros policlonales neutralizantes en conejos (Border *et al.*, 1990; Flanders *et al.*, 1988). Los anticuerpos policlonales no humanos de este tipo son inadecuados para uso terapéutico humano.

45 El 1D11.16 es un anticuerpo anti-TGF $\beta$  pan-específico murino que neutraliza TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 humanos y de ratón en un amplio intervalo de ensayos *in vitro* (Dasch *et al.*, 1989; Dasch *et al.*, 1996; R&D System ficha de producto para MAB1835) y es eficaz en estudios de prueba de principio en modelos animales de fibrosis (Ling *et al.*, 2003; Miyajima *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 1999; Khanna *et al.*, 1999; Shenkar *et al.*, 1994). Sin embargo, ya que el 1D11.16 es un anticuerpo monoclonal murino (Dasch *et al.*, 1989; Dasch *et al.*, 1996), es inadecuado para uso terapéutico en seres humanos.

50 La publicación internacional WO 2004/098637 se refiere a antagonistas de TGF-beta combinados con antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona para tratar insuficiencia renal, y se refiere a anticuerpos monoclonales murinos 1D11.16.

## Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra la neutralización (% de inhibición) de producción de fibronectina inducida (10 pM) de TGFβ1 (a), TGFβ2 (b) o TGFβ3 (c) a partir de células NHLF por medio de IgG4 (cuadrados cerrados) y 1D11.16 (círculos abiertos) germinales PET1073G12. El triángulo cerrado representa un IgG4 irrelevante sometido a ensayo en la concentración mayor (100 nM). Los datos se muestran como la media ± media SE de n experimentos llevados a cabo por duplicado. Para los valores IC<sub>50</sub>, véase la Tabla 2.

10 La Figura 2 muestra la neutralización (% de inhibición) de producción de fibronectina inducida (10 pM) de TGFβ1 (a), TGFβ2 (b) o TGFβ3 (c) a partir de células NHLF por medio de IgG4 (cuadrados cerrados) y 1D11.16 (círculos abiertos) germinales PET1074B9. El triángulo cerrado representa un IgG4 irrelevante sometido a ensayo en la concentración mayor (100 nM). Los datos se muestran como la media ± media SE de n experimentos llevados a cabo por duplicado. Para los valores IC<sub>50</sub>, véase la Tabla 2.

15 La Figura 3 muestra la neutralización (% de inhibición) de producción de fibronectina inducida (10 pM) de TGFβ1 (a), TGFβ2 (b) o TGFβ3 (c) a partir de células NHLF por medio de IgG4 (cuadrados cerrados) y 1D11.16 (círculos abiertos) germinales PET1287A10. El triángulo cerrado representa un IgG4 irrelevante sometido a ensayo en la concentración mayor (100 nM). Los datos se muestran como la media ± media SE de n experimentos llevados a cabo por duplicado. Para los valores IC<sub>50</sub>, véase la Tabla 2.

## Compendio de la invención

20 Basada en la descripción contenida en este documento, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une y neutraliza TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos, en donde dicha molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VH PET1073G12, que es SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VL PET1073G12, que es SEQ ID NO: 7, y en donde la región constante de cadena pesada es una región constante de anticuerpo humano a partir de IgG4.

25 La presente invención proporciona además una composición que comprende la molécula de anticuerpo de la invención.

La presente invención incluso proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo según la invención, o un dominio VH y un dominio VL de dicha molécula de anticuerpo.

30 La presente invención proporciona también una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VH de una molécula de anticuerpo de la invención y una secuencia de nucleótido que codifica el dominio VL de dicha molécula de anticuerpo.

La presente invención incluso proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped que comprende:

35 1) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable VH, y

2) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable VL,

de la molécula de anticuerpo según la invención en condiciones para producir dicha molécula de anticuerpo y aislar y/o purificar dicha molécula de anticuerpo.

40 La presente invención proporciona también una molécula de anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica, en donde la enfermedad fibrótica se selecciona de entre fibrosis renal, fibrosis pulmonar o fibrosis de pulmón.

La presente invención proporciona también una molécula de anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer.

La presente invención proporciona también una molécula de anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedad mediada por el sistema inmune.

45 La presente invención proporciona también una molécula de anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedad renal.

Otras realizaciones de la presente invención se describen en las reivindicaciones anejas.

En varios aspectos de la invención se proporciona la materia de las realizaciones incluidas a continuación. Otros aspectos y realizaciones de la invención se describen en la descripción en este documento.

- La presente descripción proporciona miembros de unión específicos para TGF $\beta$ , en particular, TGF $\beta$  humano. Los miembros de unión específicos que se dirigen a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 se proporcionan particularmente. Los casos preferidos en la presente descripción son moléculas de anticuerpo, tanto anticuerpos completos (por ejemplo, IgG, tales como IgG1 o IgG4) como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, scFv, Fab, dAb). Se proporcionan regiones de unión a antígeno y sitios de unión a antígeno de anticuerpos, como son los dominios VH y VL de anticuerpo que contienen regiones de este tipo. En los dominios VH y VL se proporcionan regiones determinantes de complementariedad, CDR, que se pueden proporcionar en diferentes regiones estructurales, FR, para formar dominios VH o VL según sea el caso. Un sitio de unión a antígeno puede consistir en un dominio VH y/o dominio VL o porciones de unión a antígeno de estos.
- 5
- 10 En un aspecto, la presente descripción proporciona un miembro de unión específico para TGF $\beta$  humano, que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, un conjunto de HCDR, un conjunto de LCDR, o ambos y/o un dominio VH, dominio VL de anticuerpo humano o ambos.
- El conjunto de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 puede tener secuencias seleccionadas de entre los siguientes grupos:
- 15 HCDR1 SEQ ID NO: 3, HCDR2 SEQ ID NO: 4, HCDR3 SEQ ID NO: 5 (referido en este documento como el conjunto de "PET1073G12 de HCDR");
- HCDR1 SEQ ID NO: 13, HCDR2 SEQ ID NO: 14, HCDR3 SEQ ID NO: 15 (referido en este documento como el conjunto de "PET1074B9 de HCDR");
- HCDR1 SEQ ID NO: 23, HCDR2 SEQ ID NO: 24, HCDR3 SEQ ID NO: 25 (referido en este documento como el conjunto de "PET1287A10 de HCDR").
- 20 El conjunto de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 puede tener secuencias seleccionadas de entre los siguientes grupos:
- LCDR1 SEQ ID NO: 8, LCDR2 SEQ ID NO: 9, LCDR3 SEQ ID NO: 10 (referido en este documento como el conjunto de "PET1073G12 de LCDR");
- LCDR1 SEQ ID NO: 18, LCDR2 SEQ ID NO: 19, LCDR3 SEQ ID NO: 20 (referido en este documento como el conjunto de "PET1074B9 de LCDR");
- 25 LCDR1 SEQ ID NO: 28, LCDR2 SEQ ID NO: 29, LCDR3 SEQ ID NO: 30 (referido en este documento como el conjunto de "PET1287A10 de LCDR").
- El conjunto PET1073G12 de HCDR junto con el conjunto PET1073G12 de LCDR se refiere en este documento como el conjunto PET1073G12 de CDR.
- 30 El conjunto PET1074B9 de HCDR junto con el conjunto PET1074B9 de LCDR se refiere en este documento como el conjunto PET1074B9 de CDR.
- El conjunto PET1287A10 de HCDR junto con el conjunto PET1287A10 de LCDR se refiere en este documento como el conjunto PET1287A10 de CDR.
- Un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR tal como se describe en este documento se proporciona también por la presente descripción, como lo es por separado un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR tal como se describe en este documento. Preferiblemente, un dominio VH de este tipo se aparea con un dominio VL de este tipo y, de manera más preferida, los apareamientos de los dominios VH y VL son los mismos en los clones tal como se expone en este documento.
- 35
- Se proporciona, además, por medio de la presente invención, un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en donde el conjunto de HCDR se corresponde con aquel para PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 con una o dos sustituciones de aminoácidos.
- 40
- Se proporciona además, por medio de la presente invención, un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en donde el conjunto de CDR se corresponde con aquel para PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 con una o dos sustituciones de aminoácidos.
- 45 Un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo en un dominio VH y/o VL de este tipo se proporciona también por medio de la presente descripción.
- 50 Siguiendo la pista de la química computacional en aplicar técnicas de análisis de datos multivariantes a las relaciones estructura/propiedad-actividad (Wold, *et al.* Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holanda, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)), las relaciones cuantitativas actividad-propiedad de anticuerpos se pueden derivar utilizando técnicas matemáticas conocidas tales como regresión estadística, reconocimiento y clasificación de patrones (Norman *et al.* Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3ª edición (Abril 1998) ISBN: 0471170828; Abraham Kandel, Eric Backer. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR; (11 de mayo,

1995), ISBN: 0133418847; Wojtek Krzanowski. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, N.º 22 (Documento)). Oxford University Press; (Diciembre 2000), ISBN: 0198507089; Ian H. Witten, Eibe Frank. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (11 de octubre, 1999), ISBN: 1558605525; David G. T. Denison (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (Julio 2002), ISBN: 0471490369; Arup K. Ghose, Vellarkad N. Viswanadhan. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8). Las propiedades de anticuerpos se pueden derivar a partir de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, análisis de residuos de contacto probables o propiedad fisicoquímica calculada) de la secuencia del anticuerpo, estructuras funcionales y tridimensionales y estas propiedades se pueden considerar individualmente y en combinación.

El análisis de anticuerpos de estructura atómica conocida ha elucidado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de unión a anticuerpo (Chothia C. *et al.* Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817; Al-Lazikani, *et al.* Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948). Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (bucle) en dominios VH, los bucles de los sitios de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de cadena principal: estructuras canónicas. La estructura canónica formada en un bucle particular ha mostrado estar determinada por su tamaño y la presencia de ciertos residuos en sitios clave tanto en el bucle como en regiones estructurales (Chothia *et al.* and Al-Lazikani *et al.*, *supra*).

Este estudio de relación secuencia-estructura se puede utilizar para predecir aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, los cuales son importantes para mantener la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y, por consiguiente, para mantener la especificidad de unión. Estas predicciones se pueden confirmar al comparar las predicciones con el resultado de experimentos de optimización líder. En un planteamiento estructural, un modelo teórico se puede crear de la molécula de anticuerpo (Chothia, *et al.* Science, 223, 755-758 (1986)) utilizando cualquier paquete de libre disposición o comercial como WAM (Whitelegg, N.R.u. and Rees, A.R (2000) Prot. Eng., 12, 815-824). Entonces, se puede utilizar un paquete de *software* de visualización de proteína y análisis tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View (Guex, N. y Peitsch, M.C. Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723) para evaluar posibles sustituciones en cada posición en el CDR y FR. Esta información se puede utilizar entonces para hacer sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso en la actividad.

Las técnicas requeridas para hacer sustituciones en secuencias de aminoácidos de CDR, dominios VH o VL de anticuerpo y miembros de unión específicos generalmente están disponibles en la técnica. Se pueden hacer secuencias variantes, con sustituciones que pueden predecirse o no que tienen un efecto mínimo o beneficioso en la actividad, y que se pueden someter a ensayo para la capacidad de unirse y/o neutralizar TGFβ y/o para cualquier otra propiedad deseada. Esto se discute más adelante.

Tal como ya se señaló, la presente descripción proporciona miembros de unión específicos que comprenden un conjunto definido de CDR, en particular, el conjunto de CDR de PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10, y conjuntos de CDR de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 con una o más sustituciones en el conjunto de CDR.

El conjunto relevante de CDR se proporciona en regiones estructurales de anticuerpo u otro andamiaje proteico, es decir, fibronectina o citocromo B. Preferiblemente, se emplean regiones estructurales de anticuerpo.

En un caso preferido, la cadena pesada utiliza un gen de la familia V<sub>H</sub>1 humano. En varios casos, la secuencia estructural de aminoácidos de cadena pesada contiene 1-12, preferiblemente 3-12 y más preferiblemente 3-8 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos germinal del gen de la familia V<sub>H</sub>1. En algunos casos, la secuencia de estructura de la cadena pesada es la secuencia germinal. En casos particularmente preferidos, la región estructural de anticuerpo para la cadena pesada puede ser DP-10 humano (V<sub>H</sub> 1-69) o DP-88 humano (V<sub>H</sub> 1-e) de la familia V<sub>H</sub>1. Preferiblemente, los casos que utilizan un gen DP-10 humano tienen un aminoácido no germinal en los residuos 27, 78 y 94. En algunos casos, el residuo 27 es tirosina, el residuo 78 es treonina y el residuo 94 es serina o leucina. En algunos casos, la cadena ligera utiliza un gen de la familia V<sub>k</sub>3 humano con 1-5, preferiblemente 1-4, más preferiblemente 1-3 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos germinales. En algunos casos, la secuencia estructural de la cadena ligera es la secuencia del gen de la familia V<sub>k</sub>3 humano germinal. En casos particularmente preferidos, la región estructural para la cadena ligera puede ser DPK-22 humano (A27). En algunos casos de este tipo, el residuo 2 es un aminoácido no germinal. En algunos casos, el residuo 2 es una treonina.

En un caso sumamente preferido, se proporciona un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, este se denomina "dominio VH PET1073G12", o SEQ ID NO: 12, este se denomina "dominio VH PET1074B9", o SEQ ID NO: 22, este se denomina "dominio VH PET1287A10".

En otro caso sumamente preferido, se proporciona un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, este se denomina "dominio VL PET1073G12", o SEQ ID NO: 17, este se denomina "dominio VL PET1074B9", o SEQ ID NO: 27, este se denomina "dominio VL PET1287A10". Un caso sumamente preferido proporcionado según

la presente descripción se compone del dominio VH PET1073G12, SEQ ID NO: 2, y el dominio VL PET1073G12, o SEQ ID NO: 7. Otro caso sumamente preferido proporcionado según la presente descripción se compone del dominio VH PET1074B9, SEQ ID NO: 12, y el dominio VL PET1074B9, o SEQ ID NO: 17. Otro caso sumamente preferido proporcionado según la presente descripción se compone del dominio VH PET1287A10, SEQ ID NO: 22, y el dominio VL PET1287A10, o SEQ ID NO: 27. Estos o cualquier otro sitio de unión antígeno-anticuerpo proporcionado según la presente descripción se puede proporcionar en cualquier formato de molécula de anticuerpo deseado, por ejemplo, scFv, Fab, IgG1, IgG4, dAb, etc., tal como se discute más adelante en este documento.

En otro caso sumamente preferido, la presente descripción proporciona una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende el dominio VH PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, preferiblemente comprende también el correspondiente dominio VL PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10.

Otro IgG4 u otras moléculas de anticuerpo que comprenden el dominio VH PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, y/o el dominio VL PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 se proporcionan por medio de la presente descripción tal como son otras moléculas de anticuerpo que comprenden el conjunto de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de HCDR en un dominio VH de anticuerpo, y/o el conjunto de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de LCDR en el dominio VL de anticuerpo.

Es conveniente señalar aquí que "y/o", donde se utiliza en este documento, se debe tomar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados el uno con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" se debe tomar como descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, simplemente tal como si cada uno se expusiera individualmente en este documento.

Tal como se señaló, en ciertos casos de la presente descripción, se proporciona un miembro de unión específico que une todas las tres isoformas de TGF $\beta$  humano y que comprende los dominios VH y/o VL PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 y/o las porciones de unión a antígeno de estos dominios.

En algunos casos, un dominio VH se aparea con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno. En un caso preferido, el dominio VH PET1073G12 (SEQ ID NO: 2) se aparea con el dominio VL PET1073G12 (SEQ ID NO: 7) de modo que se forma un sitio de unión a antígeno que comprende tanto los dominios VH como VL PET1073G12. En un caso preferido, el dominio VH PET1074B9 (SEQ ID NO: 12) se aparea con el dominio VL PET1074B9 (SEQ ID NO: 17) de modo que se forma un sitio de unión a antígeno que comprende tanto los dominios VH como VL PET1074B9. En un caso preferido, el dominio VH PET1287A10 (SEQ ID NO: 22) se aparea con el dominio VL PET1287A10 (SEQ ID NO: 27) de modo que se forma un sitio de unión antígeno-anticuerpo que comprende tanto los dominios VH como VL PET1287A10. En otros casos, el VH PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 se aparea con un dominio VL distinto del correspondiente VL PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la técnica.

