

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 177**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2011 PCT/US2011/001536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12030394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2011 E 11758276 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2611831**

54 Título: **Tratamiento de infarto de miocardio usando antagonistas de TGF-β**

30 Prioridad:

**01.09.2010 US 379315 P**

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

**03.06.2019**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)  
50 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**AKITA, GEOFFREY Y.;  
LONNING, SCOTT;  
GREGORY, RICHARD C., JR. y  
KUDEJ, AMELIA B.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 715 177 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

Tratamiento de infarto de miocardio usando antagonistas de TGF- $\beta$ .

## ANTECEDENTES

Campo de la divulgación

- 5 La presente divulgación se refiere a procedimientos de reducción de consecuencias adversas de infarto de miocardio.

Descripción de la técnica relacionada

10 Los problemas y las consecuencias para la salud de la enfermedad cardíaca son de gran alcance. La enfermedad cardíaca es la causa principal de muerte para tanto mujeres como hombres en los Estados Unidos. (Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. Deaths: final data for 2005. National Vital Statistics Reports. 2008;56(10)). Cada 34 segundos muere una persona en los Estados Unidos de enfermedad cardíaca. Más de 2.500 estadounidenses mueren de enfermedad cardíaca cada día. En 2005, 652.091 personas murieron de enfermedad cardíaca (50,5% de ellas mujeres). Esto fue el 27,1% de todas las muertes en los Estados Unidos. La enfermedad cardíaca es la principal causa de muerte para indios americanos y nativos de Alaska, negros, hispanos y blancos. Para asiáticos y habitantes de las islas del Pacífico, el cáncer es la principal causa de muerte (representando el 27,5% de todas las muertes), la enfermedad cardíaca ocupa la segunda posición (25,0%). (CDC. Deaths: leading causes for 2004. National Vital Statistics Reports. 2007;56(5)). Casi 6 millones de hospitalizaciones cada año (en los Estados Unidos) son debidas a enfermedad cardiovascular.

20 En 2009, se prevé que la enfermedad cardíaca cueste más de 304,6 mil millones de dólares, que incluye servicios sanitarios, medicamentos y pérdida de productividad. (Asociación americana del corazón. *Heart Disease and Stroke Statistics-2009 Update*. Dallas; AHA: 2009. Comité de estadística y subcomité de estadística de accidente cerebrovascular. *Circulation*. 15 de dic. de 2008). Mundialmente, la enfermedad cardíaca coronaria causó la muerte de más de 7,6 millones de personas en 2005. (Organización mundial de la salud. *The Global Burden of Disease: 2004 Update*. Ginebra; OMS:2008). En 2003, aproximadamente el 37% de los adultos informaron tener dos o más de seis factores de riesgo para enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular (hipertensión arterial, colesterol alto, diabetes, tabaquismo actual, inactividad física y obesidad). (Hayes DK, y col., Disparities in multiple risk factors for heart disease and stroke, 2003 *MMW*, 2005;54:113–116).

30 El infarto de miocardio (IM) es la muerte de tejido cardíaco producida por isquemia. La “isquemia” se refiere a deficiencia local de riego sanguíneo, generalmente producida por vasoconstricción u obstáculos locales a la circulación sanguínea. La restauración de la circulación sanguínea a un tejido u órgano previamente isquémico, tal como el corazón, se denomina “reperusión”.

35 El infarto agudo de miocardio (IAM), o un “infarto de miocardio”, se produce cuando la isquemia miocárdica localizada produce el desarrollo de una región definida de muerte de tejido. El IAM es casi siempre producido por la rotura de una lesión aterosclerótica en una arteria coronaria. Esto produce la formación de un trombo que tapona la arteria, deteniendo el suministro de sangre a la región del corazón que suministra.

40 Isquemia grave y prolongada produce una región de necrosis que se extiende en el espesor entero de la pared miocárdica. Un infarto transmural tal normalmente produce elevación del segmento ST. Isquemia menos grave y larga puede producirse cuando la oclusión coronaria va seguida de reperusión espontánea; una arteria relacionada con infarto no está completamente ocluida; la oclusión es completa, pero un riego sanguíneo colateral existente previene la isquemia completa; o la demanda de oxígeno de la zona afectada del miocardio es más pequeña. Bajo estas condiciones, la zona necrótica puede limitarse principalmente al subendocardio, normalmente causando IM por no elevación del segmento ST.

45 Tanto regiones miocárdicas infartadas como no afectadas experimentan cambios progresivos durante las horas, días y semanas tras un evento isquémico. Este proceso de evolución miocárdica postinfarto conduce a la aparición de cambios característicos en momentos predecibles después del evento inicial. La isquemia aguda produce una pérdida inmediata de contractilidad en el miocardio afectado, una afección llamada hipocinesia. La necrosis empieza a desarrollarse en el subendocardio aproximadamente 15–30 min después de la aparición de la isquemia aguda. La región necrótica crece hacia afuera del epicardio durante las siguientes 3–6 h, extendiendo finalmente toda la pared ventricular. En los bordes del infarto, el miocardio puede aturdirse (lesionarse reversiblemente) y finalmente se recuperará si se restaura el flujo de sangre. La contractilidad en el miocardio viable restante aumenta, un proceso llamado hipercinesia.

50 Una progresión de cambios celulares, histológicos y macroscópicos se desarrollan en del infarto. Las alteraciones en el aspecto macroscópico de tejido infartado no son evidentes durante al menos 6 h después de la aparición de muerte celular. Sin embargo, la bioquímica y ultraestructura celular empiezan a mostrar anomalías en el plazo de 20 min. La lesión celular es progresiva, haciéndose cada vez más irreversible durante aproximadamente 12 h.

Entre 4 y 12 h después de empezar la muerte celular, el miocardio infartado empieza a experimentar necrosis de la coagulación, un proceso caracterizado por hinchazón de células, rotura de orgánulos y desnaturalización de proteínas. Después de aproximadamente 18 h, los neutrófilos (linfocitos fagocíticos) entran en el infarto. Sus números alcanzan un máximo después de aproximadamente 5 días, y luego disminuyen. Después de 3–4 días, el tejido de granulación empieza en los bordes de la zona de infarto. Esto consiste en macrófagos, fibroblastos (que establecen tejido cicatricial) y nuevos capilares. El miocardio infartado es especialmente blando entre 4 y 7 días y, por tanto, es máximamente propenso a rotura. A medida que el tejido de granulación migra hacia adentro hacia el centro del infarto durante varias semanas, el tejido necrótico es tragado y digerido por los macrófagos. Entonces, el tejido de granulación madura progresivamente, con un aumento en tejido conectivo (cicatricial) y pérdida de capilares. Después de 2–3 meses, el infarto ha cicatrizado, dejando una región no contrayente de la pared ventricular que es más delgada, firme y de color gris pálido.

Los cambios morfológicos microscópicos evolucionan con el tiempo del siguiente modo: fibras miocárdicas onduladas aparecen 1 - 3 horas después de la aparición de isquemia. Un defecto de tinción con colorante de tetrazolio o de fuchsina básica aparece 2 - 3 horas después de la aparición de isquemia. La necrosis de la coagulación con pérdida de estriaciones cruzadas, bandas de contracción, edema, hemorragia e infiltrado neutrófilo temprano aparece 4 - 12 horas después de la aparición de isquemia. La necrosis de la coagulación, picnosis de núcleos y bandas de contracción marginales en curso son evidentes 18 - 24 horas después de la aparición de isquemia. La pérdida total de núcleos y estriaciones junto con infiltrado neutrófilo intenso aparece 24 - 72 horas después de la aparición de isquemia. La infiltración de macrófagos y mononuclear y, la respuesta fibrovascular, empiezan 3 - 7 días después de la aparición de isquemia. Una respuesta fibrovascular con tejido de granulación prominente es evidente 10 - 21 días después de la aparición de isquemia. La fibrosis es fácilmente evidente a las 7 semanas o menos después de un evento isquémico.

Las complicaciones pueden incluir: arritmias y defectos de conducción, extensión de infarto o reinfarto, insuficiencia cardíaca congestiva, choque cardiogénico, pericarditis, trombosis mural con posible embolización, rotura de la pared miocárdica con posible taponamiento, rotura de músculo papilar con posible insuficiencia valvular y formación de aneurisma ventricular.

#### COMPENDIO

En la presente memoria se expone un procedimiento de reducción de una consecuencia adversa de infarto de miocardio en un paciente que comprende administrar un antagonista de TGF- $\beta$  al paciente durante la fase aguda del infarto de miocardio. En algunas realizaciones, el infarto de miocardio es un infarto agudo de miocardio. La administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede comenzar en el plazo de 120 horas desde la aparición de isquemia aguda miocárdica. En diversas realizaciones, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza en el plazo de aproximadamente 72 horas, en el plazo de aproximadamente 48 horas, en el plazo de aproximadamente 24 horas o en el plazo de aproximadamente 12 horas desde la aparición de isquemia aguda miocárdica. La administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede comenzar antes de la infiltración sustancial de macrófagos y mononuclear de tejido afectado por el infarto de miocardio. En algunas realizaciones, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por infiltración neutrófila de tejido afectado por el infarto de miocardio. En otras realizaciones, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por necrosis de tejido afectado por el infarto de miocardio. Generalmente, el paciente puede ser un mamífero humano o no humano.

El antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una o más isoformas de TGF- $\beta$ .

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además administrar un compuesto que puede restaurar selectivamente una función deseable de TGF- $\beta$  al paciente. Por ejemplo, un compuesto que puede restaurar selectivamente una función deseable de TGF- $\beta$  puede ser un fármaco antiinflamatorio, o un antagonista de TNF- $\alpha$ . En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir administrar un inhibidor de ACE al paciente. El inhibidor de ACE puede seleccionarse del grupo que consiste en benazeprilo, captoprilo, fosinoprilo, moexiprilo, perindoprilo, quinaprilo, transdolaprilo, lisinoprilo, enalaprilo y ramapirilo. En otras realizaciones, el procedimiento puede comprender además administrar un antagonista de receptores de angiotensina II al paciente. El antagonista de receptores de angiotensina II puede seleccionarse del grupo que consiste en eprosartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán y valsartán.

El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una o más isoformas de TGF- $\beta$  y puede neutralizar uno o más de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el dominio VH de PET1073G12 (SEC ID N<sup>o</sup>: 2) y el dominio VL de PET1073G12 (SEC ID N<sup>o</sup>: 7).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra una reducción en la fibrosis con administración de 1D11-D3 y 1D11D-5 y 13C4.