De manera similar, cualquier conjunto de HCDR descrito en este documento se puede proporcionar en un dominio VH que se utiliza como miembro de unión específico solo o en combinación con un dominio VL. Un dominio VH se puede proporcionar con un conjunto de HCDR tal como se describe en este documento y, si un dominio VH de este tipo se aparea con un dominio VL, entonces el dominio VL se puede proporcionar con un conjunto de LCDR descrito en este documento. Un apareamiento de un conjunto de HCDR y un conjunto de LCDR puede ser tal como se describe en este documento para los anticuerpos PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10. Las regiones estructurales de los dominios VH y/o VL pueden ser estructuras germinales. Las regiones estructurales del dominio de cadena pesada se pueden seleccionar de entre la familia V<sub>H</sub>-1, y una estructura V<sub>H</sub>-1 preferida es la estructura DP-10 o DP-88. Las regiones estructurales del dominio de cadena ligera se pueden seleccionar de entre la familia V<sub>L</sub>-1, y una estructura este tipo preferida es la estructura DPK-22.

Uno o más CDR se pueden tomar de un dominio VH o VL cuya secuencia se describe en este documento y se incorpora en una estructura adecuada. Esto se discute más adelante en este documento. Lo mismo es aplicable a otros CDR y conjuntos de CDR de anticuerpos como los obtenidos utilizando métodos descritos en este documento.

Un dominio VH de anticuerpo, un dominio VL de anticuerpo, un conjunto de HCDR, un conjunto de LCDR, un conjunto de CDR, uno o más HCDR, por ejemplo, un HCDR3, y/o uno o más LCR, por ejemplo, un LCDR3, se pueden emplear para otras moléculas, por ejemplo, métodos de mutación y selección de sitios de unión a antígeno con potencia mejorada.

Las variantes de dominios VH y VL, y CDR de la presente descripción, incluidos aquellos cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en este documento, y los cuales se pueden emplear en miembros de unión específicos para TGF $\beta$ , se pueden obtener por medio de métodos de alteración o mutación de secuencia y cribado. Métodos de este tipo se proporcionan también por medio de la presente descripción.

Variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL, cuyas secuencias se describen específicamente en este documento, se pueden emplear según la presente descripción, tal como se discute. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido) de la secuencia de aminoácidos, pueden ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de

aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 o 1. Las alteraciones se pueden hacer en una o más regiones estructurales y/o uno o más CDR.

Según otros aspectos de la presente descripción, se proporciona un miembro de unión específico humano, humanizado, quimérico o sintético que compite o compite de manera cruzada para unirse a un antígeno con cualquier miembro de unión a antígeno que tanto se une al antígeno como comprende una región de unión antígeno-anticuerpo, dominio VH y/o VL descrito en este documento, conjunto de CDR o HCDR3 descrito en este documento, o una variante de cualquiera de ellos. La competición entre miembros de unión se puede ensayar fácilmente *in vitro*, por ejemplo, utilizando ELISA y/o al marcar una molécula informadora específica a un miembro de unión que se puede detectar en presencia de otro(s) miembro(s) de unión no marcado(s), para habilitar la identificación de miembros de unión específicos que se unen al mismo epítotope o a un epítotope solapado. La competición cruzada entre miembros de unión se puede ensayar sin inconvenientes al ejecutar el ensayo inverso, por ejemplo, al invertir los miembros de unión marcados y no marcados para identificar pares que bloquean la unión en ambas direcciones.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente descripción proporciona un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que compite o compite de manera cruzada con una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, en particular, un scFv y/o IgG4 PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, para unirse a TGF $\beta$ . En varios casos, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o sintético. En otros aspectos, la presente invención proporciona un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o sintético que compite o compite de manera cruzada con un sitio de unión a antígeno de la presente invención para unirse a TGF $\beta$ , en donde el sitio de unión a antígeno del anticuerpo humano, humanizado, quimérico o sintético se compone de un dominio VH y un dominio VL, y en donde el dominio VH y VL comprende un conjunto de CDR tal como se describe en este documento.

Dada la información descrita en este documento, varios métodos están disponibles en la técnica para obtener anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o sintéticos contra TGF $\beta$  y que pueden competir o competir de manera cruzada con una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, una molécula de anticuerpo con un conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de CDR, una molécula de anticuerpo con un conjunto de HCDR PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o una molécula de anticuerpo con un conjunto de LCDR PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, para unirse a TGF $\beta$ .

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para obtener uno o más miembros de unión específicos capaces de unirse a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, el método incluye poner en contacto una biblioteca de miembros de unión específicos según la descripción y dichos TGF $\beta$ , y seleccionar uno o más miembros de unión específicos de la biblioteca capaces de unirse a todos dichos TGF $\beta$ .

La biblioteca se puede mostrar en la superficie de partículas bacteriófagas, cada partícula contiene ácido nucleico que codifica el dominio variable VH de anticuerpo mostrado en su superficie y, opcionalmente, puede mostrar también un dominio VL si está presente.

Después de la selección de miembros de unión específicos capaces de unirse al antígeno y mostrados en partículas bacteriófagas, el ácido nucleico se puede tomar de una partícula bacteriófaga que muestra dicho miembro de unión específico seleccionado. Un ácido nucleico de este tipo se puede utilizar en la posterior producción de un miembro de unión específico o un dominio variable VH de anticuerpo (y, opcionalmente, un dominio variable VL de anticuerpo) al expresarse a partir de un ácido nucleico con la secuencia de ácidos nucleicos tomada de una partícula bacteriófaga que muestra dicho miembro de unión específico seleccionado.

Un dominio VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de anticuerpo de dicho miembro de unión específico seleccionado se puede proporcionar de una forma aislada, tal como puede ser un miembro de unión específico que comprende un dominio VH de este tipo. La capacidad de unirse a todas las tres isoformas de TGF $\beta$  se puede someter a ensayo adicionalmente, también la capacidad para competir o competir de manera cruzada con PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 (por ejemplo, en formato scFv y/o en formato IgG, por ejemplo, IgG4) para unirse a todas las tres isoformas humanas de TGF $\beta$ . La capacidad para neutralizar TGF $\beta$  se puede someter a ensayo, tal como se describe más adelante.

Un miembro de unión específico según la presente descripción puede unirse a TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y/o TGF $\beta$ 3 con la afinidad de una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, por ejemplo, scFv, o preferiblemente IgG4, o con una afinidad que es mayor que la de una de las moléculas anteriores. Un miembro de unión específico según la presente descripción puede neutralizar TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y/o TGF $\beta$ 3 con la potencia de una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, por ejemplo, scFv, o preferiblemente IgG4 PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o con una potencia que es mayor que la de una de las moléculas anteriores.

Un miembro de unión específico según la presente descripción puede neutralizar un TGF $\beta$  que existe de manera natural con la potencia de una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, por ejemplo, scFv, o preferiblemente IgG4, o con una potencia que es mayor que la de una de las moléculas anteriores. La afinidad de

unión y la potencia de neutralización de diferentes miembros de unión específicos se puede comparar en condiciones apropiadas.

5 Un caso preferido de la presente descripción comprende preferiblemente anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o sintéticos que neutralizan TGFβ que existe de manera natural con una potencia que es igual o mayor a la potencia de un sitio de unión a antígeno TGFβ formado por medio de dominio VH PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 y el correspondiente dominio VL PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10.

10 Además de las secuencias de anticuerpo, un miembro de unión específico según la presente descripción puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o puede impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión específicos de la descripción pueden llevar un marcador detectable, o se pueden conjugar con una toxina o un resto diana o enzima (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o enlazador).

15 En otros aspectos, la descripción proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión específico, dominio VH y/o dominio VL o CDR según la presente descripción, y métodos para preparar un miembro de unión específico, un dominio VH y/o dominio VL o CDR de la descripción, cuyos métodos comprenden expresar dicho ácido nucleico en condiciones para producir dicho miembro de unión específico, dominio VH y/o dominio VL o CDR y recuperarlo.

20 Los miembros de unión específicos según la descripción se pueden utilizar en un método para tratar o diagnosticar el cuerpo humano o animal, tal como un método para tratar (que puede incluir tratamiento profiláctico) una enfermedad o trastorno en un paciente humano, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un miembro de unión específico de la descripción. Las condiciones tratables según la presente descripción incluyen cualquiera en la que el TGFβ desempeñe un papel, especialmente, en el tratamiento de enfermedad fibrótica, la modulación de cicatrización de heridas y el tratamiento de cáncer.

25 Más particularmente, los miembros de unión específicos de la descripción son útiles para inhibir la actividad de cualquiera o de todas las tres isoformas de TGFβ humano *in vitro* o *in vivo*. Las actividades de este tipo incluyen, pero no se limitan a, señalización mediada por TGFβ, deposición de matriz extracelular (MEC), inhibición de proliferación celular epitelial y endotelial, promoción de proliferación muscular lisa, inducción de expresión del colágeno tipo III, inducción de TGFβ, fibronectina, expresión de VEGF e IL-11, unión de péptido asociado a la latencia, inmunosupresión inducida por tumor, promoción de angiogénesis, activación de miofibroblastos, promoción de metástasis e inhibición de la actividad celular NK.

30 Los miembros de unión específicos de la descripción son también útiles para tratar enfermedades y condiciones que son un resultado directo o indirecto de la actividad de TGFβ. Debido a que los miembros de unión específicos de la descripción son pan-específicos, es decir, se unen e inhiben la actividad de todas las tres isoformas de TGFβ, estos son particularmente ventajosos para tratar condiciones y enfermedades que implican dos o más isoformas de TGFβ (tales como infecciones y tumores) y condiciones graves donde la inhibición de múltiples blancos es deseable.

35 Los miembros de unión específicos son útiles para tratar enfermedades y condiciones que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades fibróticas (tales como glomerulonefritis, cicatrización neural, cicatrización dérmica, fibrosis pulmonar, fibrosis de pulmón, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis) quemaduras, enfermedades mediadas por el sistema inmune, enfermedades inflamatorias (incluida artritis reumatoide), rechazo de trasplante, cáncer, contractura de Dupuytren y úlceras gástricas. También son útiles para tratar, prevenir y reducir el riesgo de aparición de insuficiencias renales que incluyen, pero no se limitan a, nefropatía diabética (tipo I y tipo II), nefropatía por radiación, nefropatía obstructiva, esclerosis sistémica difusa, fibrosis pulmonar, rechazo de injerto, insuficiencia renal hereditaria (por ejemplo, enfermedad renal poliquística, espongiosis medular renal, riñón en herradura), glomerulonefritis, nefroesclerosis, nefrocalcinosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, enfermedad de Berger, hipertensión sistémica o glomerular, nefropatía tubulointerstitial, acidosis tubular renal, tuberculosis renal e infarto renal. En particular, son útiles cuando se combinan con antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de renina, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ECA), antagonistas del receptor de Ang II (también conocidos como "bloqueadores del receptor de Ang II") y antagonistas de aldosterona. Los métodos para utilizar los miembros de unión específicos de la presente descripción en combinación con antagonistas de este tipo se describen en la solicitud PCT/US04/13677.

50 Los miembros de unión específicos de la descripción también son útiles para tratar enfermedades y condiciones asociadas con la deposición de MEC, dichas enfermedades y condiciones incluyen, pero no se limitan a, esclerosis sistémica, adherencia postoperatoria, cicatrización queloide e hipertrófica, vitreorretinopatía proliferativa, cirugía de drenaje del glaucoma, lesión corneal, cataratas, enfermedad de Peyronie, síndrome disneico agudo del adulto, cirrosis del hígado, cicatrización posterior al infarto de miocardio, restenosis posterior a la angioplastia, cicatrización después de hemorragia subaracnoide, esclerosis múltiple, fibrosis después de laminectomía, fibrosis después de reparaciones de tendón y otras, cicatrización debido a eliminación de tatuaje, cirrosis biliar (incluida colangitis esclerosante), pericarditis, pleuresía, traqueostomía, lesión penetrante del CNS, síndrome miálgico eosinofílico, restenosis vascular, enfermedad veno-oclusiva, pancreatitis y artropatía psoriásica.

5 Los miembros de unión específicos de la descripción son útiles además en condiciones donde la promoción de reepitelización es beneficiosa. Las condiciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de la piel, tales como úlceras venosas, úlceras isquémicas (llagas por presión), úlceras diabéticas, sitios de injertos, sitios de injertos en donantes, abrasiones y quemaduras; enfermedades del epitelio bronquial, tales como asma, ARDS, enfermedades del epitelio intestinal, tales como mucositis asociada con el tratamiento citotóxico, úlceras esofágicas (enfermedad de reflejo), úlceras estomacales y lesiones del intestino delgado y grueso (enfermedad inflamatoria intestinal).

10 Todavía otros usos de miembros de unión específicos de la descripción se dan en condiciones en las que la proliferación celular endotelial es deseable, por ejemplo, en estabilización de placas ateroscleróticas, promoción de curación de anastomosis vasculares, o en condiciones en las que la inhibición de la proliferación celular muscular lisa es deseable, tales como en enfermedad arterial, restenosis o asma.

15 Los miembros de unión específicos de la descripción también son útiles para potenciar la respuesta inmune a infecciones mediadas por macrófagos tales como aquellas causadas por *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, al igual que los protozoos *Toxoplasma gondii*, hongos *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Cryptococcus neoformans*, y *Rickettsia*, por ejemplo, *R. prowazekii*, *R. coronii*, y *R. tsutsugamushi*. También son útiles para reducir la inmunosupresión causada, por ejemplo, por tumores, SIDA o enfermedades granulomatosas.

20 Los miembros de unión específicos de la descripción son útiles además en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer incluidos, pero no limitados a, cáncer de mama, de próstata, de ovario, de estómago, renal, pancreático, colorrectal, de piel, de pulmón, cervical y de vejiga, glioma, mesotelioma, al igual que varias leucemias y sarcomas, tales como sarcoma de Kaposi, y, en particular, son útiles para tratar o prevenir recurrencias o metástasis de tumores de este tipo. En particular, los miembros de unión específicos antagonistas de la descripción son útiles para inhibir la metástasis mediada por ciclosporina.

25 Por supuesto, se apreciará que, en el contexto de la terapia contra el cáncer, el "tratamiento" incluye cualquier intervención médica que da como resultado la reducción de la velocidad del crecimiento del tumor o reducción en metástasis tumorales, al igual que remisión parcial del cáncer para prolongar la esperanza de vida del paciente.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica un dominio variable VH y/o dominio variable VL de anticuerpo descrito en este documento.

30 Otro aspecto de la presente descripción proporciona un ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia HCDR o LCDR descrita en este documento, especialmente un HCDR seleccionado de entre los SEQ ID NO: 3, 4, 5, 13, 14, 15, 23, 24 y 25 o un VL CDR seleccionado de entre los SEQ ID NO: 8, 9, 10, 18, 19, 20, 28, 29, 30, de manera más preferida HCDR3 PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 (SEQ ID NO: 5, 15 o 25, respectivamente). Los ácidos nucleicos que codifican el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de CDR, los ácidos nucleicos que codifican el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de HCDR y los ácidos nucleicos que codifican el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de LCDR se proporcionan también por medio de la presente descripción, al igual que los ácidos nucleicos que codifican CDR, HCDR, LCDR individuales y conjuntos de CDR, HCDR, LCDR PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10.

Otro aspecto proporciona una célula huésped transformada con ácido nucleico de la descripción.

40 Todavía otro aspecto proporciona un método para producir un dominio variable VH de anticuerpo, el método incluye provocar la expresión a partir del ácido nucleico codificante. Un método de este tipo puede comprender cultivar células huésped en condiciones para producir dicho dominio variable VH de anticuerpo o para provocar que dicho dominio VH de anticuerpo se exprese *in vivo*.

Los métodos análogos para producir dominios variables VL y miembros de unión específicos que comprenden un dominio VH y/o VL se proporcionan como otros aspectos de la presente descripción.

45 Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto.

Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Estos y otros aspectos de la descripción se describen con más detalle más adelante.

Descripción detallada de la invención

50 Terminología

Miembro de unión específico

Esto describe un miembro de un par de moléculas que se han unido específicamente entre sí. Los miembros de un par de unión específico pueden ser naturalmente derivados o producidos completa o parcialmente de manera

sintética. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une específicamente a un área en la superficie, o a una cavidad, del otro miembro del par de moléculas. Por lo tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. La presente descripción se refiere a miembros de unión específicos que se unen al antígeno diana.

## 5 Específico

Esto se puede utilizar para referirse a la situación en la que un miembro de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas diferentes de su(s) pareja(s) de unión específica(s) de un animal dado. Por ejemplo, un miembro de unión específico, específico para TGF $\beta$  humano, no tendrá una unión significativa a otras moléculas de TGF $\beta$  no humano, sin embargo, este puede reaccionar de manera cruzada con un TGF $\beta$  de otra especie.

10 Un miembro de unión específico de unión a antígeno comprende un sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión específico puede ser una molécula de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno se puede proporcionar también por medio de disposición de CDR en andamiajes proteicos de no anticuerpo tales como fibronectina o citocromo B, etc., Koide *et al.*, (1998) Journal of Molecular Biology, 284:1141-1151; Nygren *et al.* (1997) Current Opinion in Structural Biology, Vol. 7:463-469). Los andamiajes para diseñar sitios de unión innovadores en proteínas se han revisado en detalle por Nygren *et al.*, *supra*. Los andamiajes proteicos para miméticos de anticuerpo se describen en la publicación internacional WO 00/34784 que describe proteínas (miméticos de anticuerpo) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un andamiaje adecuado en el que se injerta uno o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR, se puede proporcionar por medio de un miembro de dominio de la superfamilia del gen de inmunoglobulina. El andamiaje puede ser una proteína humana o no humana.

Una ventaja de un andamiaje proteico de no anticuerpo es que este puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una región estructural conservada que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. Un tamaño pequeño de un miembro de unión específico le puede conferir propiedades fisiológicas útiles como capacidad para entrar en células, penetrar profundamente en tejidos o alcanzar blancos en otras estructuras, o unirse dentro de cavidades proteicas del antígeno diana.

25 Un uso de sitios de unión a antígeno en andamiajes proteicos de no anticuerpo se revisa en Wess, 2004. Son típicas las proteínas que tienen un esqueleto estable de uno o más bucles variables, en las que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles muta específica o aleatoriamente para crear un sitio de unión a antígeno que tiene especificidad para unirse al antígeno diana. Las proteínas de este tipo incluyen los dominios de unión a IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, dominio de la repetición 10<sup>9</sup> de fibronectina tipo III) y lipocalinas. Otros planteamientos incluyen "microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), que se basan en ciclótidos —pequeñas proteínas que tienen enlaces disulfuro intramolecular.

35 Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión a antígeno, un miembro de unión específico según la presente descripción puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o puede impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión específicos de la invención pueden llevar un marcador detectable, o se pueden conjugar con una toxina o un resto diana o enzima (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o enlazador). Por ejemplo, un miembro de unión específico puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) al igual que un sitio de unión a antígeno, en donde el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y dirige así el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

45 Aunque, como se ha señalado, los CDR pueden ser llevados por andamiajes tales como fibronectina o citocromo B (Haan y Maggos, 2004 BioCentury, 12(5): A1-A6; Koide *et al.*, *supra*; Nygren *et al.*, *supra*), la estructura para llevar un CDR o un conjunto de CDR de la descripción será generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de esta en la que el CDR o conjunto de CDR se ubica en una ubicación que se corresponde con el CDR o el conjunto de CDR de dominios variables VH y VL de anticuerpo que existen de manera natural codificados por medio de genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar con referencia a Kabat, *et al.*, 1987, y las actualizaciones de estos, ahora disponibles en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> o buscando "Kabat" utilizando cualquier motor de búsqueda).

## Molécula de anticuerpo

55 Esto describe una inmunoglobulina que se produce tanto de manera natural como parcial o completamente de manera sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a un antígeno son moléculas tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y anticuerpos.

En el genoma de una célula germinal humana, la información genética para cadenas polipeptídicas de anticuerpo está contenida en múltiples segmentos de gen dentro de los loci esparcidos a lo largo de diferentes cromosomas. Las cadenas pesadas humanas (VH) se codifican en el cromosoma 14, las cadenas ligeras kappa (VK) en el

cromosoma 2 y las cadenas ligeras lambda ( $\lambda$ ) en el cromosoma 22. Durante el desarrollo de los linfocitos B (células productoras de anticuerpos), los segmentos de gen en estos loci se ensamblan por medio de recombinación que lleva a la formación de genes completos de cadena pesada o ligera de anticuerpo (Tonegawa S. *Nature*, 302, 575-81, 1983). En gran parte, las regiones constantes de anticuerpo (VH, VK y  $\lambda$ ) son idénticas entre toda la población humana, pero existe una diversidad considerable en los dominios variables. Una diversidad de este tipo habilita el desarrollo de muchos miles de millones de anticuerpos diferentes cada uno con especificidad para un antígeno diana diferente.

La diversidad en las regiones variables de los anticuerpos se genera de diferentes maneras. En primer lugar, a nivel genético, existe una diversidad considerable en secuencias de genes germinales variables de anticuerpo. Aproximadamente, se han descrito 50 líneas germinales VH diferentes (Tomlinson I.M. *et al*, *J. Mol. Biol.*, 227, 776-798, 1992), 35 líneas germinales  $V_k$  diferentes (Tomlinson I.M. *et al* *EMBO J*, 14, 4628-38, 1995) y 30 líneas germinales  $\lambda$  diferentes (Williams S.C. y Winter G. *Eur. J. Immunol*, 23, 1456-61, 1993; Kawasaki K. *et al* *Genome Res*, 7, 250-61, 1997) Los anticuerpos se generan a partir de diferentes combinaciones de estas secuencias de genes germinales. Otra diversidad se introduce entonces en los dominios variables de anticuerpo por medio de procesos tales como recombinación somática o hipermutación (Tonegawa S. *Nature*, 302, 575-81, 1983).

Aunque existe una diversidad considerable en las secuencias de genes germinales variables de anticuerpo, es posible agrupar las secuencias en familias basadas en homología de secuencias. Las 50 secuencias de genes VH diferentes se pueden agrupar en 7 familias, las 35 secuencias  $V_k$  en 6 familias y las 30 familias  $\lambda$  en 10 familias. Los grupos pueden variar en tamaño entre cada miembro ( $VH_6$  y  $V_k4$ ) hasta 21 miembros ( $VH_3$ ) y los miembros de cada grupo comparten un alto grado de homología de secuencias.

Los anticuerpos se pueden alinear con las bases de datos de secuencias germinales VH y VL para determinar su apareamiento germinal más cercano y para identificar cualquier cambio de aminoácidos introducido por hipermutación somática. La investigación ha mostrado que el sistema inmune humano utiliza algunas líneas germinales (por ejemplo,  $VH_3$  DP47) en preferencia a otras (por ejemplo,  $VH_2$ ) durante una respuesta inmune (Knappik A. *et al* *J. Mol. Biol*, 296, 57-86, 2000). Sin embargo, las poblaciones de anticuerpos aislados por presentación en fagos utilizan típicamente un amplio intervalo de genes germinales, incluso cuando se aíslan contra un único antígeno (Edwards B. *et al* *J. Mol Biol*, 334, 103-118, 2003).

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y utilizar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Las técnicas de este tipo pueden implicar unir el ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina a una región constante, o introducir las regiones determinantes complementarias (CDR), de un anticuerpo en la región constante más regiones estructurales, o una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y un gran número de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo se puede someter a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Ya que los anticuerpos se pueden modificar de varias formas, la expresión "molécula de anticuerpo" se debería construir para abarcar cualquier miembro o sustancia de unión específicos que tienen un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo con la especificidad requerida. Por lo tanto, esta expresión abarca fragmentos de anticuerpo y derivados, incluido cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno, tanto sea natural como completa o parcialmente sintético. Las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, o equivalente, se fusionan con otro polipéptido y, por lo tanto, se incluyen. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y en un gran conjunto de bibliografía posterior.

Otras técnicas disponibles en la técnica de diseño de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas humanos tal como se describe por Kontermann *et al*. (Kontermann R y Dubel Stefan; *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545). La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión específicos se ha descrito en detalle en muchas publicaciones tales como Kontermann *et al.*, *supra*, y en la publicación internacional WO 92/01047 (discutida más adelante). Los ratones transgénicos, en los que los genes de anticuerpo de ratón se desactivan y reemplazan funcionalmente con genes de anticuerpo humanos mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmune de ratón, se pueden utilizar para aislar anticuerpos humanos de antígenos humanos (Mendez *et al.*, 1997). Los anticuerpos humanos, tanto monoclonales como policlonales, se pueden crear también en otros animales transgénicos tales como cabras, vacas, ovejas, conejos, etc.

Las moléculas de anticuerpo sintéticas se pueden crear por medio de expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo, tal como se describe por Knappik *et al.*, *supra* o Krebs *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84.

Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden llevar a cabo la función de antígenos de unión. Los ejemplos de fragmentos de unión son I) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, CL, VH y CHI; II) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CHI; III) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de

un único anticuerpo; IV) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty *et al.* (1990) Nature, 348, 552-554) que consiste en un dominio VH; V) regiones CDR aisladas; VI) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; VII) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se enlazan por medio de un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85, 5879-5883; 1998 VIII) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (PCT/US92/09665); y IX) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos contruidos por fusión genética (WO/13804); F. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90 6444-6448, 1993). Las moléculas de diacuerpo, Fv o scFv se pueden estabilizar por medio de la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Y. Reiter *et al.*, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 se pueden crear también (S. Hu *et al.*, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996).

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento de unión a antígeno monomérico de un anticuerpo, concretamente, la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt *et al.*, 2003). Los VH dAb existen de manera natural en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y se pueden producir al inmunizar un camélido con un antígeno diana, aislando las células B específicas de antígeno y clonando directamente genes dAb a partir de células B individuales. Los dAb se pueden producir también en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad de la temperatura los hace particularmente útiles fisiológicamente y adecuados para selección de maduración de afinidad. Un miembro de unión específico de la presente descripción puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente tal como se establece en este documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente tal como se establece en este documento.

Quando se van a utilizar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos, que se pueden fabricar de una variedad de maneras (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)) por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquier fragmento de anticuerpo biespecífico mencionado anteriormente. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos de la tecnología BiTE™ en los que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden utilizar y enlazar directamente por medio de péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos en una cadena polipeptídica sencilla corta. Los dicuerpos y scFv se pueden construir sin una región Fc, utilizando solo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de reacción anti-idiotípica.

Los diacuerpos bioespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, pueden ser también particularmente útiles porque se pueden construir fácilmente y expresar en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos de otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas se pueden seleccionar fácilmente utilizando presentación en fagos (WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo se va a mantener constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra TGFβ, entonces una biblioteca se puede crear donde se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos se pueden crear por medio de tecnología "botón en ojal" (C. E. B. Ridgeway *et al.*, Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

#### Sitio de unión a antígeno

Esto describe la parte de un miembro de unión específico, tal como una molécula de anticuerpo, que entra en contacto y es complementaria a parte de otro miembro o a todo este en el par de unión, es decir, el antígeno. En una molécula de anticuerpo, el sitio de unión a antígeno se puede referir como el sitio de unión antígeno-anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une específicamente y es complementaria a todo el antígeno diana o a parte de este. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solo a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epitope.

#### Dominio de unión a antígeno

Un dominio de unión a antígeno es una porción de un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión a antígeno y que se une al antígeno diana. En algunos casos, un dominio de unión a antígeno se puede proporcionar por uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, el denominado fragmento de anticuerpo Fd que consiste en un dominio VH) o porciones de unión a antígeno de estos. En algunos casos, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

Los miembros de unión específicos se pueden glicosilar, tanto naturalmente como por medio de sistemas de varias células eucariotas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503)), o se pueden (por ejemplo, si se producen por medio de expresión de una célula procariota) no glicosilar. La glicosilación se puede alterar también de manera intencionada, por ejemplo, al inhibir fucosilación, para aumentar la actividad ADCC del anticuerpo resultante. Por consiguiente, cualquier miembro de unión específico de la invención se puede expresar para minimizar o eliminar fucosilación.

En algunos casos, el CDR o dominio VH o VL de la descripción será tanto idéntico como sumamente similar a las regiones especificadas cuya secuencia se establece en este documento. Se contempla que de 1 a 5,

preferiblemente de 1 a 4 o 1 o 2 o 3 o 4 sustituciones de aminoácidos se pueden hacer en el CDR y/o dominios VH o VL. Los dominios VH o VL, y CDR y conjuntos de CDR que son sumamente similares a aquellos cuyas secuencias se proporcionan en este documento están incluidos por aspectos de la presente descripción, tal como lo están aquellos con secuencias que son sustancialmente como las establecidas en este documento.

- 5 La estructura para llevar un CDR o un conjunto de CDR de la descripción será generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de esta en la que el CDR o conjunto de CDR se ubica en una ubicación que se corresponde con el CDR o el conjunto de CDR de dominios variables VH y VL de anticuerpo que existen de manera natural codificados por medio de genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. US Department of Health and Human Services. 1987 y las actualizaciones de este, ahora disponibles en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> o buscando "Kabat" utilizando cualquier motor de búsqueda). Los CDR se definen según Kabat *et al.*

Los CDR pueden ser llevados también por medio de otros andamiajes tales como fibronectina o citocromo B.

- 15 Preferiblemente, una secuencia de aminoácidos de CDR, sustancialmente tal como se establece en este documento, es llevada como un CDR en un dominio variable humano o una porción sustancial de este. Las secuencias HCDR3, sustancialmente tal como se establecen en este documento, representan casos preferidos de la presente descripción y se prefiere que cada una de estas sea llevada como un HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humano o una porción sustancial de este.

- 20 Los dominios variables empleados en la descripción se pueden obtener o derivar a partir de cualquier dominio variable humano germinal o reorganizado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Una secuencia de CDR de la descripción (por ejemplo, CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carecen de un CDR (por ejemplo, CDR3) utilizando tecnología de ADN recombinante. Las estructuras germinales preferidas se han identificado ya en este documento.

- 25 Por ejemplo, Marks *et al.* (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) describe métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que cebadores de consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable se utilizan en conjunción con cebadores de consenso en la tercera región estructural de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VK que carecen de CDR2. Marks *et al.* describe además cómo este repertorio se puede combinar con un CDR2 de un anticuerpo particular. Utilizando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente descripción se pueden barajar con repertorios de dominios VH o VL que carecen de un CDR3, y los dominios VH o VL completos barajados se combinan con un dominio VL o VH parecido para proporcionar miembros de unión específicos de la descripción. Entonces, el repertorio se puede exponer en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de presentación en fagos de la publicación internacional WO92/01047 o cualquier conjunto grande posterior de la bibliografía, incluido Kay, B.K., Winter, J., y McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press, de modo que se puedan seleccionar miembros de unión específicos. Un repertorio puede consistir en de  $10^4$  miembros individuales en adelante, por ejemplo, de  $10^6$  a  $10^8$  a  $10^{10}$  miembros. Otros sistemas huésped adecuados incluyen presentación en levaduras, presentación en bacterias, presentación en T7, presentación en ribosomas, presentación covalente y etcétera.

- 40 Técnicas de barajado análogas o combinatorias son descritas también por Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), quien describe la técnica en relación a un gen  $\beta$ -lactamasa pero observa que el planteamiento se puede utilizar para la generación de anticuerpos.

- 45 Otra alternativa es para generar regiones VH o VL innovadoras que llevan secuencias derivadas de CDR de la descripción utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones en el dominio variable entero. Una técnica de este tipo es descrita por Gram *et al.* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 89:3576-3580), quien utilizó PCR propenso al error. En casos preferidos, se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos en un conjunto de HCDR y/o LCDR.

- 50 Otro método que se puede utilizar es dirigir mutagénesis a regiones CDR de los genes VH o VL. Técnicas de este tipo son descritas por Barbas *et al.*, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 91:3809-3813) y Schier *et al.* (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

Todas las técnicas descritas anteriormente son conocidas como tales en la técnica y en sí mismas no forman parte de la presente invención. Dada la descripción proporcionada en este documento, el experto será capaz de utilizar técnicas de este tipo para proporcionar miembros de unión específicos de la invención utilizando metodología rutinaria en la técnica.

- 55 Otro aspecto de la descripción proporciona un método para obtener un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo específico para el antígeno de TGF $\beta$ , el método comprende proporcionar por medio de adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH establecido en este documento, un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH, opcionalmente

5 combinar el dominio VH proporcionado así con uno o más dominios VL, y someter a ensayo el dominio VH o combinación VH/VL o combinaciones para identificar un miembro de unión específico o un dominio de unión a antígeno específico para TGF $\beta$ , y opcionalmente una o más propiedades preferidas, preferiblemente capacidad para neutralizar la actividad de TGF $\beta$ . Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente tal como se ha establecido en este documento.

Un método análogo se puede emplear en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL, descrito en este documento, se combina con uno o más dominios VH.

10 En un caso preferido, un dominio VH PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 se puede someter a mutación para proporcionar una o más variantes de secuencia de aminoácidos de dominio VH que se pueden combinar con uno o más dominios VL.

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para preparar un miembro de unión específico que es específico para todas las tres isoformas de TGF $\beta$  humano, dicho método comprende:

- a) proporcionar un repertorio inicial de ácidos nucleicos que codifica un dominio VH que tanto incluye un CDR3 para ser reemplazado como carece de una región codificante de CDR3;
- 15 b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos tal como se establece en este documento para un HCDR3 de tal manera que dicho ácido nucleico donante se inserta en la región CDR3 en el repertorio, para proporcionar un repertorio de producto de ácido nucleicos que codifican un dominio VH;
- c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de producto;
- 20 d) seleccionar un miembro de unión específico que es específico para al menos una isoforma de TGF $\beta$ ; y
- e) recuperar dicho miembro de unión específico o ácido nucleico que lo codifica.