- La FIG. 2 muestra engrosamiento de la pared anterior y engrosamiento de la pared posterior en un análisis de ecocardiograma.
- La FIG. 3 muestra una puntuación de movimiento de la pared regional en un análisis de ecocardiograma.
- La FIG. 4 muestra una reducción en la fibrosis con administración de 1D11 y 13C4.
- 5 La FIG. 5 muestra engrosamiento de la pared anterior y engrosamiento de la pared posterior en un análisis de ecocardiograma para grupos tratados con 13C4-D0, 1D11-D0, 13C4-D1, 1D11-D1, 13C4-D5 y 1D11-D5.
- La FIG. 6 muestra una puntuación de movimiento de la pared regional en un análisis de ecocardiograma para grupos tratados con vehículo, 13C4 – D0, 1D11 – D0, 13C4 – D1, 1D11 – D1, 13C4 – D5 y 1D11 – D5.
- La FIG. 7 muestra volumen de cicatriz del VI en comparación con grupos tratados con vehículo.
- 10 La FIG 8 muestra el número de células positivas por TUNEL en el área adyacente a la cicatriz.
- La FIG. 9 muestra la fracción expulsada del VI (FEVI), medida 4 semanas después de oclusión de la arteria coronaria/reperusión de la arteria coronaria (OAC/RAC).
- La FIG 10 muestra la FEVI medida 2-4 semanas después de OAC/RAC.
- La FIG. 11 muestra el tiempo de relajación isovolumétrico del VI.
- 15 La FIG. 12 muestra engrosamiento de la pared regional en comparación con el vehículo.
- La FIG. 13 muestra las pendientes de la relación presión diastólica final del VI-volumen.
- La FIG. 14 muestra una reducción en la fibrosis en el VI con administración de 1D11 con dosis de 1 y 5 mg/kg de dos formulaciones diferentes.
- 20 La FIG. 15 muestra una reducción en la fibrosis en el área en riesgo con administración de 1D11 con dosis de 1 y 5 mg/kg de dos formulaciones diferentes.
- La FIG. 16 muestra un aumento de miocardio en el área en riesgo con administración de 1D11 con dosis de 1 y 5 mg/kg de dos formulaciones diferentes.
- La FIG. 17 muestra la puntuación de movimiento de la pared regional en un análisis de ecocardiograma para vehículo, 13C4 y 1D11 con 1 y 5 mg/kg para ambas formulaciones.
- 25 La FIG. 18 muestra niveles en suero dependientes de dosis de 1D11 tras administración IV del anticuerpo.
- La FIG. 19 muestra reducciones en osteopontina en suero con administración de 1D11 tras I/R.
- La FIG. 20 muestra inducción de TGF- $\beta$ 1 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 1 tras I/R.
- 30 La FIG. 21 muestra inducción de TGF- $\beta$ 2 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 2 tras I/R.
- La FIG 22 muestra inducción de TGF- $\beta$ 3 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 3 tras I/R.
- La FIG 23 muestra inducción de colágeno 3 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de colágeno 3 tras I/R.
- 35 La FIG 24 muestra inducción de endotelina 1 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de endotelina 1 tras I/R.
- La FIG 25 muestra inducción del inhibidor 1 del activador del plasminógeno tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de inhibidor 1 del activador del plasminógeno tras I/R.
- 40 La FIG 26 muestra inducción de Snail1 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de Snail1 tras I/R.
- La FIG 27 muestra inducción de Snail2 tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de Snail2 tras I/R.
- La FIG 28 muestra inducción de  $\alpha$ -actina de músculo liso tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de  $\alpha$ -actina de músculo liso tras I/R.

La FIG 29 muestra inducción de fibronectina tras IR y reducción mediada por 1D11 dependiente de la dosis de fibronectina tras I/R.

La FIG 30 muestra el efecto de administración de 5 mg/kg de 1D11 sobre la expresión de Bax.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Después de un IM, o infarto de miocardio, el corazón empieza a auto-repararse. Este proceso de reparación cardíaca puede separarse en fases solapantes. La primera fase se conoce como la fase inflamatoria. Tras la fase inflamatoria está la fase proliferativa. Por último lugar, la fase de maduración es la última fase de reparación del corazón (Bujak, M. y Frangogiannis, *NG Cardiovasc Res.* 74:184-195 (2007)).

10 Inmediatamente tras un infarto de miocardio, la fase inflamatoria se caracteriza por la muerte de cardiomiocitos, inducción de citocinas y quimiocinas, y una entrada de células inflamatorias para limpiar el tejido que está muriendo. Durante la fase proliferativa hay supresión de mediadores inflamatorios, además de una entrada de células que contribuyen a la formación de fibras de tejido conectivo, fibroblastos y células endoteliales en el área infartada. Los fibroblastos secretan matriz extracelular. Las células endoteliales contribuyen a la formación de una red microvascular dentro del tejido conectivo fibroso suelto en desarrollo, o tejido de granulación. Después, las células inflamatorias infiltradas empiezan a experimentar muerte celular, o lo que se conoce como apoptosis. Finalmente, durante la fase maduración, el tejido de granulación de la fase proliferativa se organiza y madura en una densa cicatriz de tejido conectivo fibroso. Esta remodelación de la respuesta fibrótica en el miocardio puede prolongarse. En general, la fase inflamatoria se produce desde el momento del infarto hasta 1-7 días después del IM. La fase proliferativa se produce de aproximadamente 5-14 días después del IM. Finalmente, la fase de maduración empieza de aproximadamente 10-14 días después del IM y continúa mientras que se produce la remodelación cardíaca.

15 El TGF- $\beta$  se induce en el miocardio infartado y participa en todas las fases de reparación después del IM, que ha complicado los intentos por definir la función de esta citocina en reparación cardíaca. Por tanto, no se entiende bien la función precisa de TGF- $\beta$  en la reparación cardíaca tras un IM. TGF- $\beta$  es una citocina multifuncional originalmente llamada por su capacidad para transformar fibroblastos normales en células capaces de crecimiento independiente de anclaje. Hay al menos cinco formas de TGF- $\beta$  actualmente identificadas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5. Es posible purificar esta familia de TGF- $\beta$  a partir de diversas especies que incluyen seres humanos, ratones, monos verdes, cerdos, vacas, pollitos y ranas. También es posible purificar esta familia de TGF- $\beta$  a partir de diversas fuentes del cuerpo que incluyen hueso, plaquetas o placenta, para producirla en cultivo celular recombinante, y para determinar su actividad.

20 En seres humanos se sabe que existen tres isoformas, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. (Números de acceso de Swiss Prot P001137, P08112 y P10600 (respectivamente)). En su estado biológicamente activo, estas tres isoformas son homodímeros de 25 kDa que comprenden dos monómeros de 112 aminoácidos unidos por un puente disulfuro entre cadenas. TGF- $\beta$ 1 se diferencia de TGF- $\beta$ 2 por 27 aminoácidos, y de TGF- $\beta$ 3 por 22 aminoácidos. Las diferencias son principalmente cambios de aminoácidos conservadores. La estructura tridimensional de TGF- $\beta$  ha sido determinada por cristalografía de rayos X y se han definido regiones de unión a receptor. Tanto TGF- $\beta$  humanos como TGF- $\beta$  de ratón son similares. TGF- $\beta$ 1 humano tiene una diferencia de aminoácido de un TGF- $\beta$ 1 de ratón. TGF- $\beta$ 2 humano tiene sólo una diferencia de tres aminoácidos de TGF- $\beta$ 2 de ratón, y TGF- $\beta$ 3 humano y de ratón son idénticos.

25 El término "TGF- $\beta$ " o "factor de crecimiento beta transformante" se refiere a la familia de moléculas descritas que tienen cualquiera de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa de cualquiera de las isoformas de TGF- $\beta$  de seres humanos. Estas incluyen las formas latentes ("TGF- $\beta$  latente") y complejo asociado o sin asociar de precursores y TGF- $\beta$  maduro. La referencia a tal TGF- $\beta$  se entenderá que es una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas, que incluyen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5 y versiones latentes de los mismos, además de una especie de TGF- $\beta$  humano identificada en el futuro, que incluye polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier TGF- $\beta$  conocido y que tiene al menos aproximadamente el 75%, preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, todavía más preferentemente al menos aproximadamente el 90%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de homología con la secuencia. Los términos específicos "TGF- $\beta$ 1", "TGF- $\beta$ 2" y "TGF- $\beta$ 3," además de "TGF- $\beta$ 4" y "TGF- $\beta$ 5", se refieren a los TGF- $\beta$  definidos en la bibliografía (por ejemplo, Derynck y col., *Nature*, arriba, Seyedin y col., *J. Biol. Chem.*, 262, arriba, y deMartin y col., arriba). El término "TGF- $\beta$ " se refiere al gen que codifica TGF- $\beta$  humano.

30 Miembros de la familia de TGF- $\beta$  son proteínas que tienen nueve residuos de cisteína en la porción madura de la molécula, comparten al menos el 65% de homología con otras secuencias de TGF- $\beta$  conocidas en la región madura y pueden competir por el mismo receptor. Además, parece que todos están codificados como un precursor mayor que comparte una región de alta homología próxima al extremo N y muestra conservación de tres residuos de cisteína en la porción del precursor que después se eliminará por procesamiento. Los miembros de la familia de TGF- $\beta$  también parecen tener un sitio de procesamiento con cuatro o cinco aminoácidos.

Un aumento en el nivel de actividad de TGF- $\beta$  participa en un gran número de afecciones patológicas que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: (i) fibrosis, cicatrización y adhesión durante cicatrización; (ii) enfermedades fibróticas del corazón, pulmones, hígado y riñones; (iii) aterosclerosis y arteriosclerosis; (iv) ciertos tipos de cáncer que incluyen cáncer de próstata, tumores neuroendocrinos del aparato digestivo, cáncer de cuello uterino, glioblastomas y cáncer gástrico; (v) angiopatía, vasculopatía, nefropatía; (vi) esclerosis sistémica; (vii) infección vírica tal como hepatitis C y VIH; y (viii) trastornos y deficiencias inmunológicos e inflamatorios tales como artritis reumatoide.

Estudios iniciales en la función de TGF- $\beta$  en lesión cardíaca indican que una función protectora se produce en la primera fase o fase inflamatoria de reparación cardíaca después del IM. En estos estudios iniciales, TGF- $\beta$  se administró en modelos de lesión isquémica miocárdica en el plazo de algunas horas después de la lesión isquémica. Lefer mostró en corazones de rata aislados que la administración de TGF- $\beta$  antes, o inmediatamente después de una lesión isquémica cardíaca, redujo aniones superóxido en circulación cardíaca, mantuvo la relajación coronaria dependiente de endotelio, redujo la lesión mediada de factor de necrosis tumoral (TNF) exógeno y previno lesión cardíaca grave. (Lefer, y col. *Science*, 249:61, 1990). Lefer y colaboradores continuaron demostrando que TGF- $\beta$  preservó la función endotelial, particularmente por mantenimiento de la formación de factor de relajación derivado de endotelio (EDRF, pero ahora conocido como óxido nítrico o NO) por el endotelio. (Lefer, AM. *Biochem Pharmacol.* 42: 1323-1327, 1991). Otros estudios con cardiomiocitos aislados o preparaciones de corazón aisladas esclarecieron adicionalmente mecanismos de cardioprotección mediada por TGF- $\beta$ .