El método puede comprender además las etapas de llevar a cabo ensayos de unión y ensayos de neutralización con cada una de las tres isoformas de TGF $\beta$  para identificar miembros de unión específicos que se unen y neutralizan todas las tres isoformas.

25 Otra vez, un método análogo se puede emplear en el que un LCDR3 de la descripción se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que tanto incluye un CDR3 para ser reemplazado como carece de una región codificante de CDR3.

30 De manera similar, uno o más, o todos los tres CDR se pueden injertar en un repertorio de dominios VH o VL que luego se van a cribar para un miembro de unión específico o miembros de unión específicos para todas las isoformas de TGF $\beta$  humano.

El dominio VH puede tener una secuencia germinal y, en casos preferidos, es DP-10 o DP-88. Un dominio VL puede tener una secuencia germinal y, en casos preferidos, es DPK-22.

35 En un caso preferido, uno o más de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de HCDR, se pueden emplear, y/o uno o más de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de LCDR.

40 Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, juntas con sus regiones estructurales intermediarias. Preferiblemente, la porción incluirá también al menos aproximadamente un 50% de tanto las primeras como cuartas regiones estructurales o ambas, siendo el 50% el C-terminal el 50% de la primera región estructural y el N-terminal el 50% de la cuarta región estructural. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que no se asocian normalmente con regiones de dominio variable que existen de manera natural. Por ejemplo, construir miembros de unión específicos de la presente invención creados por técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables de la descripción a otras secuencias proteicas incluidas cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diauerpos) o marcadores proteicos tal como se discute en detalle en otra parte de este documento.

50 Aunque en un caso preferido de la descripción se prefieren los miembros de unión específicos que comprenden un par de dominios VH y VL, los dominios de unión únicos basados en tanto secuencias de dominio VH como VL forman otros aspectos de la descripción. Se conoce que dominios de inmunoglobulina únicos, especialmente dominios VH, son capaces de unirse a antígenos diana de una manera específica.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión específicos únicos, estos dominios se pueden utilizar para cribar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión específico a dos dominios capaz de unirse a las tres isoformas de TGFβ humano.

5 Esto se puede alcanzar por método de cribado de presentación en fagos utilizando el enfoque combinatorio dual jerárquico tal como se describe en la publicación internacional WO92/01047, en la que una colonia individual que contiene tanto un clon de cadena H como L se utiliza para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específico de dos cadenas resultante se selecciona según las técnicas de presentación en fagos tales como las descritas en esta referencia. Esta técnica se describe también en Marks *et al.*, *ibid.*

10 Los miembros de unión específicos de la presente descripción pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de estos. Por ejemplo, un dominio VL se puede fijar en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo incluidas las cadenas C<sub>κ</sub> o C<sub>λ</sub> humanas, preferiblemente cadenas C<sub>κ</sub>. De manera similar, un miembro de unión específico basado en un dominio VH se puede fijar en su extremo C-terminal a toda o parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE y IgM y a cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1 y IgG4. Se prefiere IgG4. Se prefiere IgG4 para algunas aplicaciones porque no se une al complemento y no crea funciones efectoras. Cuando se desea función efectora, se prefiere IgG1. La función efectora se puede aumentar también al manipular el estado de glicosilación del anticuerpo, tal como al disminuir el contenido de fucosa, por medio de métodos que son conocidos en la técnica. La cadena pesada puede o no tener un residuo de lisina C-terminal. Cualquier variante de región constante sintética u otra que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables se prefiere también para su uso en casos de la presente descripción.

25 También se encuentran dentro de la descripción preparaciones heterogéneas de miembros de unión específicos o fragmentos de unión a antígeno de estos descritos en este documento. Por ejemplo, las preparaciones de este tipo pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas largas y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con varios grados de glicosilación, con aminoácidos derivados, tales como ciclación de ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico y/o con formas desamidadas de la cadena pesada o ligera.

30 Miembros de unión específicos de la invención se pueden marcar con un marcador detectable o funcional. Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como <sup>131</sup>I o <sup>99</sup>Tc, que se pueden fijar a anticuerpos de la invención utilizando química convencional conocida en la técnica de diagnóstico por imágenes de anticuerpos. Los marcadores incluyen también marcadores enzimáticos como peroxidasa de rábano. Los marcadores incluyen restos químicos tales como biotina que se pueden detectar por medio de unión a un resto detectable parecido específico, por ejemplo, avidina marcada.

Los miembros de unión específicos de la presente descripción se diseñan para utilizarlos en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, preferiblemente en seres humanos.

35 En algunos casos, miembros de unión específicos de la descripción inhiben la unión de TGFβ1, 2 y/o 3 a un receptor de TGFβ de superficie celular o complejo receptor, incluido, pero no limitado a, un complejo que comprende un receptor serina/treonina quinasa de tipo I o tipo II y un proteoglicano beta-glicano (receptor de tipo III de TGFβ). Por consiguiente, la descripción comprende un método para inhibir la unión de TGFβ a un receptor de TGFβ de superficie celular o un complejo de receptor que comprende la etapa de poner en contacto el TGFβ con un miembro de unión específico de la descripción y detectar la inhibición de la unión del receptor o complejo receptor. En varios casos, inhibir la unión del TGFβ a su(s) receptor(es) se puede indicar por medio de fosforilación reducida de receptor de TGFβ de tipo I, activación reducida de receptor de TGFβ de tipo I, fosforilación y/o activación reducida de proteínas R-SMAD, particularmente SMAD2 y SMAD3, translocación reducida de dichas proteínas SMAD al núcleo, unión reducida de proteína SMAD a ADN y/o modulación de la expresión de un gen cuya expresión en dicha célula o tipo celular se conoce que es mediada por medio de señalización de TGFβ. Otros ensayos se establecen en los ejemplos.

40 Por consiguiente, otros aspectos de la descripción proporcionan métodos de tratamiento que comprenden administración de un miembro de unión específico tal como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden un miembro de unión específico de este tipo, y uso de un miembro de unión específico de este tipo en la fabricación de un medicamento para administración, por ejemplo, en un método para crear un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión específico con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Miembros de unión específicos de la descripción se pueden administrar por medio de inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intracavidad (por ejemplo, después de resección de tumor), intralesional, intraperitoneal o intramuscular), por medio de inhalación o por vía tópica (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en las heridas, sobre la piel), o por vía oral. La vía de administración se puede determinar por las características fisicoquímicas del producto, por consideraciones especiales para la enfermedad, por dosis o intervalo de dosis o por el requisito de optimizar la eficacia o minimizar efectos secundarios.

Se prevé que el tratamiento anti-TGF $\beta$  no esté restringido a administración por profesionales sanitarios. Por lo tanto, inyección subcutánea, especialmente utilizando un dispositivo libre de aguja puede ser apropiada.

Según la presente descripción, las composiciones proporcionadas se pueden administrar a individuos en necesidad de estas. La administración es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", esto es suficiente para mostrar beneficios en un paciente. Un beneficio de este tipo es al menos la mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno particular. La cantidad real administrada, y la tasa y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se va a tratar. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., se puede determinar con base en estudios preclínicos y clínicos cuyo diseño se encuentra dentro del nivel de experiencia en la técnica.

La dosis concreta dependerá de un número de factores, incluidos si el anticuerpo es para diagnóstico o tratamiento, el tamaño y ubicación del área que se va a tratar, la naturaleza concreta del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula fijada al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpo se encontrará en el intervalo de 100  $\mu$ g a 1 gm para aplicaciones sistémicas, y de 1  $\mu$ g a 1 mg para aplicaciones tópicas. Típicamente, el anticuerpo será un anticuerpo entero, preferiblemente el isotipo IgG4. Esto es para una dosis de un tratamiento único de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente para niños e infantes, y se puede ajustar también para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular y actividad. Los tratamientos se pueden repetir diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, mensualmente u en otros intervalos, a discreción del médico. En casos preferidos de la presente descripción, el tratamiento es periódico, y el periodo entre administraciones es aproximadamente de dos semanas o más, preferiblemente aproximadamente tres semanas o más, más preferiblemente aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes.

Los miembros de unión específicos de la presente descripción se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del cuerpo de unión específico.

Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas según la presente descripción, y para su uso según la presente descripción, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales conocidos por los expertos en la técnica. Los materiales de este tipo deberían ser no tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. Los materiales de este tipo podrían incluir, por ejemplo, todos y cualquier disolvente, medio de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, al igual que combinaciones de estos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil en depósito o efectividad del anticuerpo. La naturaleza concreta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, tópica, por inhalación o por inyección, por ejemplo, intravenosa. En un caso preferido, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otro caso preferido, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas para administración vía oral se pueden encontrar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. 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, nafta mineral, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol. El miembro de unión específico (y otros ingredientes, si se desea) se puede contener también en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimir en comprimidos, o incorporar directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica por vía oral, el ingrediente activo se puede incorporar con excipientes y utilizar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la descripción por medio de administración que no sea parental, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y que tiene una pK, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Aquellos con experiencia relevante en la técnica son capaces de preparar disoluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según se requiera.

Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, tanto de manera simultánea como secuencial dependiendo de la condición que se va a tratar.

Los miembros de unión específicos de la presente invención se pueden formular en formas líquidas, semisólidas o sólidas tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusibles) dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración, aplicación terapéutica, las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la vía de entrega. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo, azúcares, aminoácidos y tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo y pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir por medio de liofilización, secado por atomización, o secado por tecnología fluida supercrítica, por ejemplo.

Típicamente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura solicitada adecuada para una concentración alta de fármaco. Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el miembro de unión específico en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de estos enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada y filtrada de este. La fluidez correcta de una disolución se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de un revestimiento tal como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de tensioactivos. Se puede provocar absorción prolongada de composiciones inyectables al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En ciertas realizaciones, el compuesto activo de las composiciones de anticuerpo se puede preparar con un vehículo que protegerá al anticuerpo contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de entrega microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para preparar formulaciones de este tipo están patentados o generalmente son conocidos por expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

La presente descripción proporciona un método que comprende provocar o permitir la unión de un miembro de unión específico tal como se proporciona en este documento a TGF $\beta$ . Tal como se señaló, una unión de este tipo puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, seguida de administración de un miembro de unión específico, o ácido nucleico que codifica un miembro de unión específico, a un paciente, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo, en ELISA, Western blot, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía por afinidad, o ensayos basados en células, o en métodos terapéuticos basados *ex vivo*, por ejemplo, métodos en los que células o fluidos corporales están en contacto *ex vivo* con un miembro de unión específico según la descripción, entonces se administra al paciente.

La cantidad de miembro de unión específico a TGF $\beta$  se puede determinar. La cuantitación se puede relacionar con la cantidad del antígeno en una muestra de prueba, que puede ser de interés diagnóstico.

Un kit que comprende un miembro de unión específico o una molécula de anticuerpo según cualquier aspecto o caso de la presente descripción se proporciona también como un aspecto de la presente descripción. En un kit de la descripción, el miembro de unión específico o molécula de anticuerpo se puede marcar para permitir que se determine su reactividad en una muestra, por ejemplo, como se describe más adelante. Generalmente, los componentes de un kit son estériles y están en viales sellados u otros contenedores. Los kits se pueden emplear en análisis diagnóstico u otros métodos para los cuales son útiles las moléculas de anticuerpo. Un kit puede contener instrucciones para uso de los componentes en un método, por ejemplo, un método según la presente descripción. Los materiales auxiliares para ayudar o habilitar la realización de un método de este tipo se pueden incluir en un kit de la descripción.

Las reactividades de anticuerpos en una muestra se pueden determinar por cualquier medio apropiado. Una posibilidad es radioinmunoensayo (RIA). Un antígeno marcado radioactivo se mezcla con un antígeno no marcado (la muestra de prueba) y se permite que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente de un antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radioactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno haya en la muestra de prueba, menos antígeno radioactivo se unirá al anticuerpo. Un ensayo de unión competitivo se puede utilizar también con antígeno no radioactivo utilizando antígeno o un análogo enlazado a una molécula informadora. La molécula informadora puede ser un tinte de fluorocromo, fósforo o láser con características de absorción y emisión aisladas espectralmente. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red. Los tintes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros informadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tales como perlas de látex que están coloreadas, agentes magnéticos o paramagnéticos y biológica o químicamente activos que pueden provocar directa o indirectamente señales detectables para observarlas visualmente, detectarlas electrónicamente o de otra manera registrarlas. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o

5 cambian colores o provocan cambios en propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser excitables molecularmente, de modo que las transiciones electrónicas entre estados de energía den como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas en conjunción con biosensores. Se pueden emplear sistemas de detección biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina. Las señales generadas por conjugados anticuerpo-informador individuales se pueden utilizar para derivar datos absolutos o relativos cuantificables de la unión de anticuerpo relevante en muestras (normal y de prueba).

10 La presente descripción proporciona también el uso de un miembro de unión específico como anteriormente para medir niveles de antígeno en un ensayo competitivo, o sea, un método para medir el nivel de antígeno en una muestra al emplear un miembro de unión específico tal como se proporciona por medio de la presente invención en un ensayo competitivo. Esto puede ser donde no se requiere la separación física del antígeno unido del no unido. Enlazar una molécula informadora al miembro de unión específico de modo que un cambio físico u óptico ocurra en la unión es una posibilidad. La molécula informadora puede generar directa o indirectamente señales detectables y, preferiblemente, medibles. El enlace de moléculas informadoras puede ser de manera directa o indirecta, covalente, por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o de manera no covalente. El enlace por medio de enlace peptídico puede ser un resultado de expresión recombinante de una fusión de un gen que codifica un anticuerpo y una molécula informadora.

15 La presente descripción proporciona también para medir niveles de antígeno directamente, al emplear un miembro de unión específico según la descripción, por ejemplo, en un sistema biosensor.

20 El modo para determinar la unión no es una característica de la presente invención y los expertos en la técnica serán capaces de elegir un modo adecuado según su preferencia y conocimiento general.

25 Tal como se señala, en varios aspectos y casos, la presente descripción se extiende a un miembro de unión humano, humanizado, quimérico o sintético que compite para unirse a TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, 2 y/o 3) con cualquier miembro de unión específico definido en este documento, por ejemplo, IgG4 PET1037GR, PET1074B9 o PET1287A10. La competición o competición cruzada entre miembros de unión se puede ensayar fácilmente *in vitro*, por ejemplo, marcando una molécula informadora específica a un miembro de unión que se puede detectar en presencia de otro(s) miembro(s) de unión no marcado(s), para habilitar la identificación de miembros de unión específicos que se unen al mismo epítoto o a un epítoto solapado.

30 La competición se puede determinar, por ejemplo, utilizando ELISA en la que TGF $\beta$  se inmoviliza en una placa y un primer miembro de unión marcado (el miembro de unión de referencia) se añade a la placa junto con uno o más miembros de unión no marcados. La presencia de un miembro de unión no marcado que compite con el miembro de unión marcado se observa por una disminución en la señal emitida por el miembro de unión marcado.

35 En la prueba para competición, se puede emplear un fragmento de péptido del antígeno, especialmente un péptido que incluye un epítoto de interés. Se puede utilizar un péptido que tiene una secuencia de epítoto más uno o más aminoácidos en cualquier extremo. Se puede decir que un péptido de este tipo "consiste esencialmente" en la secuencia especificada. Miembros de unión específicos según la presente invención pueden ser de tal manera que su unión a antígeno se inhiba por un péptido con o que incluye la secuencia dada. Al someter esto a ensayo, se puede utilizar un péptido con cualquier secuencia más uno o más aminoácidos.

Los miembros de unión específicos que se unen a un péptido específico se pueden aislar, por ejemplo, de una biblioteca de presentación en fagos al seleccionarlos con los péptidos.

40 La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específico de la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. En un caso preferido, la presente descripción proporciona un ácido nucleico que codifica un CDR o un conjunto de CDR o un sitio de unión antígeno-anticuerpo o dominio VH o dominio VL o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG4, de la descripción tal como se definió anteriormente.

45 La presente descripción proporciona también constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como los anteriores.

50 La presente descripción proporciona también una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos como los anteriores. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG4 tal como se proporciona, forma por sí mismo un aspecto de la presente descripción, tal como lo hace un método para producir el producto codificado, dicho método comprende expresión a partir de un ácido nucleico codificante para este. La expresión se puede conseguir convenientemente al cultivar, en condiciones apropiadas, células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de producción por medio de expresión, un dominio VH o VL, o un miembro de unión específico se puede aislar y/o purificar utilizando cualquier técnica adecuada, para utilizarlo entonces según sea apropiado.