Keller y col. (*Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 30:197-204, 1997) mostraron que en modelos de I/R cardíacos caninos cuando TGF- $\beta$  se administró 30 min antes de la isquemia/reperfusión, hubo un 50% de reducción en el índice de fuga de proteínas (PLI) en la zona de infarto inmediatamente tras reperfusión, en comparación con controles sin tratar. Sin embargo, no se observó mejora en PLI 48 horas después de la reperfusión. Además, TGF- $\beta$  no mejoró la relajación dependiente de endotelio en perros 1 hora o 48 horas después de la reperfusión. Estos resultados sugirieron que TGF- $\beta$  puede prevenir el aumento de permeabilidad vascular coronaria temprana en reperfusión, pero puede no prevenir la posterior lesión vascular coronaria (Keller, y col., *J Cardiovasc Pharmacol.* 30:197-204, 1997).

Más recientemente, la función de TGF- $\beta$  en reparación de IM se investigó usando antagonistas de receptores de TGF- $\beta$  para interrumpir la señalización de TGF- $\beta$ . En un estudio, Ikeuchi y col. (*Cardiovascular Research*, 64:526-35, 2004) bloquearon la señalización de TGF- $\beta$  en el momento del IM por inyección intramuscular de un plásmido que codifica el dominio extracelular del receptor tipo II de TGF- $\beta$  (T $\beta$ IIIR) en ratones 7 días antes del IM. Observaron un aumento de la mortalidad durante las 24 horas después del IM, aumento de inflamación, aumento de la dilatación del ventrículo izquierdo (VI) y disfunción contráctil a pesar de no aumentar el tamaño de infarto en comparación con ratones sin tratar. Para bloquear TGF- $\beta$  en una fase posterior después del IM, los ratones recibieron inyecciones intramusculares de T $\beta$ IIIR en el día 0 o en el día 7 después del IM. Cuatro semanas después del IM, el tratamiento con T $\beta$ IIIR previno la dilatación del VI, disfunción contráctil, hipertrofia de cardiomiocitos y fibrosis intersticial en el miocardio no infartado. TGF- $\beta$  fue beneficioso en la fase temprana, pero los beneficios se perdieron con expresión sostenida, conduciendo a remodelación del VI y fallo.

En otro estudio, Okada y col. (*Circulation*, 11:2430-37, 2005) inyectaron intramuscularmente ratones con un adenovirus que codifica un receptor tipo II de TGF- $\beta$  soluble (Ad.CAGsT $\beta$ RII) 3 días después del IM. En ratones tratados después del IM, la supervivencia fue significativamente mejorada. Esto fue acompañado de atenuación significativa de la dilatación ventricular y función cardíaca mejorada 4 semanas después del IM. El tamaño del IM no se diferenció del control, pero el espesor y la circunferencia del IM fueron más pequeños en animales tratados. La apoptosis entre miofibroblastos del área de infarto fue menos frecuente en animales tratados. La administración de Ad.CAG-sT $\beta$ RII 4 semanas después del IM fue ineficaz. Okada y col. consideraron que una ventana crítica para la inhibición de TGF- $\beta$  se produjo después de tres días y antes de cuatro semanas. La inyección en su estudio se hizo deliberadamente en un momento en el que se consideró que el tratamiento no afectaría la muerte isquémica aguda de cardiomiocitos. Okada y col. creyeron que la inhibición de TGF- $\beta$  durante la fase aguda del IM se considera perjudicial.

Posterior a estos estudios, el antagonismo de TGF- $\beta$  usando un anticuerpo antagonista eficaz contra TGF- $\beta$ 1, 2 y 3 se investigó en la reparación de IM. Frantz y col. (*Basic Research in Cardiology*, 103:485-502, 2008) administraron el anticuerpo antagonista para TGF- $\beta$  o un anticuerpo de control negativo a ratones empezando 7 días antes o 5 días después de la inducción del IM por ligación de la arteria coronaria. Los anticuerpos se administraron cada dos días durante la duración de 8 semanas del estudio. La mortalidad fue significativamente mayor en los grupos que recibieron el anticuerpo anti-TGF- $\beta$ . Además, ambos grupos tratados con el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  demostraron un aumento de la dilatación ventricular izquierda. Estos autores concluyeron que el tratamiento con anti-TGF- $\beta$  antes o después de la ligación de la arteria coronaria aumenta la mortalidad y empeora la remodelación ventricular izquierda. Los autores sugieren que las diferencias en la duración del antagonismo de TGF- $\beta$  y concentración de antagonistas de TGF- $\beta$  pueden explicar la diferencia en los resultados entre su estudio y aquellos informados por Ikeuchi y col. (2004) y Okada y col. (2005).

En la presente memoria se expone un procedimiento para tratar un paciente que padece infarto de miocardio, particularmente infarto agudo de miocardio, o para reducir una consecuencia adversa de infarto de miocardio en un paciente, comprendiendo el procedimiento administrar un antagonista de TGF- $\beta$  al paciente durante la fase aguda del infarto de miocardio. El hallazgo de que la administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede ser ventajosamente comenzada en un momento inferior a 120 horas después de la aparición de isquemia aguda miocárdica es sorprendente. En algunos casos, los procedimientos descritos en la presente memoria contemplan que la administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede comenzar en el plazo de aproximadamente 72 horas, en el plazo de aproximadamente 48 horas, en el plazo de aproximadamente 24 horas o en el plazo de aproximadamente 12 horas desde la aparición de isquemia aguda miocárdica. Generalmente, en los procedimientos expuestos en el presente documento, un antagonista de TGF- $\beta$  se administra durante la fase aguda del IM. La administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede comenzar antes de la infiltración sustancial de macrófagos y mononuclear de tejido afectado por el infarto de miocardio. En algunas realizaciones, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por infiltración neutrófila de tejido afectado por el infarto de miocardio. En otras realizaciones, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por necrosis de tejido afectado por el infarto de miocardio.

“Tratamiento” se refiere a tanto tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con un trastorno tratable, además de aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. El tratamiento puede o puede no comprender una cura o recuperación completa de la función normal. El tratamiento también puede comprender mejora de síntomas no deseados y/o una reducción de las consecuencias adversas de un trastorno. Un “mamífero” puede ser cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un primate tal como un mono un simio, o un ser humano, por ejemplo. El término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero.

Aunque pueden desearse ciertas funciones de TGF- $\beta$  en la fase temprana después del IM, el antagonismo de TGF durante el periodo agudo y más allá puede producir remodelación y función cardíaca mejorada. Sin embargo, si se desea restaurar una o más funciones seleccionadas de TGF- $\beta$ , puede desearse coadministrar un antagonista de TGF- $\beta$ , otro compuesto que pueda restaurar selectivamente una función deseable de TGF- $\beta$ . Por ejemplo, un compuesto que puede restaurar selectivamente una función deseable de TGF- $\beta$  puede ser un fármaco antiinflamatorio, o un antagonista de TNF- $\alpha$ . También puede desearse coadministrar otro tratamiento, por ejemplo, el procedimiento puede incluir administrar un inhibidor de ACE al paciente. El inhibidor de ACE puede seleccionarse del grupo que consiste en benazeprilo, captoprilo, fosinoprilo, moexiprilo, perindoprilo, quinapril, transdolapril, lisinopril, enalapril y ramapril. En otras realizaciones, el procedimiento puede comprender además administrar un antagonista de receptores de angiotensina II al paciente. El antagonista de receptores de angiotensina II puede seleccionarse del grupo que consiste en eprosartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán y valsartán.

Pueden usarse anticuerpos neutralizantes como antagonistas de TGF- $\beta$ . Un “anticuerpo” es una inmunoglobulina tanto si es natural como si se produce parcialmente o completamente sintéticamente. El término también engloba cualquier polipéptido o proteína que comprenda un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a antígeno son moléculas tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos. El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y específicamente engloba anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos intactos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpo policlona que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos por que pueden sintetizarse sin ser contaminados por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. h<sup>o</sup> 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

“Fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo. Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa.

El término “variable” en el contexto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencian ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando ampliamente una configuración de hoja  $\beta$ , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja  $\beta$ . El término “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR”. Residuos de la “región estructural” o “FR” son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se han definido en el presente documento.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab mediante la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Fragmentos “Fv monocatenarios” o “scFv” de anticuerpos comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los cuales estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos.

Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo de receptor) en los que residuos de una región hipervariable del receptor están sustituidos con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo de donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo de receptor o en el anticuerpo de donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)).

Un “anticuerpo para TGF- $\beta$ ” se refiere a un anticuerpo que se une a cualquiera de las isoformas de TGF- $\beta$ , preferentemente se une a cualquiera de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 3, o a cualquier combinación de los mismos, más preferentemente al menos TGF- $\beta$ 1, o al menos TGF- $\beta$ 2, y lo más preferentemente TGF- $\beta$ 1, o TGF- $\beta$ 1 junto con TGF- $\beta$ 2. Opcionalmente, el anticuerpo puede unirse a al menos TGF- $\beta$ 3.

Un anticuerpo monoclonal de ratón neutralizante que se une a las isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 se conoce como 1D11 y está disponible de R&D Systems (nº de catálogo MAB-1835) a través de ATCC (nº de acceso HB 9849). Un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra TGF- $\beta$ 1 humano también está disponible de R&D Systems. Los anticuerpos monoclonales de ratón neutralizantes también se han generado a partir de ratones inmunizados con péptidos de TGF- $\beta$ 1 humano que comprenden las posiciones de aminoácido 48 a 60 (anticuerpo reactivo con TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) y posiciones de aminoácido 86 a 101 (anticuerpo específico para TGF- $\beta$ 1). (Hoefler y Anderer, *Cancer Immunol. Immunother.*, 41: 302-308 (1995)). GC1008 es un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado que neutraliza todas las isoformas de TGF- $\beta$  y es adecuado para uso terapéutico en seres humanos.



1D11 es un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  específico para pan murino que neutraliza TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 de ratón y TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 humano en un amplio intervalo de ensayos *in vitro* (patente de EE. UU. n° 5.571.714; hoja de producto de R&D Systems para MAB1835). En modelos animales de fibrosis, 1D11 ha demostrado ser eficaz. Sin embargo, 1D11 es un anticuerpo monoclonal murino y puede ser inadecuado para uso terapéutico en seres humanos. Por tanto, en algunas realizaciones puede desearse un anticuerpo humano o un anticuerpo modificado que comprenda elementos de secuencias humanas.