55 Los miembros de unión específicos, dominios VH y/o VL, y moléculas de ácido nucleico codificante y vectores según la presente descripción se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural,

en una forma homogénea o sustancialmente pura, o, en el caso de un ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de un origen de ácido nucleico o de genes distinto a la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Un ácido nucleico según la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser sintético de manera completa o parcial. La referencia a una secuencia de nucleótidos, tal como se expone en este documento, incluye una molécula de ADN con la secuencia especificada, e incluye una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye con T, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Los sistemas para clonar y expresar un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, células de insectos, hongos, levaduras y plantas y animales transgénicos. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para expresar un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células de riñón embrionario humano, células de retina embrionaria humana y muchas otras. Una bacteria huésped preferida común es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está establecida en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo está disponible también para los expertos en la técnica como una opción para producir un miembro de unión específico, por ejemplo, Chadd HE y Chamow SM (2001) 110 *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194, Andersen DC y Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117, Larrick JW and Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418.

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluidas secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, por ejemplo, fagos o fagémidos, adenovíricos, AAV, lentivíricos, etc. según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para manipular ácidos nucleicos, por ejemplo, para preparar constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión genética, y análisis de proteínas, se describe en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, segunda edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1986, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.* eds., John Wiley y Sons, 4ª edición 1999.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente descripción proporciona una célula huésped que contiene ácido nucleico tal como se describe en este documento. Una célula huésped de este tipo puede ser *in vitro* o puede ser en cultivo. Una célula de este tipo puede ser *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir expresión intracelular de los miembros de unión específicos de la presente descripción como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos se pueden utilizar para terapia genética (Marasco WA (1997) *Gene Therapy*, 4(1): 11).

Todavía otro aspecto proporciona un método que comprende introducir un ácido nucleico de este tipo en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para introducir ácido nucleico en la célula huésped, en particular en una célula eucariota, se puede utilizar un sistema vírico o basado en plásmido. El sistema plásmido se puede mantener episomalmente o se puede incorporar en la célula huésped o en un cromosoma artificial (Csonka E *et al.* (2000) *Journal of Cell Science*, 113: 3207-3216; Vanderbyl S *et al.* (2002) *Molecular Therapy*, 5 (5): 10). La incorporación puede ser tanto de manera aleatoria o por integración dirigida de una o simples copias en un único locus o múltiples loci. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación de cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando un bacteriófago.

La introducción puede ir seguida de provocar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, al cultivar células huésped en condiciones para la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover por inclusión de secuencias que promocionan la recombinación con el genoma, según las técnicas estándar.

La presente descripción proporciona también un método que comprende utilizar un constructo, tal como se estableció anteriormente, en un sistema de expresión para expresar un miembro de unión específico o polipéptido como los anteriores.

Las moléculas de ácido nucleico de la descripción instantánea se pueden administrar a un paciente en necesidad de estas por medio de terapia genética. La terapia puede ser tanto *in vivo* como *ex vivo*. En un caso preferido, las moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una cadena pesada como una cadena ligera se administran a un paciente. En un caso más preferido, las moléculas de ácido nucleico se administran de tal manera que se integran establemente en cromosomas de células B porque estas células se especializan en producir anticuerpos. En un

caso preferido, células B precursoras se transfectan o infectan *ex vivo* y se vuelven a trasplantar en un paciente en necesidad de estas. En otro caso, células B precursoras u otras células se infectan *in vivo* utilizando un virus conocido por infectar el tipo de célula de interés. Los vectores típicos utilizados para terapia genética incluyen liposomas, plásmidos y vectores víricos. Los vectores víricos de ejemplo son retrovirus, adenovirus y virus asociados a adeno. Después de infección tanto *in vivo* como *ex vivo*, los niveles de expresión de anticuerpo se pueden monitorear al tomar una muestra del paciente tratado y al utilizar cualquier inmunoensayo conocido en la técnica o discutido en este documento. Los métodos para utilizar un anticuerpo anti-TGF $\beta$  en terapia genética son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.824.655 (Border), que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

En un caso preferido, el método de terapia genética comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de esta de un anticuerpo anti-TGF $\beta$  y que expresa la molécula de ácido nucleico. En otro caso, el método de terapia genética comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de esta de un anticuerpo anti-TGF $\beta$  y que expresa la molécula de ácido nucleico. En un método más preferido, el método de terapia genética comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de esta y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera o la porción de unión a antígeno de esta de un anticuerpo anti-TGF $\beta$  de la descripción y que expresa las moléculas de ácido nucleico.

La corrección de dosis entre especies requiere generalmente un ajuste de peso corporal solamente, si el agente activo es un anticuerpo que actúa en o está cerca del sistema vascular. Las dosis eficaces de los anticuerpos de la descripción han sido 0,5-5 mg/kg en ratas y ratones en el contexto agudo. Por lo tanto, para una dosificación a largo plazo, administrar 0,3-10 mg/kg en la vida media (se espera que se encuentre en la región de 21 días en seres humanos) se considera probable. Las dosis preferidas son suficientes en términos de eficacia, pero lo suficientemente bajas para facilitar una administración óptima. Por ejemplo, una dosis de menos de 50 mg facilita administración por vía subcutánea. La administración intravenosa es preferible en los primeros ensayos clínicos y se puede utilizar como la vía de entrega para enfermedades graves si la dosis es alta y el intervalo de dosificación largo. En términos generales, la inyección subcutánea es más conveniente que la entrega intravenosa, porque permite autoadministración. Sin embargo, la inyección subcutánea tiene el potencial de aumentar cualquier respuesta inmune al producto. La administración por vía local para una enfermedad localizada puede minimizar la cantidad de producto requerido y maximizar la concentración en el sitio de acción. Una ventaja de seguridad (margen terapéutico) significativa se puede conferir por medio de administración por vía local, evitando cualquier efecto secundario potencial que se puede desarrollar de administración sistémica crónica.

### Ejemplo 1

Generación de ScFv anti-TGF $\beta$

Bibliotecas de anticuerpos vírgenes ScFv

Se utilizó una biblioteca de anticuerpos humanos de cadena Fv sencilla larga (scFv) derivada de linfocitos de bazo a partir de 20 donantes y clonado en un vector fagémido (Hutchings *et al.*, 2001) para selecciones.

Bibliotecas de selección guiada de ScFv

Una biblioteca VL humana-VH 1D11.16 se construyó y se utilizó para seleccionar anticuerpos quiméricos de ratón-humanos con las propiedades de unión deseadas. Las cadenas ligeras humanas de estos anticuerpos quiméricos se clonaron entonces en bibliotecas aceptoras VH-VL humanas y VH humanas (CDR3 1D11)-VL. Estas bibliotecas se cribaron para anticuerpos humanos con las propiedades de unión deseadas.

Selección de bibliotecas de fagos ScFv

Genzyme Corp. (Framingham, MA, EE. UU.) suministraron TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 humanos recombinantes y se compró TGF $\beta$ 3 a R&D Systems.

Los scFv que reconocieron TGF $\beta$  se aislaron de bibliotecas de selección guiada de scFv seguido de una serie de ciclos de selección repetidos en TGF $\beta$  humano recombinante esencialmente tal como se describen en Vaughan *et al.* (1996). En resumen, seguido de incubación con la biblioteca, el antígeno inmovilizado, que se había acoplado previamente con perlas paramagnéticas, y fago unido se recuperaron por separación magnética mientras el fago no unido se lavó. El fago unido se rescató entonces tal como se describe en Vaughan *et al.* (1996) y el proceso de selección se repitió.

Las selecciones se llevaron a cabo utilizando TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 acoplado a aminas Dynabeads M-270 (Dyna) según las recomendaciones del fabricante. Alternativamente, las selecciones utilizaron TGF $\beta$ 1 o TGF $\beta$ 2 biotinilado preparado utilizando el reactivo específico de amina primaria hexanoato de succinimidil-6-(biotinanido) siguiendo las instrucciones del fabricante (EZ link NHS LC Biotin, Pierce).

Los resultados de las selecciones se sometieron a ensayo como preparaciones periplásmicas en cribados de alto rendimiento basados en ensayos competitivos que midieron la capacidad de los scFv presentes en la preparación periplásmica para competir con 1D11.16 o la quimera del receptor FcII soluble del TGFβ humano recombinante (sRII, R&D Systems) para unirse a TGFβ.

- 5 Las muestras que compitieron con 1D11.16 o sRII en los cribados de alto rendimiento se sometieron a secuenciación de ADN tal como se describe en Vaughan *et al.* (1996) y Osbourn *et al.* (1996). Los clones se expresaron y purificaron como scFv o IgG y se evaluaron para su capacidad de neutralizar TGFβ en los ensayos con MLEC y/o con NHLF tal como se describe en los Ejemplos 4 y 5 respectivamente. Las preparaciones de scFv purificadas se prepararon como se describe en el Ejemplo 3 de la publicación internacional WO 01/66754. Las concentraciones de proteína de preparaciones de scFv purificadas se determinaron utilizando el método BCA (Pierce). Las preparaciones de IgG purificadas se prepararon tal como se describe más adelante en el Ejemplo 3.

## Ejemplo 2

### Optimización de scFv anti-TGFβ

- 15 La unión de scFv y neutralización de TGFβ se generaron como se describe en el Ejemplo 1. Las potencias de neutralización de estos anticuerpos aumentaron en TGFβ1 y/o TGFβ2 y/o TGFβ3 utilizando mutagénesis de ADN y/o técnicas combinatorias. Los anticuerpos con potencias significativamente mejoradas en TGFβ1 y/o TGFβ2 y/o TGFβ3 se generaron por medio de selección y cribado de bibliotecas de anticuerpos de fagos esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1. Los scFv generados se compararon con 1D11.16 en el ensayo de proliferación con MLEC.

- 20 Se encontró que las líneas germinales particulares estaban sumamente representadas entre la población de scFv neutralizantes de TGFβ de alta potencia. Estas fueron DP-10/1-69 y DP-88/1-e (ambas miembros de la familia germinal VH1) para la cadena pesada, y DPK22/A27 (familia V<sub>H</sub>3) para la cadena ligera. Estas líneas germinales parecen proporcionar un marco estructural particularmente adecuado para anticuerpos pan-neutralizantes de TGFβ de alta potencia. Esto no es predecible, ya que el segmento de gen VH 1D11.16 es el más cercano a la línea germinal humana DP-7 y el segmento de gen VL 1D11.16 es el más cercano a la línea germinal humana L16.

Los scFv PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 mostraron potencias que se acercan o exceden a aquellas de 1D11.16 en todas las tres isoformas de TGFβ en el ensayo de proliferación con MLEC.

- 30 Las secuencias de aminoácidos derivadas de los segmentos de gen VH y VL PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 se alinearon con las secuencias germinales humanas conocidas en la base de datos VBASE (Tomlinson *et al.*, 1997) y la línea germinal humana más cercana se identificó por medio de similaridad de secuencia. El gen germinal humano más cercano para el segmento de gen VH de PET1073G12 y PET1074B9 se identificó como DP-10/1-69 (familia germinal VH1) y el gen germinal humano más cercano para el segmento de gen VH de PET1287A10 se identificó como DP-88/1-e (línea germinal VH1). El gen germinal humano más cercano para el segmento de gen VL de PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 se identificó como DPK22/A27 (familia germinal V<sub>H</sub>3). La mutagénesis dirigida a sitio se utilizó para cambiar los residuos estructurales que difirieron de la línea germinal al residuo germinal, siempre que los cambios no produjeran una pérdida de potencia en el ensayo de proliferación con MLEC de más de tres veces en el anticuerpo resultando en cualquier isoforma de TGFβ. Si se observó una pérdida de potencia de este tipo, el aminoácido estructural no germinal se mantuvo en el anticuerpo final.

- 40 En PET1073G12 germinalizado y PET1074B9 germinalizado, todos los residuos estructurales son línea germinal excepto dos residuos en VH y uno en VL. Las secuencias de aminoácidos para PET1073G12 germinalizado se describen en SEQ ID NO: 2 para VH y SEQ ID NO: 7 para VL. Las secuencias de aminoácidos para PET1074B9 germinalizado se describen en SEQ ID NO: 12 para VH y SEQ ID NO: 17 para VL.

- 45 En PET1287A10 germinalizado, todos los residuos estructurales VH y VL son líneas germinales. Las secuencias de aminoácidos para PET1287A10 germinalizado se describen en SEQ ID NO: 22 para VH y SEQ ID NO: 27 para VL.

## Ejemplo 3

### Producción de IgG4

- 50 Los scFv PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 germinalizados se convirtieron a partir del formato scFv al formato IgG4 por medio de subclonación de sus dominios VH y VL en vectores que expresan las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo completas respectivamente. El segmento de gen VH se amplificó del vector que expresa scFv pCantab6 y se clonó en el vector pEU8.1(+) que contiene los dominios constantes de cadena pesada γ4 humanos y elementos reguladores para expresar las cadenas pesadas completas en células de mamíferos. De manera similar, el segmento de gen VL se amplificó del vector que expresa scFv pCantab6 y se clonó en el vector pEU3.1(-) que contiene los dominios constantes de cadena ligera κ humanos y elementos reguladores para expresar las cadenas ligeras completas en células de mamíferos. Los vectores pEU3.1(-) y pEU8.1(+) se basaron en los vectores descritos por Persic *et al.* (1987) y se modificaron para introducir la secuencia oriP para aumentar los rendimientos

del anticuerpo producido (Shen. *et al.*, 1995; Langle-Rouault *et al.*, 1998). Después de la clonación, los dominios VH y VL de todos los tres anticuerpos se secuenciaron para confirmar que no se habían introducido mutaciones durante del procedimiento de clonación.

5 Los vectores para la expresión de cadena pesada y ligera PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 se transfectoron en células EBNA-293 (Invitrogen). Después de la expresión y secreción de genes en el sobrenadante celular, los IgG4 PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 IgG4 se purificaron por medio de cromatografía de afinidad a la proteína A (Amersham). Las preparaciones de anticuerpo purificadas se filtraron de manera estéril y se almacenaron a 4°C en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de evaluación. La concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos del IgG tal como se describe en Mach *et al.* (1992). El IgG purificado se analizó por medio de SEC-HPLC utilizando una columna Biosep-SEC-S2000 (Phenomenex) para comprobar la agregación o degradación de la proteína. Los anticuerpos completos IgG4 humanos reformateados se compararon con el anticuerpo 1D11.16 en los ensayos basados en células MLEC y NHLF tal como se describe en los Ejemplos 4 y 5 respectivamente.

#### Ejemplo 4

15 Potencia de neutralización de anticuerpos anti-TGFβ en el ensayo de proliferación con MLEC dependiente de TGFβ

La potencia de neutralización de preparaciones de anticuerpo purificadas contra la bioactividad de TGFβ humano se evaluaron utilizando ensayo de proliferación con células epiteliales de pulmón de visón (MLEC).

20 El ensayo de proliferación con MLEC se basa en un ensayo descrito por Danielpour *et al.* (1989a). Este ensayo trabaja sobre el principio de que cuando TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 se añade a células epiteliales de pulmón de visón esto provoca una inhibición de la proliferación celular inducida por suero. Los anticuerpos se sometieron a ensayo para la neutralización de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 que da como resultado la restauración de la proliferación celular. La proliferación se midió por medio de la absorción de [<sup>3</sup>H]-timidina. La potencia del anticuerpo se definió como la concentración del anticuerpo que se neutraliza en una concentración única de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 en un nivel 50% (CI<sub>50</sub>) en nM.

25 Protocolo del ensayo de proliferación con MLEC

Preparación en placas de MLEC

30 La línea MLEC se obtuvo a partir de la American Type Culture Collection (n.º de cat. CCL-64). Las células crecieron en un medio Minimum Essential Media (MEM, Gibco) que contiene un 10% de FBS (Gibco), un 1% de penicilina/estreptomina (Gibco) y un 1% de la disolución de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco). Las células confluentes a partir de matraces T-175 se disociaron del matraz, se centrifugaron, se lavaron, y se volvieron a suspender en medio de ensayo con MLEC que se fabricó de MEM que contenía un 1% de FBS, un 1% de penicilina/estreptomina y un 1% de disolución de aminoácidos no esenciales MEM. Una parte alícuota de las células se marcó entonces con azul de tripano, se contaron en un hemocitómetro y la reserva de células se diluyó a 1,75 x 10<sup>5</sup> células por ml utilizando medio de ensayo. Se añadieron 100 µl de esta suspensión a cada pocillo de cultivo de tejido de una placa de 96 pocillos de fondo plano de cultivo tisular y se incubó durante 3 a 5 horas.