En algunas realizaciones, los procedimientos para tratar IM pueden comprender la administración de anticuerpos contra TGF- $\beta$  para tratar fibrosis aguda que está asociada a la producción en exceso de TGF- $\beta$  en enfermedades relacionadas con TGF- $\beta$ . El cuerpo responde a una lesión o enfermedad por tejidos destruidos en regeneración. Cuando la lesión se prolonga o es amplia, el tejido destruido puede sustituirse por tejido conectivo fibrótico especializado. La deposición de este tejido fibrótico puede producir una alteración del tejido afectado o de la función de órgano en el paciente. La administración de una cantidad eficaz de anticuerpo anti-TGF- $\beta$  durante la fase aguda puede reducir el posterior desarrollo de fibrosis. Además, una cantidad eficaz de anticuerpo anti-TGF- $\beta$  también puede administrarse durante el periodo de recuperación después del IM que normalmente se caracteriza por fibrosis para neutralizar la actividad biológica de TGF- $\beta$ , reduciendo así el desarrollo fibrótico.

En algunas realizaciones, el antagonista de TGF- $\beta$  puede seleccionarse del grupo que consiste en: (i) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una o más isoformas de TGF- $\beta$ ; (ii) un receptor de TGF- $\beta$  o fragmento soluble del mismo; (iii) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a uno o más receptores de TGF- $\beta$ ; y (iv) un oligonucleótido de ARN antisentido o interferente. Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  que se unen específicamente y neutralizan una molécula de TGF- $\beta$  son particularmente útiles como antagonistas de TGF- $\beta$ . Ejemplos de tales anticuerpos se describen en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0251658. Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  incluyen anticuerpos específicos para TGF- $\beta$ , en particular TGF- $\beta$  humano, que incluyen anticuerpos específicos que están dirigidos a TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3.

Como los anticuerpos pueden modificarse de varias formas, el término "molécula de anticuerpo" debería interpretarse como que cubre cualquier anticuerpo o sustancia que tenga un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo con la especificidad requerida. Por tanto, este término engloba fragmentos de anticuerpos y derivados, que incluyen cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a antígeno, tanto si es natural como completamente o parcialmente sintético. Por tanto, están incluidas moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, o equivalente, fusionadas con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un gran conjunto de bibliografía posterior. Esto es por lo que, a menos que se limite específicamente, el término anticuerpo anti-TGF- $\beta$  se usa ampliamente en la presente memoria para incluir anticuerpos completos (por ejemplo, IgG, tal como IgG1 o IgG4), fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, dAb), o moléculas que comprenden un sitio de unión a antígeno anti-TGF- $\beta$  derivado de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  o componentes de los mismos.

Los antagonistas de TGF- $\beta$  incluyen anticuerpos anti-TGF- $\beta$  monoclonales humanizados que tienen uno o más residuos de aminoácidos y que se introducen en él de una fuente que es no humana. La humanización puede realizarse siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano con secuencias de la región hipervariable. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden ser anticuerpos quiméricos (por ejemplo, como se describen en la patente de EE. UU. n° 4.816.567) en los cuales sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Según el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la colección entera de secuencias del dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Preferentemente, los anticuerpos humanizados retienen alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante un procedimiento que comprende análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensional están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y expresan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas expresiones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de

- residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse del receptor e importar secuencias de manera que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como el aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión a antígeno.
- 5
- Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  normalmente comprenden dominios VH y VL de anticuerpos. Dentro de los dominios VH y VL están regiones determinantes de la complementariedad, CDR, que pueden estar comprendidas 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 un dominio VL de anticuerpo o porciones de unión antígeno de los mismos.
- 10 Un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede comprender un conjunto de HCDR, un conjunto de LCDR, o ambos, y/o un dominio VH, dominio VL de anticuerpo humano o ambos.
- Un conjunto de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 puede tener secuencias seleccionadas de los siguientes conjuntos:
- HCDR1 SEC ID N°: 3, HCDR2 SEC ID N°: 4, HCDR3 SEC ID N°: 5 (denominadas en la presente memoria el "conjunto PET1073G12 de HCDR");
- 15 HCDR1 SEC ID N°: 13, HCDR2 SEC ID N°: 14, HCDR3 SEC ID N°: 15 (denominadas en la presente memoria el "conjunto PET1074B9 de HCDR");
- HCDR1 SEC ID N°: 23, HCDR2 SEC ID N°: 24, HCDR3 SEC ID N°: 25 (denominadas en la presente memoria el "conjunto PET1287A10 de HCDR").
- Un conjunto de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 puede tener secuencias seleccionadas de los siguientes conjuntos:
- 20 LCDR1 SEC ID N°: 8, LCDR2 SEC ID N°: 9, LCDR3 SEC ID N°: 10 (denominadas en la presente memoria el "conjunto PET1073G12 de LCDR");
- LCDR1 SEC ID N°: 18, LCDR2 SEC ID N°: 19, LCDR3 SEC ID N°: 20 (denominadas en la presente memoria el "conjunto PET1074B9 de LCDR");
- LCDR1 SEC ID N°: 28, LCDR2 SEC ID N°: 29, LCDR3 SEC ID N°: 30 (denominadas en la presente memoria el "conjunto PET1287A10 de LCDR").
- 25 El conjunto PET1073G12 de HCDR junto con el conjunto PET1073G12 de LCDR se denomina en la presente memoria el conjunto PET1073G12 de CDR. El conjunto PET1074B9 de HCDR junto con el conjunto PET1074B9 de LCDR se denomina en la presente memoria el conjunto PET1074B9 de CDR. El conjunto PET1287A10 de HCDR junto con el conjunto PET1287A10 de LCDR se denomina en la presente memoria el conjunto PET1287A10 de CDR. Un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR como se expone en la presente memoria puede comprender por separado un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR como se expone en el presente documento. Preferentemente, un dominio VH tal está emparejado con un dominio VL tal y, lo más preferentemente, los emparejamientos de dominios VH y VL son los mismos que en los clones como se explica en el presente documento.
- 30
- 35 Un dominio VH de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede contener un conjunto de HCDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en el cual el conjunto de HCDR se corresponde con el de para PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 con una o dos sustituciones de aminoácidos.
- Un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede comprender un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en el cual el conjunto de CDR se corresponde con el de para PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 con una o dos sustituciones de aminoácidos.
- 40
- Siguiendo el ejemplo de la química computacional en la aplicación de técnicas de análisis de datos multifactoriales para las relaciones de estructura/propiedad-actividad (Wold, y col. 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 de actividad cuantitativa-propiedad de anticuerpos pueden derivarse usando técnicas matemáticas muy conocidas tales como regresión estadística, reconocimiento de patrones y clasificación (Norman y col. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3ª edición (abril de 1998) ISBN: 0471170828; Abraham Kandel, Eric Backer. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR; (11 de mayo de 1995), ISBN: 0133418847; Wojtek Krzanowski. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, n° 22 (artículo)). Oxford Universidad Press; (diciembre de 2000), ISBN: 0198507089; Ian H. Witten, Eibe Frank. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (11 de oct. de 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 de 2002), ISBN: 0471490369; Arup K. Ghose, Vellarkad N. Viswanadhan. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and
- 45
- 50

Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8). Las propiedades de anticuerpos pueden derivarse de modelos empíricos y teóricos de secuencia de anticuerpos, estructuras funcionales y tridimensionales (por ejemplo, análisis de residuos probablemente de contacto o propiedad fisicoquímica calculada) y estas propiedades pueden considerarse individualmente y en combinación.

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

- 10 La relación secuencia-estructura puede usarse para la predicción de aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y de ahí en mantener la especificidad de unión. Estas predicciones pueden confirmarse por comparación de las predicciones con la salida de los experimentos de optimización de ejemplo. En un enfoque estructural puede crearse un modelo teórico de la molécula de anticuerpo (Chothia, y col. *Science*, 223,755-758 (1986)) usando cualquier paquete libremente disponible o comercial, tal como WAM (Whitelegg, N.R.u. y Rees, A. R (2000) *Prot. Eng.*, 12, 815-824). Después, un paquete de software de visualización y análisis de proteínas tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View (Guex, N. y Peitsch, M. C. *Electrophoresis* (1997) 18, 2714-2723) puede usarse para evaluar posibles sustituciones en cada posición en CDR y FR. Esta información puede luego usarse para hacer sustituciones que probablemente tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad. Las técnicas requeridas para hacer sustituciones en secuencias de aminoácidos de CDR, dominios VH o VL de anticuerpos y anticuerpos específicos están disponibles generalmente en la materia. Pueden hacerse secuencias de variantes, con sustituciones que pueden o pueden no ser predichas por tener un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad.

- 15 Por tanto, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede comprender 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 dos sustituciones en el conjunto de CDR. El conjunto relevante de CDR está previsto de regiones estructurales de anticuerpos u otros andamiajes de proteínas, por ejemplo, fibronectina o citocromo B. Preferentemente se emplean regiones estructurales de anticuerpos.

- 20 La cadena pesada de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede utilizar un gen de la familia V<sub>H</sub>1 humana. En diversos casos, la secuencia de aminoácidos de la región estructural de la cadena pesada contiene 1-12, preferentemente 3-12 y más preferentemente 3-8 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal del gen de la familia V<sub>H</sub>1 humana. En algunos casos, la secuencia de la región estructural de la cadena pesada es la secuencia de la línea germinal. En casos particularmente preferidos, la región estructural del 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. Algunos aspectos que utilizan un gen DP-10 humano tienen un aminoácido de la línea 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 humana con 1-5, 1-4, más preferentemente 1-3 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, la secuencia de la región estructural de la cadena ligera es la secuencia del gen de la familia V<sub>K</sub>3 humana de la línea germinal. En realizaciones particularmente preferidos, la región estructural para la cadena ligera puede ser DPK-22 humano (A27). En algunos de tales aspectos, el residuo 2 es un aminoácido de la línea no germinal. En algunas realizaciones, el residuo 2 es una treonina.

- 25 En una realización altamente preferida, un dominio VH está provisto de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, llamándose este "dominio VH de PET1073G12".

- 30 En algunas realizaciones, un dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7, llamándose este "dominio VL de PET1073G12". Un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  de ejemplo está compuesto por el dominio VH de PET1073G12, SEC ID N°: 2, y el dominio VL de PET1073G12, SEC ID N°: 7. Otro ejemplo está compuesto por el dominio VH de PET1074B9, SEC ID N°: 12, y el dominio VL de PET1074B9, SEC ID N°: 17. Otro ejemplo está compuesto por el dominio VH de PET1287A10, SEC ID N°: 22, y el dominio VL de PET1287A10, SEC ID N°: 27. Estos o cualquier otro sitio de unión a anticuerpo TGF- $\beta$  puede estar comprendido dentro de cualquier formato de molécula de anticuerpo deseado, por ejemplo, scFv, Fab, IgG1, IgG4, dAb etc., como se trata adicionalmente en otra parte en el presente documento. Otro ejemplo es una molécula de anticuerpo IgG4 que comprende el dominio VH de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, que preferentemente también comprende el dominio VL de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 correspondiente.

- 35 Otras IgG4 u otras moléculas de anticuerpo que comprenden el dominio VH de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, y/o el dominio VL de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, son otros ejemplos, ya que son otras moléculas de anticuerpo que comprenden el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de HCDR dentro de un dominio VH de anticuerpo, y/o el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de LCDR dentro de un

dominio VL de anticuerpo.

5 Un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que se une a las tres isoformas de TGF- $\beta$  humano. Un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  tal puede comprender el dominio VH y/o VL de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 o porciones de unión a antígeno de aquellos dominios. En algunos aspectos, un dominio VH de uno de los anteriores está emparejado con un dominio VL de uno de los anteriores para proporcionar un sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, el dominio VH de PET1073G12 (SEC ID N°: 2) puede estar emparejado con el dominio VL de PET1073G12 (SEC ID N°: 7), de manera que se forme un sitio de unión a antígeno que comprende tanto los dominios VH como VL de PET1073G12. En otro aspecto, el dominio VH de PET1074B9 (SEC ID N°: 12) está emparejado con el dominio VL de PET1074B9 (SEC ID N°: 17), de manera que se forma un sitio de unión a antígeno que comprende tanto los dominios VH como VL de PET1074B9. En otro aspecto, el dominio VH de PET1287A10 (SEC ID N°: 22) está emparejado con el dominio VL de PET1287A10 (SEC ID N°: 27), de manera que se forma un sitio de unión a antígeno que comprende tanto los dominios VH como VL de PET1287A10. En otros aspectos, un dominio VH de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 está emparejado con un dominio VL distinto del VL de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 correspondiente.

15 Similarmente, cualquier conjunto de HCDR expuesto en la presente memoria puede proporcionarse en un dominio VH que se usa como anticuerpo específico solo o en combinación con un dominio VL. Un dominio VH puede proporcionarse con un conjunto de HCDR como se expone en el presente documento, y si un dominio VH tal está emparejado con un dominio VL, entonces el dominio VL puede proporcionarse con un conjunto de LCDR expuesto en el presente documento. Un emparejamiento de un conjunto de HCDR y un conjunto de LCDR pueden ser como se expone en la presente memoria para los anticuerpos PET1073G12, PET1074B9 y PET1287A10. Las regiones estructurales de los dominios VH y/o VL pueden ser regiones estructurales de la línea germinal. Las regiones estructurales del dominio de la cadena pesada pueden seleccionarse de la familia VH-1, y una región estructural de V<sub>H-1</sub> preferida es la región estructural DP-10 o DP-88. Las regiones estructurales de la cadena ligera pueden seleccionarse de la familia V<sub>L-3</sub>, y una región estructural tal preferida es DPK-22.

25 Una o más CDR pueden tomarse de un dominio VH o VL de los que se ha expuesto la secuencia en la presente memoria e incorporado en una región estructural adecuada. Esto se trata en el presente documento. Lo mismo aplica para otras CDR y conjuntos de CDR de anticuerpos como se obtiene usando procedimientos descritos en el presente documento.

30 Un dominio VH de anticuerpo, un dominio VL de anticuerpo, un conjunto de HCDR, un conjunto de LCDR, un conjunto de CDR, una o más HCDR, por ejemplo, una HCDR3, y/o una o más LCR, por ejemplo, una LCDR3, pueden emplearse en un antagonista de TGF- $\beta$ .

Las variantes de los dominios VH y VL y CDR, que incluyen aquellas para las que las secuencias de aminoácidos se explican en el presente documento, y que pueden emplearse en anticuerpos específicos para TGF- $\beta$ , pueden obtenerse por medio de procedimientos de alteración o mutación y cribado de secuencias.

35 Las variantes de secuencias de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se han expuesto específicamente en la presente memoria pueden emplearse en los procedimientos expuestos en el presente documento. Variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de secuencias de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), pueden ser inferiores a aproximadamente 20 alteraciones, inferiores a aproximadamente 15 alteraciones, inferiores a aproximadamente 10 alteraciones o inferiores a aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 alteración. Las alteraciones pueden hacerse en una o más regiones estructurales y/o una o más CDR.

45 Un anticuerpo específico humano, humanizado, quimérico o sintético que compite o compite de forma cruzada por unirse a antígeno con cualquier anticuerpo específico que tanto se une al antígeno como comprende una región de unión a antígeno de anticuerpo específico, dominio VH y/o VL expuesto en el presente documento, conjunto de CDR o HCDR3 expuesto en el presente documento, o una variante de cualquiera de estos, puede usarse en los procedimientos expuestos en el presente documento. La competencia entre anticuerpos puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo, usando ELISA y/o marcando una molécula indicadora específica para un anticuerpo que puede detectarse en presencia de otro(s) anticuerpo(s) sin marcar para permitir la identificación de anticuerpos específicos que se unen al mismo epítipo o un epítipo solapante. La competencia cruzada entre anticuerpos puede ensayarse fácilmente ejecutando el ensayo inverso, por ejemplo, invirtiendo los anticuerpos marcados y sin marcar para identificar pares que bloquean la unión en ambas direcciones.

55 Un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo que compite o compite de forma cruzada con un molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, en particular scFv y/o IgG4 de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, puede usarse para antagonizar TGF- $\beta$ . En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o sintético. En otros aspectos puede usarse un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o sintético que compite o compite de forma cruzada con un sitio de unión a antígeno descrito en la presente memoria por unirse a TGF- $\beta$ , en el cual el sitio de unión a antígeno del anticuerpo humano, humanizado, quimérico o sintético está compuesto por un dominio VH y un dominio VL, y en el cual los dominios VH y VL comprenden un conjunto de CDR

como se expone en el presente documento.

Dada la información expuesta en el presente documento, en la materia están disponibles diversos procedimientos para preparar anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o sintéticos contra TGF- $\beta$  y que pueden competir o competir de forma cruzada con una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, una molécula de anticuerpo con un conjunto de HCDR de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de CDR, una molécula de anticuerpo con un conjunto de HCDR de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o una molécula de anticuerpo con un conjunto de LCDR de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, para su uso como un antagonista de TGF- $\beta$ .

Uno o más anticuerpos específicos que pueden unirse a TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, pueden obtenerse mediante un procedimiento que incluye ponerlos en contacto con una colección de anticuerpos y TGF- $\beta$ , y seleccionar uno o más anticuerpos específicos de la colección que pueden unirse a todos de dichos TGF- $\beta$ . La colección puede expresarse sobre la superficie de partículas de bacteriófago, conteniendo cada partícula ácido nucleico que codifica el dominio variable VH de anticuerpo expresado sobre su superficie, y opcionalmente también un dominio VL expresado si está presente. Tras la selección de anticuerpos específicos capaces de unirse al antígeno y expresarlo sobre partículas de bacteriófago, el ácido nucleico puede tomarse de una partícula de bacteriófago que expresa dicho anticuerpo específico seleccionado. Tal ácido nucleico puede usarse en la posterior producción de un anticuerpo específico o un dominio variable VH de anticuerpo (y opcionalmente un dominio variable VL de anticuerpo) por expresión de un ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de una partícula de bacteriófago que expresa dicho anticuerpo específico seleccionado.

Un dominio VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de anticuerpo de dicho anticuerpo específico seleccionado puede proporcionarse en forma aislada, como puede un anticuerpo específico que comprende un dominio VH tal. La capacidad para unir las tres isoformas de TGF- $\beta$  puede probarse adicionalmente, también la capacidad para competir o competir de forma cruzada con PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 (por ejemplo, en formato de scFv y/o formato de IgG, por ejemplo, IgG4) para unirse a las tres isoformas humanas de TGF- $\beta$ .

Un anticuerpo para su uso como antagonista de TGF- $\beta$  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 preferentemente IgG4, o con una afinidad que es superior a la de una de las moléculas anteriores. Un anticuerpo útil 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 preferentemente IgG4 PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o con una potencia que es mayor que la de una de las moléculas anteriores.

Un anticuerpo para su uso como antagonista de TGF- $\beta$  puede neutralizar TGF- $\beta$  que se produce naturalmente con la potencia de una molécula de anticuerpo PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, por ejemplo, scFv, o preferentemente IgG4, o con una potencia que es superior a la de una de las moléculas anteriores. La afinidad de unión y potencia de neutralización de diferentes anticuerpos específicos pueden compararse bajo condiciones apropiadas.

Un anticuerpo para su uso como un antagonista de TGF- $\beta$  incluye anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o sintéticos que pueden neutralizar TGF- $\beta$  que se produce naturalmente con una potencia que es igual a o superior a la potencia de un sitio de unión a antígeno de TGF- $\beta$  formado por el dominio VH de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 y el dominio VL de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 correspondiente.

Además de secuencias de anticuerpos, un anticuerpo para su uso como antagonista de TGF- $\beta$  puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional, además de la capacidad para unirse a antígeno. Los anticuerpos específicos pueden llevar una marca detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto o enzima que elige diana (por ejemplo, mediante un enlace peptídico o ligador).

Un anticuerpo de unión a antígeno comprende un sitio de unión a antígeno. Un sitio de unión a antígeno también puede proporcionarse por medio de disposición de CDR sobre andamiajes de proteínas de no anticuerpo tales como fibronectina o citocromo B, etc. Koide y col., (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284:1141-1151; Nygren y col. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 7:463-469). Los andamiajes para manipular sitios de unión novedosos en proteínas han sido revisados en detalle por Nygren y col., arriba. Los andamiajes de proteínas para imitadores de anticuerpos se exponen en el documento WO 00/34784, que describe proteínas (imitadores de anticuerpos) que incluyen un dominio tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un andamiaje adecuado en el que injertar una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR, puede proporcionarse con cualquier miembro del dominio de la superfamilia del gen inmunoglobulina. El andamiaje puede ser una proteína humana o no humana.

Una ventaja de un andamiaje de proteínas de no anticuerpo es que 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. El pequeño tamaño de un anticuerpo puede conferir propiedades fisiológicas útiles tales como una

capacidad para entrar en células, penetrar profundamente en tejidos o alcanzar dianas dentro de otras estructuras, o para unirse dentro de cavidades de proteína del antígeno diana.

5 Son típicas las proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles está mutada específica o aleatoriamente para crear un sitio de unión a antígeno que tiene especificidad por unirse al antígeno diana. Tales proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranelectina, fibronectina (por ejemplo, 10<sup>o</sup> dominio tipo III de la fibronectina) y lipocalinas. Otros enfoques incluyen "Microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), que se basan en ciclótidos--proteínas pequeñas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares.