Preparación de disoluciones TGFβ/anticuerpo

40 Las disoluciones de trabajo de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 a 6 ng/ml (6 veces la concentración final del ensayo) y anticuerpos (incluidos controles como 1D11.16) a 3 veces la concentración máxima final del ensayo se prepararon en medio de ensayo MLEC. La concentración final de TGFβ en el ensayo (1 ng/ml o 40 pM) se correspondió con la concentración que indujo aproximadamente un 80% de inhibición de proliferación celular en comparación con el control sin TGFβ (es decir, valor CE<sub>80</sub>).

Disposición de la placa de dilución

45 Las muestras de anticuerpos de prueba y control se titularon en etapas de dilución de 3 veces en medio de ensayo MLEC y se incubaron en presencia y ausencia de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3. Todos los controles relevantes se incluyeron en cada experimento: ensayo del anticuerpo 1D11.16 y/o de referencia según fuera apropiado y realización de titulaciones de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3. Las placas completadas se dejaron en una incubadora de cultivo tisular humidificada durante 1 hora ± 15 minutos.

Adición de disoluciones de TGFβ/anticuerpo a las células en placas

50 Después de los tiempos de incubación apropiados, se transfirieron 100 µl a partir de cada pocillo de las placas de dilución a MLEC en placas y las placas se devolvieron a la incubadora durante 44 ± 2 horas.

Adición de [<sup>3</sup>H]-timidina

Se añadieron 25 µl de 10 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-timidina (diluidos en PBS) a cada uno de los pocillos (0,25 µCi/pocillo). Las placas se devolvieron entonces a la incubadora durante 4 horas ± 30 minutos.

Recolección de células

Se añadieron 100  $\mu$ L de tripsina-EDTA (0,25%, Gibco) a cada pocillo, las placas se incubaron durante 10 minutos en la incubadora y las células se recolectaron utilizando un recolector de células de 96 pocillos Tomtec o Packard.

Análisis y acumulación de datos

- 5 Los datos de las células recolectadas se leyeron utilizando un lector de placas beta (TopCount, Packard). Los datos se analizaron para obtener valores  $CI_{50}$  y de desviación estándar. Se obtuvieron los valores  $CI_{50}$  utilizando el *software* Prism 2.0 (GraphPad).

Resultados

- 10 Los IgG4 germinales PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 se sometieron a ensayo junto a 1D11.16 en el ensayo de proliferación con MLEC. Se produjeron IgG4 tal como se describe en el Ejemplo 3. La media aritmética de  $CI_{50} \pm$  la desviación estándar (donde  $CI_{50}$  es la concentración de anticuerpos requerida para neutralizar 40 pM de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 por un 50%) se muestran en la Tabla 1.

Los datos de  $CI_{50}$  media para IgG4 PET1073G12 y PET1287A10 muestran que estos anticuerpos tienen potencias o planteamientos similares a aquellos de 1D11.16 en TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3.

- 15 Los datos de  $CI_{50}$  media sugieren que IgG4 PET1074B9 es significativamente más potente en TGF $\beta$ 1 (aunque una curva de respuesta a una dosis completa no se obtuvo en el ensayo con MLEC). Como medio de comparación, 1D11.16 mostró un 12% de neutralización en TGF $\beta$ 1 en una concentración de 91 pM y PET1074B9 mostró un 78% de neutralización en una concentración similar de 92 pM. Además, PET1074B9 también se analizó junto a 1D11.16 en un ensayo de producción de fibronectina en el ensayo con fibroblastos pulmonares humanos normales (NHLF) (Ejemplo 5). Los resultados obtenidos en el ensayo con NHLF confirmaron aquellos obtenidos en el ensayo con MLEC: PET1074B9 tiene potencias similares a aquellas de 1D11.16 en TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 y PET1074B9 es más potente que 1D11.16 en TGF $\beta$ 1.

Ejemplo 5

Potencia de neutralización de anticuerpos anti-TGF $\beta$  en el ensayo con células NHLF dependiente de TGF $\beta$ 3

- 25 La potencia de neutralización de preparaciones de anticuerpo purificadas contra bioactividad de TGF $\beta$  humano se evaluó utilizando el ensayo de producción de fibronectina de fibroblastos pulmonares humanos normales (NHLF). Este ensayo mide la capacidad de los anticuerpos de neutralizar la producción de la glicoproteína de matriz extracelular (ECM), fibronectina. Los TGF $\beta$  son estimuladores potentes de la producción de fibronectina en fibroblastos cultivados (Ignatz y Massouh, 1986) ejerciendo sus efectos por medio de activación de la vía de la quinasa N-terminal c-Jun (Hocevar *et al.*, 1999).

Protocolo del ensayo con células NHLF

- 35 Se obtuvieron células NHLF de Clonetics<sup>TM</sup> y se mantuvieron en medios de crecimiento de fibroblastos completos 2 (FGM-2) en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A una confluencia de un 90-100%, los fibroblastos se pusieron en placas (1,5 x 10<sup>5</sup>/pocillo, formado de 24 pocillos) en 1,5 ml de medio FGM-2 y se permitió que se fijaran durante 24 horas a 37°C. Las células se lavaron con medio basal de fibroblastos libre de suero (FBM) y se privaron de suero durante la noche en 1,5 ml de FBM suplementado con insulina humana (100  $\mu$ g/ml), gentamicina/fungizona (50  $\mu$ g/ml) y ácido ascórbico (50  $\mu$ g/ml) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Todos los experimentos se llevaron a cabo en células entre los pases tres a seis.

Preparación de disoluciones de TGF $\beta$  y anticuerpos

- 40 Las disoluciones de trabajo de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 a 25 ng/ml (1 nM) y anticuerpos (incluidos controles como 1D11.16) se prepararon en medio de ensayo. La concentración final de TGF $\beta$  en el ensayo (250 pg/ml o 10 pM) se correspondió con la concentración que indujo aproximadamente un 80% de simulación de producción de fibronectina en comparación con el control sin TGF $\beta$  (es decir, valor  $CE_{80}$ ).

Disposición de la placa de dilución

- 45 Las muestras de anticuerpos de prueba y control se diluyeron en serie en etapas de dilución de 10 veces en medio de ensayo y se preincubaron en presencia y ausencia de TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 o TGF $\beta$ 3 a 32°C durante 30 minutos. Las células NHLF se incubaron en 2 ml/pocillo de medio de ensayo durante 48 horas a 37°C. Después de 48 horas, 0,5 ml de parte alícuota de sobrenadante de medio de cultivo se tomó para análisis de fibronectina por medio de ELISA.

ELISA con fibronectina humana

- 50 Se analizaron muestras de sobrenadante de NHLF fresco o congelado (-20°C) utilizando un kit de ELISA con antígeno de fibronectina humana Technoclone<sup>TM</sup> que comprendía un anticuerpo monoclonal de captura anti-

fibronectina humana (clon 6FN) y un anticuerpo secundario anti-fibronectina monoclonal conjugado HRP. La metodología fue la siguiente:

- 5 Placas de 96 pocillos Nunc-Immuno™ Maxisorp™ se revistieron (1 µg/pocillo) con un anticuerpo de captura anti-fibronectina en tampón de revestimiento (12 mM de Na<sup>2</sup>CO<sub>3</sub>, 35 mM de NaHCO<sub>3</sub>, timerosal al 0,01% (p/v) en agua destilada, pH 9,6) durante 16 horas a 4°C. El anticuerpo de captura se retiró y cada pocillo se bloqueó con 100 µl de tampón de dilución (BSA al 1% (p/v) en PBS) durante 1 hora a 37°C. Después de lavarlo tres veces con tampón de agua (250 µg/pocillo de Tween 20 al 0,5% (v/v) en PBS), se añadieron estándares de fibronectina en plasma humana y muestras a la placa y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Entonces, se lavó la placa tres veces y se incubó con un anticuerpo secundario HRP anti-fibronectina (100 µg/pocillo en tampón de dilución) durante 30 minutos a 37°C. La placa se lavó tres veces con tampón de agua y se añadieron 100 µg/pocillo de sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) a la placa. Después de incubación de la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos, la reacción se paró con 100 µg/pocillo de ácido sulfúrico 2 M. Entonces, se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placa Dynex MRX.

Análisis de los datos

- 15 Los datos se presentaron como un porcentaje de la respuesta de control a la isoforma de TGFβ en prueba (100%). Se estimaron los valores pCI50 medios geométricos y unos límites confianza del 95% utilizando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (Prism 2, GraphPad Software, San Diego, EE. UU.). Cuando falló un ajuste de cuatro parámetros, se llevó a cabo un ajuste de tres o dos parámetros manteniendo constantes los valores superiores y/o inferiores de la curva.

## 20 Resultados

Los IgG4 germinales PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10 purificados se sometieron a ensayo junto a 1D11.16 en el ensayo de producción de fibronectina NHLF. Se produjeron IgG4 tal como se describe en el Ejemplo 3. La media aritmética de CI<sup>50</sup> ± la desviación estándar (donde CI<sup>50</sup> es la concentración de anticuerpos requerida para neutralizar 10 pM de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 por un 50%) se muestran en la Tabla 2.

## 25 Ejemplo 6

Potencias en ensayo de inducción de IL-11

Se evaluó la potencia de neutralización de preparaciones de anticuerpo purificadas contra bioactividad de TGFβ humano utilizando un ensayo de inducción de IL-11 con una célula A549 (células de carcinoma epitelial pulmonar humano)

- 30 Las células A549 (ATCC, n.º de parte: CCL-185) se mantuvieron en medio de crecimiento/ensayo (435 ml de DMEM, 50 ml de suero bovino fetal (FBS), 5 ml de penicilina/estreptomycina 5 ml de aminoácidos no esenciales de medio Modified Eagle Medium, 5 ml de L-glutamina 100X; todos de Gibco/Invitrogen). A aproximadamente un 90% de confluencia, las células se colocaron en placas en 100 µl de medio de crecimiento/ensayo y se permitió a las células fijarse durante 24 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%.

## 35 Preparación de disoluciones de TGFβ y anticuerpos

Se prepararon disoluciones de trabajo de TGFβ1 (1,8 ng/ml), TGFβ2 (4,2 ng/ml) o TGFβ3 (4,2 ng/ml) y anticuerpos (incluidos controles) en medio de crecimiento/ensayo.

Disposición de la placa de dilución

- 40 Las muestras de anticuerpos de prueba y control se diluyeron en serie en etapas de dilución de 5 veces (TGFβ2 o TGFβ3) o de 10 veces (TGFβ1) en medio de crecimiento/ensayo y se preincubaron en presencia y ausencia de TGFβ1, TGFβ2 o TGFβ3 a 37°C durante 75 minutos. Las células A549 se incubaron en 200 µl/pocillo de medio de ensayo durante 18-24 horas a 37°C. Después de 18-24 horas, una parte alícuota de 100 µl de sobrenadante de medio de cultivo se tomó para análisis de IL-11 por medio de ELISA.

## Ejemplo 7

- 45 Para determinar la eficacia biológica de un anticuerpo monoclonal de TGFβ pan-neutralizante humano para tratar insuficiencia renal crónica y otras indicaciones clínicas caracterizadas por fibrosis patogénica, se estudiaron los efectos del anticuerpo en un modelo de obstrucción ureteral unilateral en ratas (OUU).

- 50 Ratas Sprague Dawley adultas (Taconic Farms, Germantown, NY, EE. UU.) que pesaban 250-280 gramos (aproximadamente de 6 semanas) se alojaron en un entorno con aire, temperatura y luz controlados. Las ratas que sufrían OUU recibieron una pequeña incisión abdominal en la línea media ventral para exponer el riñón izquierdo y el uréter superior. Se ligó el uréter a nivel del polo inferior del riñón con sutura de seda y una segunda vez a aproximadamente 0,2 cm por debajo de la primera. Ratas operadas de forma simulada recibieron el mismo protocolo quirúrgico pero sin ligadura ureteral.

- Las ratas obstruidas se trataron con PBS, un anticuerpo monoclonal pan-neutralizante murino (1D11), un anticuerpo de control coincidente con isótopo (13C4) o un anticuerpo monoclonal de TGF $\beta$  pan-neutralizante humano de la invención como a continuación. Se administraron los anticuerpos a las ratas intraperitonealmente comenzando en el día de la ligadura ureteral durante un curso de 3 semanas. Se administraron 13C4 y 1D11 a 5 mg/kg (3 veces/semana) y se dio el anticuerpo pan-neutralizante humano a las ratas a 5 mg/kg (cada 5 días). Al final de las 3 semanas, se sacrificaron las ratas, se perfundieron los riñones con PBS durante 3 minutos y se recolectaron los riñones perfundidos para el análisis de determinación de ARNm de contenido de colágeno y examen histológico.
- Para evaluar la extensión de la fibrosis tisular, se determinó el contenido total de colágeno tisular por medio de análisis bioquímico de hidroxiprolina en extractos hidrolizados según Kivirikko *et al.* Este ensayo se basa en la observación de que esencialmente toda la hidroxiprolina en tejidos animales se encuentra en el colágeno.
- También se llevó a cabo un ensayo de colágeno Sircol para el contenido total de colágeno. El ensayo de colágeno Sircol mide la cantidad de colágenos solubles ácido/pepsina totales basado en la unión específica de tinte rojo sirio con la cadena lateral del colágeno tisular.
- Las ratas OUU tratadas con el anticuerpo monoclonal pan-neutralizante humano mostraron un 43,4% de reducción en contenido de hidroxiprolina ( $1,98 \pm 0,26$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido seco) cuando se compara con el grupo tratado con PBS ( $3,5 \pm 0,3$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido seco,  $p < 0,05$ ). La disminución en la fibrosis renal fue apoyada por la reducción en colágeno solubilizado total en los riñones afectados, tal como se determina por un ensayo basado en tinte rojo sirio (simulado:  $18,5 \pm 2,6$ , PBS:  $69,3 \pm 3,8$ , y anticuerpo monoclonal pan-neutralizante humano:  $35,6 \pm 5,2$   $\mu\text{g}/100$  mg de tejido,  $p < 0,05$  frente a PBS).
- También se evaluó la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-neutralizante humano para reducir fibrosis tisular por medio de examen inmunohistoquímico.
- En animales de control, la obstrucción ureteral durante tres semanas provocó una alteración generalizada de la estructura tubular renal con distensión marcada, atrofia celular y necrosis/apoptosis, inflamación tisular y expansión tubulointersticial con fibrosis evidente. Hubo una pequeña evidencia de daño glomerular. Las ratas tratadas con 1D11 o el anticuerpo monoclonal pan-neutralizante humano, por otro lado, mostraron conservación de la estructura renal tal como se juzgó por dilación tubular atenuada y desorganización, infiltrados inflamatorios reducidos (celularidad) y expansión tubulointersticial y fibrosis disminuidas.
- También se midió el efecto del tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-neutralizante humano en expresión genética regulada por TGF $\beta$
- El ARNm de TGF $\beta$ 1 se redujo significativamente en los animales con OUU tratados con anticuerpo monoclonal pan-neutralizante humano en comparación con animales tratados tanto con PBS como tratados con anticuerpo de control 13C4. También se ha visto una disminución significativa en los niveles de ARNm para colágeno tipo III en los riñones obstruidos tratados con los anticuerpos anti-TGF $\beta$  murinos y humanos en comparación con aquellos tratados con PBS o 13C4 que indican una disminución en síntesis de colágeno.
- Se confirma además la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-neutralizante humano para reducir la síntesis de TGF $\beta$  autoinducida por medio de la medición de la proteína TGF $\beta$ 1 renal total.
- En comparación con los animales operados de forma simulada, los riñones obstruidos exhibieron un aumento marcado en TGF $\beta$ 1 en el tejido total. Sin embargo, a las ratas obstruidas a las que se les administró anticuerpo monoclonal pan-neutralizante humano mostraron un 75% de reducción de niveles de TGF $\beta$ 1 en el tejido, significativamente por debajo de los niveles registrados para ambos grupos de control. En comparación, el anticuerpo 1D11 murino redujo los niveles de TGF $\beta$ 1 en el tejido en un 45%, en comparación con los grupos de control.
- Los resultados descritos anteriormente demuestran que la neutralización de TGF $\beta$  con un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-neutralizante humano interrumpe eficazmente el bucle de regulación autocrina de TGF $\beta$  concomitante con la prevención de producción de TGF $\beta$ 1 y expresión de ARNm de colágeno III.
- Se determinó además el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-neutralizante humano en la expresión de actina muscular lisa ( $\alpha$ -SMA) como indicador indirecto de inhibición de TGF $\beta$ . La expresión de actina muscular lisa es un indicador de miofibroblastos activados, que se asocian con fibrosis tisular y producen tejido conectivo fibroso. El TGF $\beta$  es un importante inductor de la activación y transformación fenotípica de fibroblastos estromales y de células epiteliales residentes en células miofibroblásticas.
- Se detectó la proteína  $\alpha$ -SMA por medio de análisis Western blot estándar.
- Cuando se comparó con animales operados de forma simulada, las ratas con riñones obstruidos mostraron una espectacular regulación positiva en la proteína  $\alpha$ -SMA tal como se midió por Western blot de homogenatos tisulares (los datos no se muestran). Las ratas obstruidas a las que se les administró anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-

neutralizante humano mostraron una reducción significativa (75% en comparación con controles con PBS) en expresión de  $\alpha$ -SMA medible.