10 Además de las secuencias de anticuerpos y/o un sitio de unión a antígeno, un anticuerpo puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional, además de capacidad para unirse a antígeno. Los anticuerpos pueden llevar una marca detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto o enzima que elige diana (por ejemplo, mediante un ligador o enlace peptídico). Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático), además de un sitio de unión a antígeno, en el cual el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y, por tanto, elige como diana el sitio catalítico para el antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

15 Aunque, como se ha observado, las CDR pueden ser llevadas por andamiajes, tales como fibronectina o citocromo B (Haan & Maggos, 2004 BioCentury, 12(5): A1-A6; Koide y col., arriba; Nygren y col., arriba), la estructura para llevar una CDR o un conjunto de CDR será generalmente de una secuencia de la cadena pesada o ligera del anticuerpo o porción sustancial de la misma en la que la CDR o conjunto de CDR está localizada en una localización correspondiente a la CDR o conjunto de CDR de dominios variables del anticuerpo VH y VL que se producen naturalmente codificados por genes inmunoglobulina reorganizados. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, y col., 1987, y actualizaciones del mismo, ahora disponible en internet (URL: [immuno.bme.nwu.edu](http://immuno.bme.nwu.edu) o buscar "Kabat" usando cualquier buscador).

20 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químicas que retengan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar unir ADN que codifica una región variable de inmunoglobulina con una región constante, o introducir las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo en la región constante más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y un gran conjunto de bibliografía posterior. Un híbrido u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden o pueden no alterar la especificidad de unión de anticuerpos producidos.

25 Técnicas adicionales disponibles en la materia de manipulación de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden prepararse híbridos humanos como se describe por Kontermann y col. (Kontermann R y Dubel Stefan; *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545). La expresión en fago, otra técnica establecida para generar anticuerpos, se ha descrito en detalle en muchas publicaciones, tales como Kontermann y col., arriba, y el documento WO 92/01047 (tratado adicionalmente más adelante). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón se inactivan y se sustituyen funcionalmente con genes de anticuerpos humanos a la vez que quedan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón pueden usarse para aislar anticuerpos humanos para antígenos humanos (Mendez y col., 1997). Los anticuerpos humanos, tanto monoclonales como policlonales, también pueden prepararse en otros animales transgénicos tales como cabras, vacas, ovejas, conejos, etc.

30 Las moléculas de anticuerpo sintéticas creadas por expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo, como se describe por Knappik y col., arriba y col., *Journal of Immunological Methods*, 254:67-84 (2001), pueden usarse como antagonistas de TGF- $\beta$ .

35 Los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E. S. y col., *Nature* 341, 544-546 (1989), McCafferty y col. (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 ligados; (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las cuales un dominio VH y un dominio VL están ligados por un ligador peptídico que permite que se asocien dos dominios para formar un sitio de unión a antígeno (Bird y col., *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85, 5879-5883; 1998; (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09665); y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión de genes (documento WO/13804); F. Holliger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993). Las moléculas de Fv, scFv o de diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Y. Reiter y col., *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996). También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu y col., *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996).

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un fragmento de unión a antígeno monomérico pequeño de un anticuerpo, concretamente la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt y col., 2003). dab de VH se producen naturalmente en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando linfocitos B específicos para antígeno y clonando directamente genes dAb de linfocitos B individuales. Los dAb también son producibles en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad a la temperatura los hace particularmente fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración por afinidad. Un anticuerpo puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se explica en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente como se explica en el presente documento.

Si van a usarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales que pueden fabricarse en una variedad de formas (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), por ejemplo, prepararse químicamente o a partir de híbridos híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos de la tecnología BiTE™ en la que pueden usarse los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad y ligarse directamente mediante péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos sobre una única cadena de polipéptidos corta. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo posiblemente los efectos de reacción antiidiotípica.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, también puede ser particularmente útiles debido a que pueden construirse fácilmente y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando expresión en fago (documento WO94/13804) de colecciones. Si una rama del diacuerpo va a mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra TGF-β, entonces puede prepararse una colección en la que la otra rama se varía y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos completos biespecíficos pueden prepararse por manipulación de botones en ojales (C. E. B. Ridgeway y col., Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

Los anticuerpos pueden estar glucosilados, tanto naturalmente como por sistemas de diversas células eucariotas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden estar sin glucosilar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procarionota). La glucosilación también puede alterarse intencionadamente, por ejemplo, inhibiendo la fucosilación, aumenta la actividad de ADCC del anticuerpo resultante. Por consiguiente, los anticuerpos pueden expresarse de forma que se minimice o elimine la fucosilación.

En algunos aspectos, la CDR o dominio VH o VL será tanto idéntica como altamente similar a las regiones especificadas de las que la secuencia se presenta en el presente documento. Se contempla que puedan hacerse 1 a 5, preferentemente de 1 a 4 o 1 o 2, o 3 o 4, sustituciones de aminoácidos en la CDR y/o dominios VH o VL. Los dominios VH o VL y CDR y conjuntos de CDR que son altamente similares a aquellos para los que se facilitan las secuencias en la presente memoria están englobados por aspectos como son aquellos con secuencias que son sustancialmente como se explican en el presente documento.

La estructura para llevar una CDR o un conjunto de CDR será generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo o porción sustancial de la misma en la que la CDR o conjunto de CDR se localiza en una localización correspondiente a la CDR o conjunto de CDR de dominios variables del anticuerpo VH y VL que se producen naturalmente codificados por genes de inmunoglobulina reorganizados. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, E. A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos. 1987, y actualizaciones del mismo, ahora disponible en internet (URL: [immuno.bme.nwu.edu](http://immuno.bme.nwu.edu) o buscar "Kabat" usando cualquier buscador). Las CDR se definen según Kabat y col. Las CDR también puede ser llevadas por otros andamiajes, tales como fibronectina o citocromo B.

Preferentemente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente como se explica en la presente memoria es llevada como una CDR en un dominio variable humano o una porción sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente como se explican en la presente memoria representan realizaciones preferidas y se prefiere que cada una de estas sea llevada como una HCDR3 en un dominio variable de la cadena pesada humana o una porción sustancial del mismo.

Los dominios variables empleados pueden obtenerse o derivarse de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Una secuencia de CDR (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carece de una CDR (por ejemplo, CDR3) usando tecnología de ADN recombinante. Regiones estructurales de la línea germinal preferida ya se han identificado en el presente documento.

Marks y col. (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) describen procedimientos de producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable se usan conjuntamente con cebadores consenso para la tercera región estructural de genes de VH

humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables  $V_{\kappa}$  que carece de una CDR2. Marks y col. describen adicionalmente cómo este repertorio puede combinarse con una CDR2 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 pueden reorganizarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos reorganizados combinarse con un dominio VL o VH relacionado para proporcionar anticuerpos. Después, el repertorio puede expresarse en un sistema huésped adecuado, tal como el sistema de expresión en fago del documento WO92/01047 o cualquiera de un gran conjunto de bibliografía posterior, que incluye Kay, B. K., Winter, J., y McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press, de manera que puedan seleccionarse anticuerpos adecuados. Un repertorio puede consistir en de  $10^4$  miembros individuales hacia arriba, por ejemplo, de  $10^6$  a  $10^8$  ó  $10^{10}$  miembros. Otros sistemas huésped adecuados incluyen expresión en levadura, expresión bacteriana, expresión en T7, expresión en ribosomas, expresión covalente, etc.

Técnicas de reorganización o combinatorias análogas también se exponen por Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), que describe la técnica en relación con un gen  $\beta$ -lactamasa, pero observa que el enfoque puede usarse para la generación de anticuerpos.

Otra alternativa es generar regiones VH o VL novedosas que llevan CDR derivadas usando mutagénesis aleatorias de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable entero. Una técnica tal se describe por Gram y col., (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), que usó PCR propensa a error. En realizaciones preferidas, una o dos sustituciones de aminoácidos se hacen dentro de un conjunto de HCDR y/o LCDR. Otro procedimiento que puede usarse es dirigir mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL. Tales técnicas se exponen por Barbas y col., (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) y Schier y col., (J. Mol. Biol. 263:551-567). Dada la divulgación proporcionada en el presente documento, el experto podrá usar tales técnicas para obtener anticuerpos adicionales usando metodología rutinaria en la materia. El dominio VH de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 puede someterse a mutación para proporcionar una o más variantes de secuencia de aminoácidos del dominio VH que pueden combinarse con uno o más dominios VL.

El dominio VH puede tener una secuencia de la línea germinal, y en realizaciones preferidas es DP-10 o DP-88. Una secuencia del dominio VL puede tener una secuencia de la línea germinal, y en realizaciones preferidas es DPK-22. Puede emplearse una o más de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de HCDR, y/o una o más de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10, o el conjunto PET1073G12, PET1074B9 o PET1287A10 de LCDR.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones estructurales intervinientes. Preferentemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50% de cualquiera o ambas de la primera y cuarta regiones estructurales, siendo el 50% el 50% del extremo C terminal de la primera región estructural y el 50% del extremo N terminal de la cuarta región estructural. Residuos adicionales en el extremo N terminal o extremo C terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos normalmente no asociados a regiones de dominios variables que se producen naturalmente. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos hecha por técnicas de ADN recombinante puede producir la introducción de residuos del extremo N o C terminal codificados por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de ligadores para unir dominios variables con secuencias de proteínas adicionales que incluyen cadenas pesadas de la inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcas de proteínas.

Se prefieren anticuerpos que comprenden un par de dominios VH y VL, también pueden usarse dominios de unión individuales basados en cualquier secuencia de los dominio VH o VL. Se sabe que dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente dominios VH, pueden unir antígenos diana de un modo específico. En el caso de cualquiera de los dominios de unión específica unitarios, estos dominios pueden usarse para cribar dominios complementarios que pueden formar un anticuerpo de dos dominios que puede unirse a las tres isoformas de TGF- $\beta$  humano.

Esto pueden lograrse por procedimientos de cribado de expresión en fago usando el llamado enfoque combinatorio dual jerárquico como se expone en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene tanto un clon de la cadena H como L se usa para infectar una colección completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el anticuerpo de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de expresión en fago tales como aquellas descritas en esa referencia.

Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C terminal a los dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo que incluyen cadenas  $C_{\kappa}$  o  $C_{\lambda}$  humanas, preferentemente cadenas  $C_{\kappa}$ . Similarmente, un anticuerpo basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C terminal a toda o parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de la inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1 e IgG4. Se prefiere IgG4. IgG4 se prefiere para algunas aplicaciones debido a que no se une al complemento y tiene funciones efectoras reducidas. Si se desea función efectora, se prefiere IgG1. La función efectora también puede aumentarse manipulando el estado de glucosilación del anticuerpo, tal como disminuyendo el contenido de fucosa mediante procedimientos que se



conocen en la técnica. La cadena pesada puede o puede no tener un residuo de lisina del extremo C terminal. Cualquier variante de la región sintética u otra constante que tenga estas propiedades y establezca regiones variables también puede usarse en algunas realizaciones.

5 Pueden ser útiles las preparaciones heterogéneas de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de las mismas. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y anticuerpos con cadenas pesadas que carecen de la lisina del extremo C terminal, con diversos grados de glucosilación, con aminoácidos derivatizados, tales como ciclación de un ácido glutámico del extremo N terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico y/o con formas desamidadas de la cadena pesada o ligera.

10 Las composiciones que comprenden anticuerpos TGF- $\beta$  pueden administrarse a individuos en necesidad de las mismas, preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser al menos mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno particular. La cantidad real administrada, y velocidad y transcurso del tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que está tratándose. La prescripción de tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., puede determinarse basándose en estudios preclínicos y clínicos cuyo diseño está perfectamente dentro del nivel del experto en la materia.

15 Los anticuerpos pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, subcutáneamente, intravenosamente, intracavitariamente (por ejemplo, después de resección de tumor), intralesionalmente, intraperitonealmente o intramuscularmente), por inhalación o tópicamente (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas, sobre la piel), o por vía oral. La vía de administración puede determinarse por las características fisicoquímicas del producto, por consideraciones especiales para la enfermedad, por dosis o intervalo de dosis o por el requisito para optimizar la eficacia o para minimizar efectos secundarios.

Se prevé que el tratamiento con anti-TGF- $\beta$  no necesite limitarse a la administración por profesionales sanitarios. Por tanto, la inyección subcutánea, especialmente usando un dispositivo sin aguja, puede ser apropiada.

25 La dosis precisa dependerá de varios factores que incluyen la afección y el historial médico del paciente, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marca detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 100  $\mu$ g a 1 g para aplicaciones sistémicas y de 1  $\mu$ g a 1 mg para aplicaciones tópicas. Normalmente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, preferentemente el isotipo IgG4. Esto es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular y actividad. Los tratamientos pueden repetirse diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, mensualmente u otros intervalos, a discreción del médico.

30 Los anticuerpos normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo. Las composiciones farmacéuticas para su uso en procedimientos para tratar IAM pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante farmacéuticamente aceptable u otros materiales farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. Tales materiales podrían incluir, por ejemplo, todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, 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, además de combinaciones de los mismos. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. 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 aumentan el periodo de almacenamiento o eficacia del anticuerpo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, tópica, por inhalación o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa. En una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

35 Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquida, 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 generalmente comprenden un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. El anticuerpo (y otros componentes, si se desea) también puede involucrarse en una cápsula de gelatina de cubierta blanda o dura, comprimirse en forma de comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, el principio activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. La administración de un compuesto por administración distinta de parenteral puede ser necesaria para recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un

material para prevenir su inactivación.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pK, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos con experiencia relevante en la materia pueden preparar bien disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer y/o inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente como secuencialmente, dependiendo de la afección que vaya a tratarse.

Los anticuerpos pueden formularse 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 previsto de administración, aplicación terapéutica, las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la vía de administración. 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 pueden producirse, por ejemplo, por liofilización, secado por pulverización o secado por tecnología de fluidos supercríticos.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el anticuerpo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de las mismas. La fluidez apropiada de una disolución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse incluyendo 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 puede prepararse con un vehículo que protegerá el anticuerpo contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

En diversas realizaciones, otras pautas terapéuticas pueden combinarse con la administración de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ . La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en las cuales preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Para la prevención o el tratamiento de consecuencias de infarto de miocardio, la dosificación apropiada de un antagonista de TGF- $\beta$  dependerá de la afección del paciente, la gravedad y la evolución del infarto, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico responsable. El antagonista puede administrarse al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos que se inician durante el día 0 (por ejemplo, en el plazo de aproximadamente 8, 12 o 24 horas), día 1, día 2, día 3, día 4 o día 5 después de un evento isquémico, preferentemente en el día 0, día 3 o día 5. La administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza en el plazo de aproximadamente 120 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 48 horas, en el plazo de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 12 horas o incluso en el plazo de aproximadamente 8 o menos horas desde la aparición de isquemia aguda miocárdica. Dependiendo del tipo y gravedad de la afección, aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como por infusión continua después del IM. Una dosificación diaria típica podría ser igual a 5 mg/kg o menos, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es mantenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. La dosificación preferida del anticuerpo será 5 mg/kg o menos administrada intravenosamente. Por tanto, una o más dosis de aproximadamente 5 mg/kg o menos (o cualquier combinación de las mismas) puede administrarse al paciente. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia es fácilmente

monitorizado por técnicas y ensayos convencionales.

Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  son útiles para tratar IAM cuando se combinan con antagonistas del sistema de renina-angiotensina-aldosterona que incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de renina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de receptores de Ang II (también conocidos como bloqueantes de receptores de "Ang II") y antagonistas de aldosterona. Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  también son útiles para tratar IAM cuando se combinan con antagonistas del sistema beta-adrenérgico que incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste en alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol y nebivolol. Además, los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  son útiles para tratar IAM cuando se combinan con agentes de control de lípidos que incluyen, pero no se limitan a, el grupo de estatinas que consiste en lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, resuvastatina, el grupo de secuestrantes de ácidos biliares que consiste en colestiramina, celestipol, colesevalam, el grupo de ácidos fibróticos que consiste en gemfibrozilo, fenofibrato, clofibrato, el grupo que incluye ácido nicotínico y niaspan, el grupo que incluye el agente hipocolesterolemizante ezetimiba y la combinación de ezetimiba y simvastatina. En otro aspecto, los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  son útiles para tratar IAM cuando se combinan con agentes antiplaquetarios/anticoagulantes que incluyen, pero no se limitan a aspirina, el grupo de inhibidores de receptores de ADP que consiste en clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, ticlopidina y el anticoagulante warfarina.

Las formulaciones terapéuticas de anticuerpos usados en el tratamiento pueden proporcionarse en un recipiente disponible para tratamiento intravenoso. Las formulaciones también pueden prepararse para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales que incluyen, pero no se limitan a, aquellos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) y en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos; y/o tensoactivos no iónicos.

La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose. Preferentemente, los compuestos con actividades complementarias no se afectan adversamente entre sí. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además una citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, fármaco que elige TGF- $\beta$  como diana, agente antiangiogénico y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

"Citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citocinas están incluidas hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glucoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Un "cardioprotector" es un compuesto o composición que previene o reduce la disfunción miocárdica (es decir, cardiomiopatía y/o insuficiencia cardíaca congestiva) asociada a la administración de un fármaco, tal como un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ , a un paciente. El cardioprotector puede, por ejemplo, bloquear o reducir un efecto cardiotoxico mediado por radicales libres y/o prevenir o reducir la lesión por estrés oxidativo.

Los principios activos también pueden envolverse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de

5 coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se exponen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

10 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de  $\gamma$ -etilo, etilenoacetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

15 Puede proporcionarse un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de IM como se ha descrito anteriormente, que generalmente comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Un "prospecto" comprende instrucciones normalmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos.

20 Recipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, botellas, viales, bolsas de disolución IV, recipientes, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para la inhibición de la señalización de TGF- $\beta$  y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo en la composición puede ser un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ . La etiqueta o prospecto puede indicar que la composición se usa para tratar infarto de miocardio, infarto agudo de miocardio, o la reducción de una consecuencia de infarto de miocardio. En una realización, la etiqueta o prospecto indica que la composición que comprende el anticuerpo puede administrarse durante la fase aguda de un infarto de miocardio.

25 Además, el artículo de fabricación puede comprender un recipiente que comprende una composición de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  y un agente terapéutico distinto del anticuerpo. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones pueden usarse en combinación para tratar un infarto de miocardio. Este agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias auxiliares descritas en la sección precedente (por ejemplo, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o un regulador de la función inmunitaria en un mamífero, que incluye una citocina). Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

30 Por conveniencia, los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  pueden proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones. Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis). Particularmente, los anticuerpos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que con la disolución proporcionarán una disolución que tiene la concentración apropiada.

35 Además de los procedimientos descritos en el compendio y la descripción detallada anterior, se expone también lo siguiente. Un procedimiento para tratar un paciente que padece infarto de miocardio, infarto agudo de miocardio o de reducción de consecuencias adversas de un infarto agudo de miocardio en un paciente puede comprender administrar un antagonista de TGF- $\beta$  a un paciente durante la fase aguda del infarto de miocardio. El antagonista de TGF- $\beta$  puede seleccionarse de un grupo que consiste en: un anticuerpo o proteína que comprende un fragmento de anticuerpo dirigido contra una o más isoformas de TGF- $\beta$ ; un receptor de TGF- $\beta$ ; un anticuerpo o proteína que comprende un fragmento de anticuerpo dirigido contra uno o más receptores de TGF- $\beta$ ; péptido asociado a latencia; TGF- $\beta$  latente grande, un proteoglicano que inhibe TGF- $\beta$ ; somatostatina; manosa-6-fosfato; manosa-1-fosfato; prolactina; factor de crecimiento similar a la insulina II; IP-10; un péptido que contiene arg-gly-asp; un extracto vegetal, fúngico o bacteriano; un oligonucleótido de ARN antisentido o interferente; y una proteína que participa en la señalización de TGF- $\beta$ .

40 En realizaciones preferidas, el antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  humanizado o un fragmento o sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ . El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede unirse a y neutralizar más de una isoforma de TGF- $\beta$ . El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico que comprende una porción de unión a TGF- $\beta$  y una porción restante, comprendiendo dicha porción de unión a TGF- $\beta$  la porción de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal 1D11.16, y la porción restante derivada de uno o más anticuerpos humanos. Un anticuerpo que está dirigido contra más de una isoforma de TGF- $\beta$

puede ser una forma humana o humanizada del anticuerpo monoclonal 1D11.16. El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que neutraliza TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 humano.

La administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede comenzar en el plazo de aproximadamente 120, aproximadamente 80, aproximadamente 72, aproximadamente 48 o aproximadamente 24 horas desde la aparición de isquemia aguda miocárdica. En algunos casos, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza en el plazo de aproximadamente 12 horas desde la aparición de isquemia aguda miocárdica. La administración del antagonista de TGF- $\beta$  puede comenzar antes de la infiltración sustancial de macrófagos y mononuclear de tejido afectado por el infarto de miocardio. En otros casos, la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por infiltración neutrófila de tejido afectado por el infarto de miocardio. Además, en algunos casos la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por necrosis de tejido afectado por el infarto de miocardio.