5 Estos resultados demuestran la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF $\beta$  pan-neutralizante humano en la reducción de deposición de colágeno en los riñones fibróticos, lo que indica claramente que el anticuerpo es un potente inhibidor de producción y deposición de colágeno renal en este modelo de lesión renal grave y fibrosis tubulointersticial. Debido a que el proceso de fibrosis tisular en órganos tales como pulmón, hígado o riñón posee mecanismos o vías comunes, el experto apreciará que el anticuerpo es útil en el tratamiento de enfermedades renales crónicas al igual que en otras indicaciones clínicas caracterizadas por fibrosis patológica.

SEQ ID NO 1:

10 Secuencia de nucleótidos que codifica VH PET1073G12

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAG  
 GTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAGTAGCAATGTTATCAGCTGGGTGCGC  
 CAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGGGGGGTCAATCCCTATTGTTGATATT  
 CGAACTACGCACAGAGATTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACT  
 AGTACAACTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTAC  
 TGTGCGAGCACACTTGGTCTCCTCCTGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGTACG  
 TTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO 2:

Secuencia de aminoácidos de VH PET1073G12

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI  
 ANYAQRFRKGRVTTTADESTSTTYMELSSLRSEDTAVVYCASTLGLVLDAMDYWGQGT  
 LVTVSS

15 SEQ ID NO 3:

Secuencia de aminoácidos de HCDR1 PET1073G12

SNVIS

SEQ ID NO 4:

Secuencia de aminoácidos de HCDR2 PET1073G12

20 GVIPVDIANYAQRFKG

SEQ ID NO 5:

Secuencia de aminoácidos de HCDR3 PET1073G12

TLGLVLDAMDY

SEQ ID NO 6:

25 Secuencia de nucleótidos que codifica VL PET1073G12

GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCC  
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAG  
 CAGAAACCTGGTCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCACCT  
 GGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATC

AGCCGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGCTGACTCA  
 CCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

SEQ ID NO 7:

Secuencia de aminoácidos de VL PET1073G12

ETVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAP  
 GIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYQCQQYADSPITFGQGRLEIK

30

ES 2 711 213 T3

SEQ ID NO 8:

Secuencia de aminoácidos de LCDR1 PET1073G12

RASQSLGSSYLA

SEQ ID NO 9:

5 Secuencia de aminoácidos de LCDR2 PET1073G12

GASSRAP

SEQ ID NO 10:

Secuencia de aminoácidos de LCDR3 PET1073G12

QQYADSPIT

10 SEQ ID NO 11:

Secuencia de nucleótidos que codifica VH PET1074B9

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAG  
GTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAGTAGCAATGTTATCAGCTGGGTGCGC  
CAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGGGGGGTTCATCCCTATTGTTGATATT  
GCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGGCAGAGTACGATTACCGCGGACGAATCCACT  
AGTACAACCTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTAC  
TGTGCGCTGCCACGCGCTTTCGTCTGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGTACG  
TTGGTGACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO 12:

Secuencia de aminoácidos de VH PET1074B9

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSSNVI SWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDI  
ANYAQRFRVTITADESTSTYME LSSLRSED TAVYYCALPRAFVLDAMDYWGQGT  
LVTVSS

15

SEQ ID NO 13:

Secuencia de aminoácidos de HCDR1 PET1074B9

SNVIS

SEQ ID NO 14:

20 Secuencia de aminoácidos de HCDR2 PET1074B9

GVIPIVDIANYAQRFKG

SEQ ID NO 15:

Secuencia de aminoácidos de HCDR3 PET1074B9

PRAFVLDAMDY

25 SEQ ID NO 16:

Secuencia de nucleótidos que codifica VL PET1074B9

GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC  
ACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTCTTTGGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAG  
CAGAAACCTGGTCAAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCACCT  
GGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATC  
AGCCGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAGTATGCTGACTCA  
CCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

ES 2 711 213 T3

SEQ ID NO 17:

Secuencia de aminoácidos de VL PET1074B9

ETVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRAP  
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK

SEQ ID NO 18:

5 Secuencia de aminoácidos de LCDR1 PET1074B9

RASQSLGSSYLA

SEQ ID NO 19:

Secuencia de aminoácidos de LCDR2 PET1074B9

GASSRAP

10 SEQ ID NO 20:

Secuencia de aminoácidos de LCDR3 PET1074B9

QQYADSPIT

SEQ ID NO 21:

Secuencia de nucleótidos que codifica VH PET1287A10

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCFCGGTGAAA  
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCACCTCTTTCATCAATTTGGGTGCGA  
CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGATATA  
ACAAACTACGCACAGAAATTTAGAGCAGAGTCACTATTACCGCGGACAAAATCCACG  
AGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACGGCTGTGTATTAC  
TGCGCACGCGGAAATGGTAACTACGCCCTGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGT  
ACGTTGGTCAACCGTCTCCTCA

15

SEQ ID NO 22:

Secuencia de aminoácidos de VH PET1287A10

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSTSFINWVRQAPGQGLEWMGGIIPFDI  
TNYAQKFQSRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNGNYALDAMDYWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO 23:

20 Secuencia de aminoácidos de HCDR1 PET1287A10

TSFIN

SEQ ID NO 24:

Secuencia de aminoácidos de HCDR2 PET1287A10

GIIPFDITNYAQKFQS

25 SEQ ID NO 25:

Secuencia de aminoácidos de HCDR3 PET1287A10

GNGNYALDAMDY

SEQ ID NO 26:

Secuencia de nucleótidos que codifica VL PET1287A10

GAAATTGIGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC  
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTTGCCTGGTACCAG  
 CAGAAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACT  
 GGCATCCCTGACAGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC  
 AGCCGCCTGGAGCCTGAAGATTTTCGCAATTTACTGTCCAGCAATATTATGATAGT  
 CCCATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

SEQ ID NO 27:

Secuencia de aminoácidos de VL PET1287A10

EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT  
 GI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYDSPITFGQGTRLEIK

5 SEQ ID NO 28:

Secuencia de aminoácidos de LCDR1 PET1287A10

RASQSVSSSYFA

SEQ ID NO 29:

Secuencia de aminoácidos de LCDR2 PET1287A10

10 GASSRAT

SEQ ID NO 30:

Secuencia de aminoácidos de LCDR3 PET1287A10

QQYYDSPIT

SEQ ID NO 31:

15 WGQGTLVTVSS

Aviso: Los CDR se definen según Kabat *et al.* (1991)

Tabla 1

Isoforma de TGFβ	Media geométrica de CI <sub>50</sub> (intervalos de confianza del 95%; nM)			
	PET1073G12 n=6	PET1074B9 n=6	PET1287A10 n=5	1D11.16 n=25
TGFβ1	0,8 (0,3-2,2)	< 1 #	1,8 (1-3,6)	3,9 (2,9-5,2)
TGFβ2	13,0 (8,7-18,7)	1,5 (1,1-2,2)	25,0 (13,3-47,0)	9,2 (7,3-11,5)
TGFβ3	6,0 (4,2-8,4)	2,0 (1-4,1)	0,5 (0,2-1)	1,0 (0,5-2,0)

20 La neutralización de los efectos anti-proliferativos de TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 en MLEC utilizando IgG4 o 1D11.16 germinales PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10. El número total de puntos de datos para cada media se indica por medio del número n y representa una titulación independiente de cada anticuerpo. Los valores # CI<sub>50</sub> no se pueden determinar como que el anticuerpo fue demasiado potente en el intervalo de concentración sometido a ensayo y no se obtuvo una curva de respuesta de dosis completa.

Tabla 2

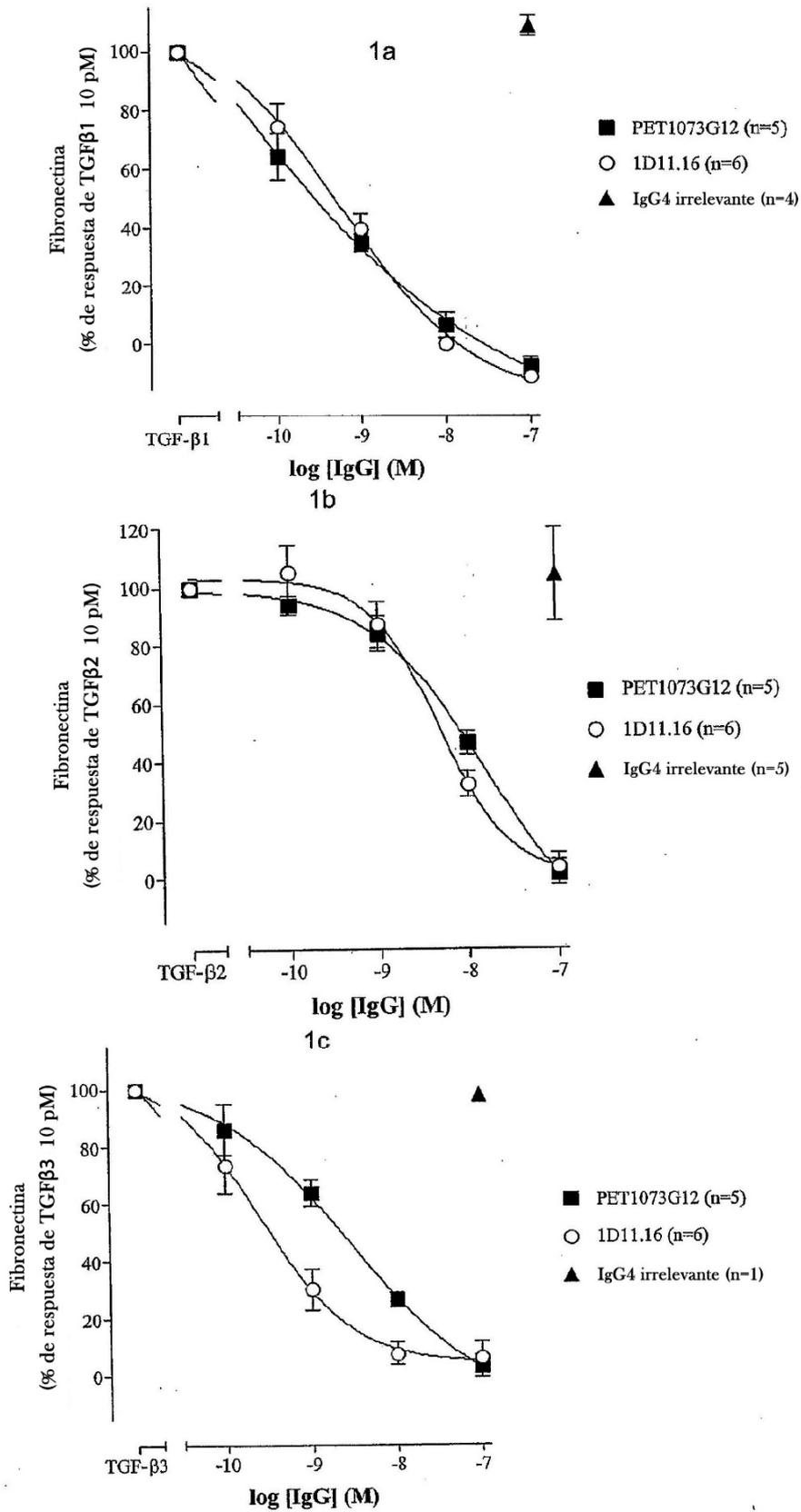
Isoforma de TGF $\beta$	Media geométrica de CI <sub>50</sub> (intervalos de confianza del 95%)			
	PET1073G12 n=5	PET1074B9 n=4	PET1287A10 n=4	1D11.16 n=6
TGF $\beta$ 1	0,44 (0,24-0,82)	0,18 (0,14-0,28)	0,8 (0,44-1,3)	0,4 (0,19-0,96)
TGF $\beta$ 2	12,0 (5,4-26)	4,6 (1,9-11)	3,9 (0,9-16,6)	4,0 (1,9-8,3)
TGF $\beta$ 3	2,8 (1,27-6,5)	0,28 (0,02-3,45)	0,45 (0,25-0,79)	0,16 (0,04-0,18)

Las potencias de IgG4 o 1D11.16 germinales PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 en el ensayo con NHLF. El número total de puntos de datos para cada media se indica por medio del número n y representa una titulación independiente de cada anticuerpo.

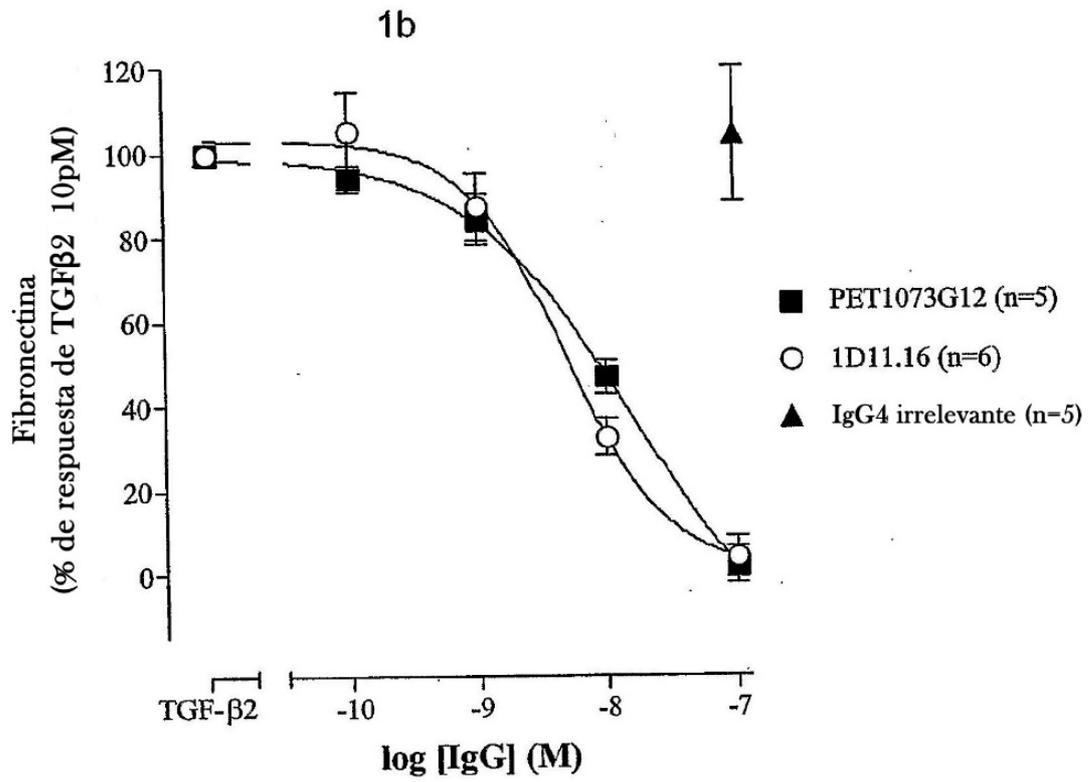
5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de anticuerpo que se une y neutraliza TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos, en donde dicha molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VH PET1073G12, que es SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio VL PET1073G12, que es SEQ ID NO: 7, y en donde la región constante de cadena pesada es una región constante de anticuerpo humano a partir de IgG4.
2. La molécula de anticuerpo según la reivindicación 1, en donde la cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera κ humana.
- 10 3. Una composición que comprende la molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o un dominio VH y un dominio VL de dicha molécula de anticuerpo.
- 15 5. Una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VH de una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VL de dicha molécula de anticuerpo.
6. Un método para producir una molécula de anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped que comprende:
- 1) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable VH, y
- 2) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable VL,
- 20 de la molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en condiciones para producir dicha molécula de anticuerpo y aislar y/o purificar dicha molécula de anticuerpo.
7. El método según la reivindicación 6, que comprende además formular la molécula de anticuerpo en una composición que incluye al menos un componente activo adicional.
- 25 8. Una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica, en donde la enfermedad fibrótica se selecciona de entre fibrosis renal, fibrosis pulmonar o fibrosis de pulmón.
9. Una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de cáncer.
10. Una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de enfermedad mediada por el sistema inmune.
- 30 11. Una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de enfermedad renal.
12. La molécula de anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en donde la enfermedad renal es glomerulonefritis, nefropatía o nefrosclerosis.



FIGURA



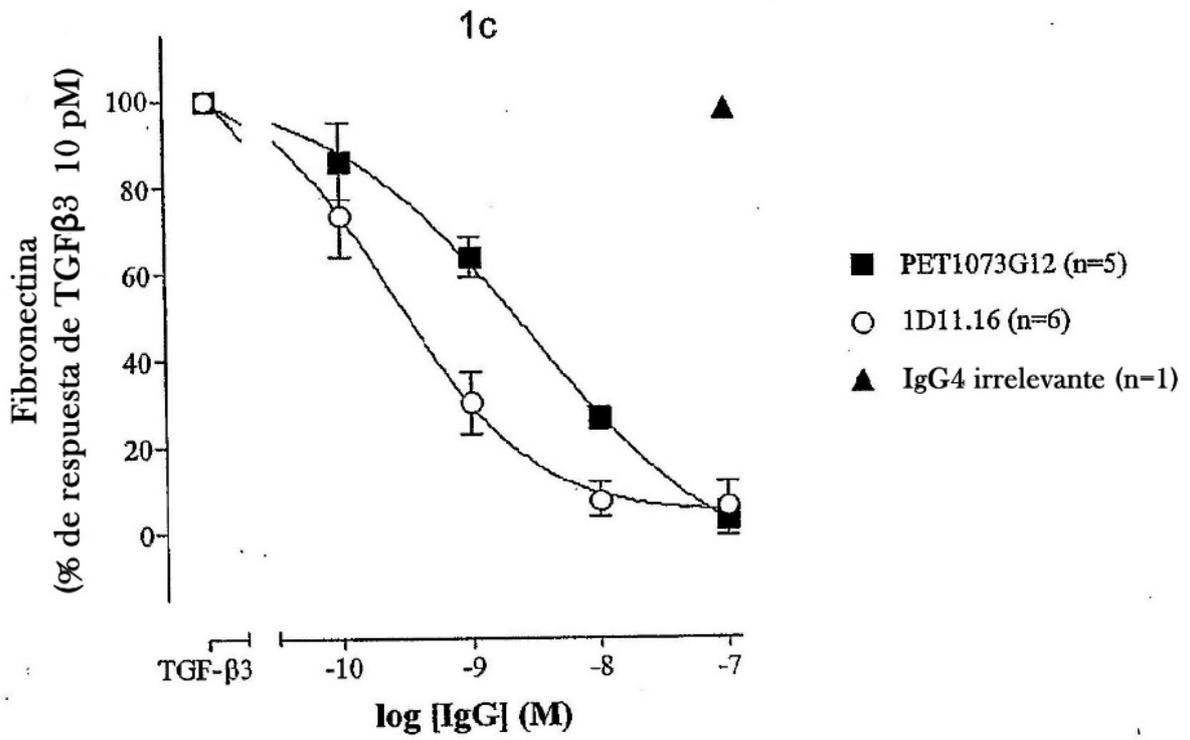


FIGURA 2a

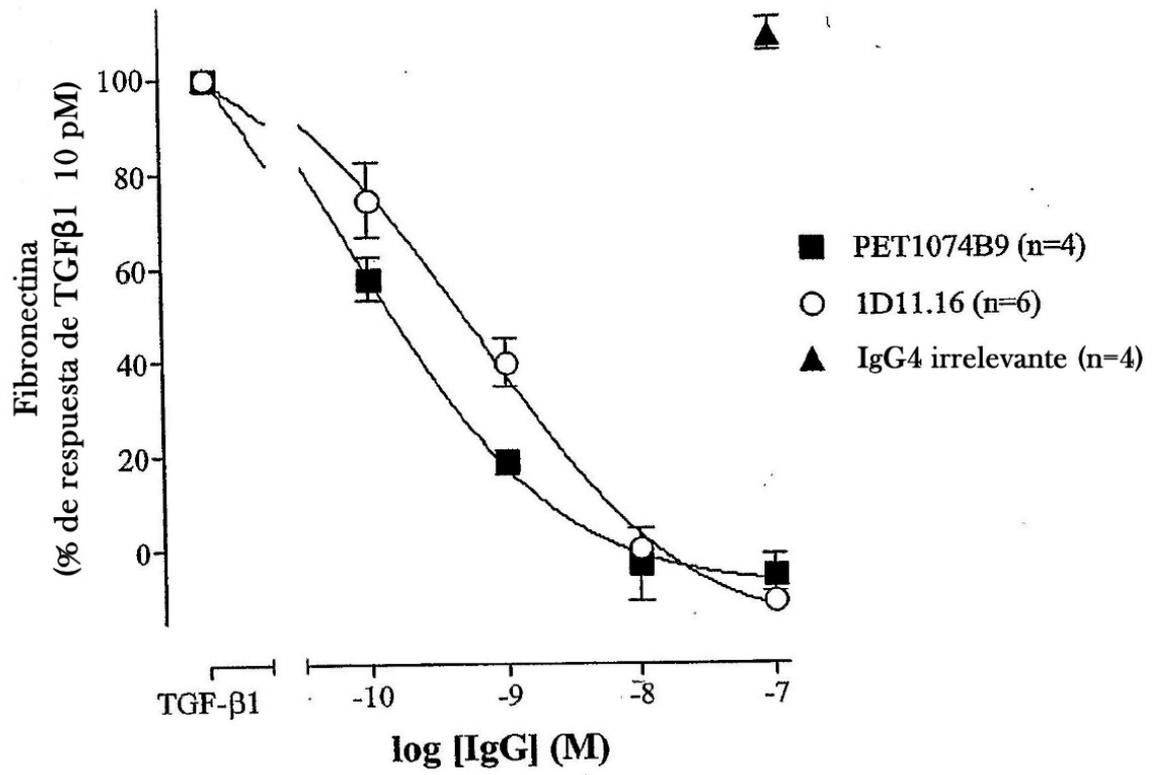


FIGURA 2b

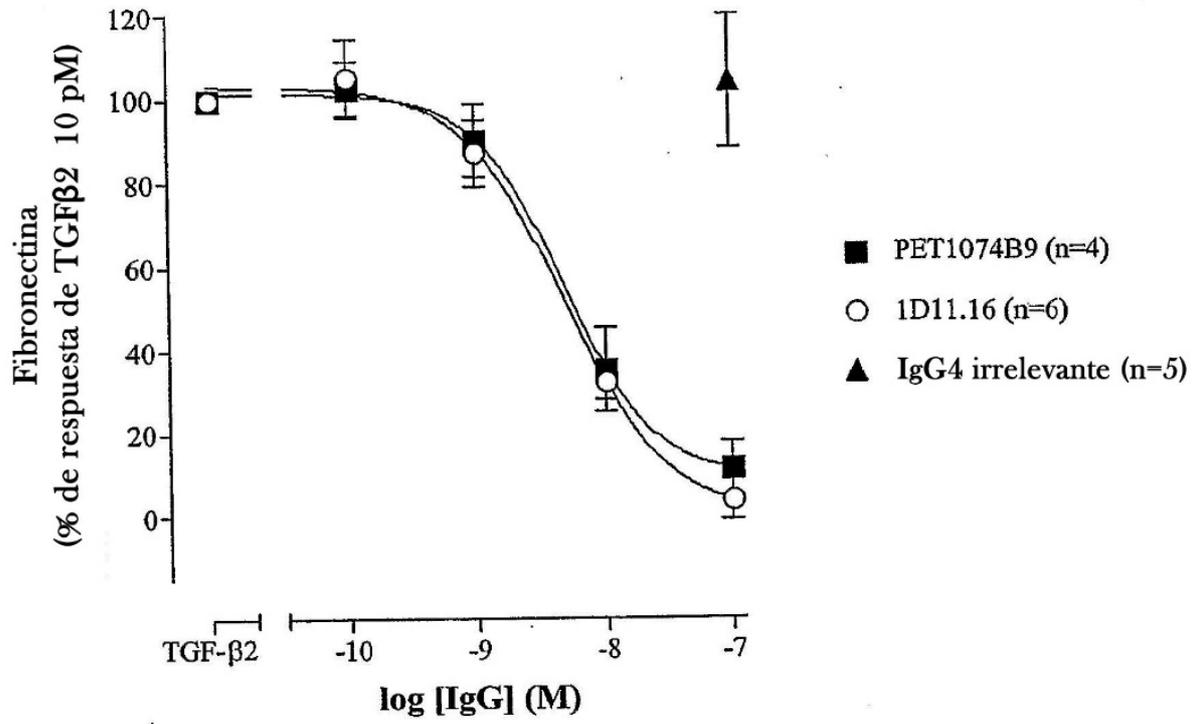


FIGURA 2c

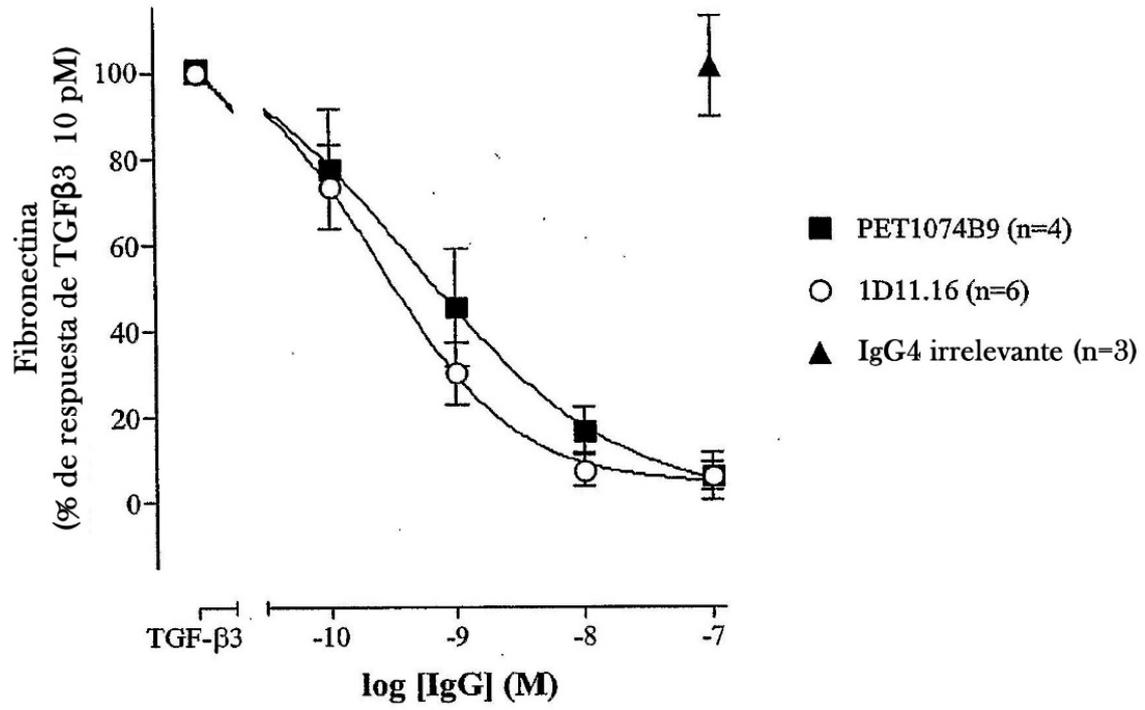


FIGURA 3a

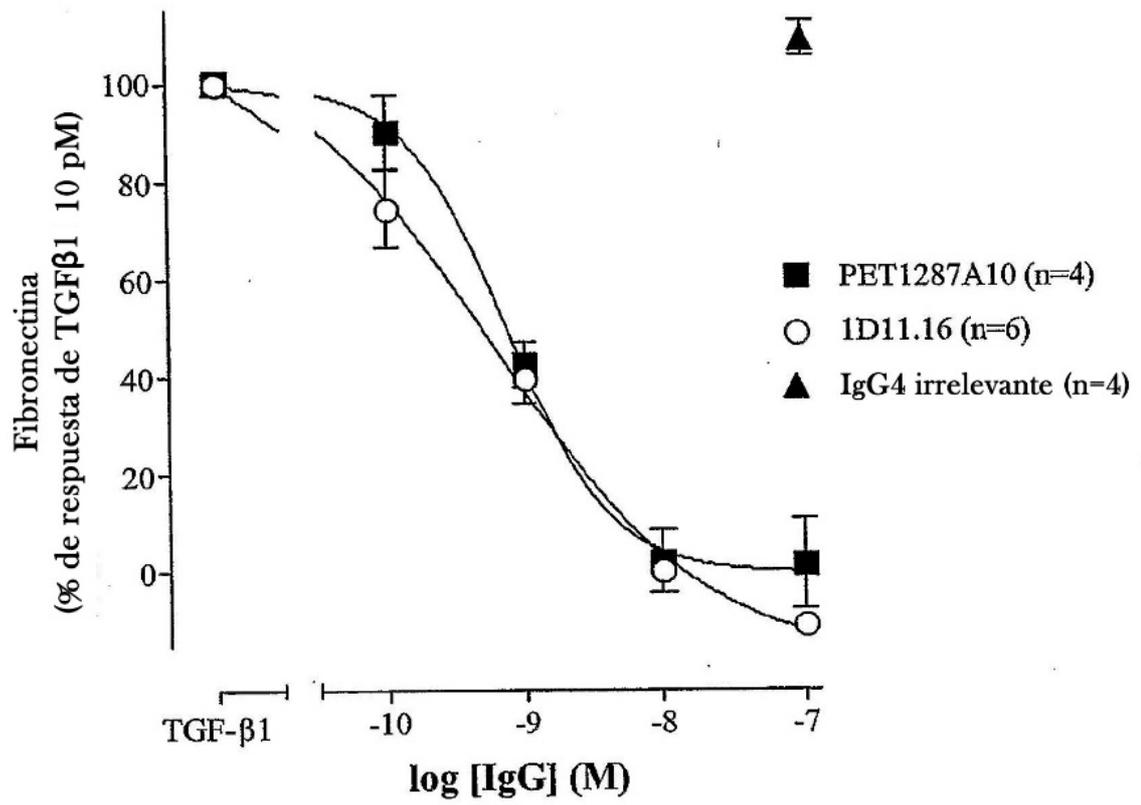


FIGURA 3b

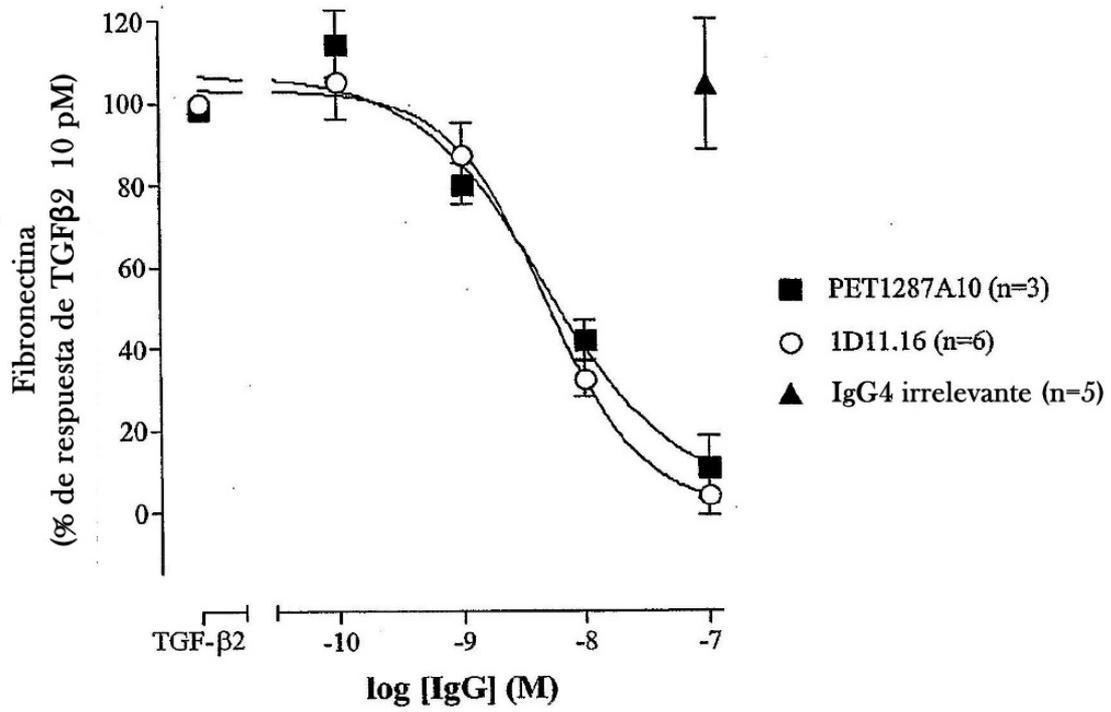


FIGURA 3c