El procedimiento también puede comprender administrar un compuesto que puede restaurar selectivamente una función deseable de TGF- $\beta$  a un paciente diagnosticado con un infarto agudo de miocardio durante la fase aguda del infarto de miocardio, por ejemplo, un fármaco antiinflamatorio y/o un antagonista de TNF- $\alpha$ . El procedimiento puede usarse en medicina humana y veterinaria de manera que el paciente puede ser un mamífero humano o no humano.

Con respecto al antagonista de TGF- $\beta$ , en algunos aspectos el antagonista es un anticuerpo que neutraliza TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 humano y comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, en el cual dicho dominio de unión a antígeno comprende un conjunto de CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y en el cual dicho dominio de unión a antígeno utiliza un gen de la familia VH1 humana y en el cual dicha HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 25. El gen de la familia VH1 humana puede ser un gen VH1-2 humano, que en algunos casos pueden ser un gen DP-10 o DP-88. El dominio de unión a antígeno puede comprender además un conjunto de CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y en el cual dicho dominio de unión a antígeno utiliza un gen de la familia V $\kappa$ 3 humana y en el cual dicha LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 20 y SEC ID N°: 30. Las HCDR3 y LCDR3 pueden seleccionarse del grupo que consiste en: (a) SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 10, respectivamente; (b) SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 20, respectivamente; y (c) SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 30, respectivamente.

El gen de la familia V $\kappa$ 3 humana puede ser un gen DPK22 de V $\kappa$  humano. Las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH pueden estar comprendidas dentro de una región estructural de la cadena pesada de la línea germinal, o las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH están dentro de una región estructural que comprende hasta 12 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio V $\kappa$  puede estar comprendidas dentro de una región estructural de la cadena pesada de la línea germinal. En algunos casos, las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio V $\kappa$  pueden estar dentro de una región estructural que comprende hasta 5 mutaciones de la secuencia de aminoácidos V $\kappa$  de la línea germinal.

El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que neutraliza TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 humano, y comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, en el cual dicho dominio de unión a antígeno utiliza un gen DP-10 de VH humano o un gen DP-88 de VH humano y comprende una secuencia de aminoácidos de FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos en SEC ID N°: 31. El dominio de unión a antígeno puede utilizar un gen DP-10 de VH humano o un gen DP-88 de VH humano, y comprende un conjunto de CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el cual dicha HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 25, y comprende además una secuencia de aminoácidos de FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos en SEC ID N°: 31. El dominio de unión a antígeno puede utilizar adicionalmente un gen de la familia V $\kappa$ 3 humana y un gen J $\kappa$ 5 humano. Un dominio de unión a antígeno que utiliza un gen de la familia V $\kappa$ 3 humana y un gen J $\kappa$ 5 humano puede comprender un conjunto de CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el cual dicha LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 20 y SEC ID N°: 30.

En algunos aspectos, el antagonista de TGF- $\beta$  neutraliza TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 humano, y comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, en el cual dicho dominio de unión a antígeno comprende: (a) la HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5; (b) la HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13, HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 15; o (c) la HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23, HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24, HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25. El dominio de unión a antígeno puede comprender además un dominio VL de anticuerpo. El dominio de unión a antígeno puede comprender LCDR seleccionadas del grupo que consiste en: (a) la LCDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8, LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9, LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; (b) la LCDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18, LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19, LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20; y (c) la LCDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28, LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29, LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30. En algunos casos, las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH pueden estar comprendidas dentro de una región estructural de la cadena pesada de la línea germinal, por ejemplo, una región

estructural de la familia VH1 humana. Las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio VH puede estar dentro de la región estructural de la cadena pesada humana de la línea germinal VH1 DP-10 o DP-88. Las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio VL pueden estar dentro de una región estructural de la cadena ligera de la línea germinal. La región estructural de la cadena ligera de la línea germinal puede ser una región estructural de la familia V $\kappa$ 3 humana. El dominio de unión a antígeno puede comprender además un gen J $\kappa$ 5 humano. El gen de la familia V $\kappa$ 3 humana puede ser un gen DPK22 de V $\kappa$ .

En algunas variaciones, el antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VH de PET1073G12 (SEC ID N $^{\circ}$ : 2) con hasta 5 mutaciones, o una porción de unión a antígeno del mismo. El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VH de PET1074B9 (SEC ID N $^{\circ}$ : 12) con hasta 5 mutaciones, o una porción de unión a antígeno del mismo. El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VL de PET1073G12 (SEC ID N $^{\circ}$ : 7) con hasta 5 mutaciones, o una porción de unión a antígeno del mismo. El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VL de PET1074B9 (SEC ID N $^{\circ}$ : 17) con hasta 5 mutaciones, o una porción de unión a antígeno del mismo. El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VL de PET1287A10 (SEC ID N $^{\circ}$ : 27) con hasta 5 mutaciones, o una porción de unión a antígeno del mismo. El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VH de PET1073G12 (SEC ID N $^{\circ}$ : 2) y el dominio VL de PET1073G12 (SEC ID N $^{\circ}$ : 7). El antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VH de PET1074B9 (SEC ID N $^{\circ}$ : 12) y el dominio VL de PET1074B9 (SEC ID N $^{\circ}$ : 17). Como alternativa, el antagonista de TGF- $\beta$  puede ser un anticuerpo que comprende el dominio VH de PET1287A10 (SEC ID N $^{\circ}$ : 22) y el dominio VL de PET1287A10 (SEC ID N $^{\circ}$ : 27). También se contemplan más variaciones como se describen en el presente documento.

Los SEC ID N $^{\circ}$  se refieren a las secuencias encontradas en el listado de secuencias adjunto que forma parte de esta divulgación. Además, los siguientes ejemplos se presentan como ilustraciones de aspectos de los procedimientos y no deben interpretarse como limitantes.

#### **EJEMPLO 1- Purificación de anticuerpos**

Anticuerpos monoclonales 1D11 y GC 1008 se purificaron tanto de sobrenadante de cultivo como de ascitis por cromatografía de proteína A-Sepharose (Goding, J Immunol Meth (1976) 42;17) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). La unión de los anticuerpos monoclonales de subclase gamma ( $\gamma$ )1 y de subclase gamma ( $\gamma$ )4, 1D11 y GC 1008, a proteína A se potenció mediante la adición de un tampón de unión comercialmente preparado (BioRad, Richmond, Calif.). Los anticuerpos se eluyeron de la proteína A-Sepharose con glicina 0,05 M-HCl más tampón NaCl 0,15 M (pH 2,3), se dializaron durante la noche frente a PBS y tampón NaCl (pH 2,3), se dializaron durante la noche frente a PBS y se almacenaron a -20 grados Celsius. Los anticuerpos de subclase gamma ( $\gamma$ ) 1 y gamma ( $\gamma$ ) 4 purificados de sobrenadantes se concentraron y se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato de amonio (saturado al 50%) antes de la cromatografía de proteína A.

#### **EJEMPLO 2 – Efecto de un inhibidor de TGF- $\beta$ en un modelo de rata de reperusión de isquemia cardíaca**

Ratas Lewis hembra de doce a catorce semanas de edad se asignaron a cinco grupos de tratamiento. En el día 0 (D0), todos los animales se sometieron a isquemia cardíaca seguida de procedimiento de reperusión (I/R). La isquemia cardíaca se creó ligando temporalmente la arteria coronaria descendente anterior izquierda sobre el ventrículo izquierdo del corazón durante 60 minutos. Después se soltó la ligación permitiendo la reperusión de la parte isquémica del corazón. A partir de 3 o 5 días tras I/R se administraron 5 mg/kg de 1D11 o artículo de control (anticuerpo de control negativo 13C4 o vehículo) por inyección intravenosa (IV) y luego se readministró cada tres días hasta el día 28.

Con el fin de analizar el área en riesgo (AER), microesferas de 15  $\mu$ m de diámetro se marcaron con un fluorocromo amarillo y se inyectaron en el ventrículo izquierdo del corazón inmediatamente antes de soltar la ligación temporal de la arteria coronaria descendente izquierda (D0). Las microesferas se distribuyeron homogéneamente en la sangre y se alojaron en capilares del corazón y otros órganos y tejidos. El AER en el corazón se definió como el área de tejido miocárdico que no recibió ninguna microesfera (o sangre) durante el periodo de ligación. El día 28, el animal se anestesió ligeramente con isoflurano y la frecuencia cardíaca se mantuvo a 350  $\pm$  50 lpm. Posteriormente se realizó una ecocardiografía en la vista de eje largo con el fin de evaluar la función cardíaca regional y global. Tras el examen de la ecocardiografía, el animal se sacrificó con una sobredosis de pentobarbital sódico. Después, el corazón se extirpó para análisis histológico.

El AER se evaluó y posteriormente se asignó una puntuación cualitativa. Los animales con AER pequeña (<~20% del VI) o sin AER se eliminaron del análisis del estudio. La fibrosis cardíaca en el VI se evaluó histológicamente y usando el peso del corazón y se expresó como un porcentaje de peso de fibrosis/peso de VI total. A continuación, la función cardíaca regional se evaluó por una evaluación del engrosamiento de la pared anterior (EPA) y en comparación con el engrosamiento de la pared posterior (EPP) en el área en riesgo. El engrosamiento de la pared es la diferencia en el espesor de pared en la sístole y el espesor de pared en la diástole. La función global también

se evaluó por evaluación de la fracción expulsada (FE) y el acortamiento fraccional (AF).

Las observaciones clínicas visuales diarias fueron comunes y corrientes durante toda la duración del estudio. En la Figura 1, la administración de 1D11 redujo notablemente el porcentaje de fibrosis en el VI en comparación con el vehículo y el anticuerpo de control negativo, 13C4. Esta disminución en la fibrosis se produjo tanto si el tratamiento con 1D11 empezó 3 días después de I/R (D3) [1D11-D3] como 5 días después de I/R (D5) [1D11-D5]. El grupo que empezó el tratamiento de 1D11 en D5 alcanzó significancia estadística ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo tratado con 13C4 de control.

Los parámetros de la función cardíaca se evaluaron por ecocardiografía 4 semanas tras I/R, como se observa en la Tabla 1. La fracción expulsada y el acortamiento fraccional representan la función cardíaca global. EPA, EPP y EPA/EPP (puntuación de movimiento de la pared regional) representan la función cardíaca regional. En el roedor normal, EPA es aproximadamente igual a, y puede ser mayor que, EPP. Después, de esto resulta que la relación de EPA/EPP, que los presentes inventores han llamado puntuación de movimiento de la pared regional, en un animal normal sería  $\geq 1$ . En la Tabla 1, el grupo de animales normales mostró EPA superior a EPP, y puntuación de movimiento de la pared regional (EPA/EPP) de  $1,7 \pm 0,2$ .

Tabla 1

Resultados de ecocardiografía a las 4 semanas					
	Vehículo	1D11 – D3	1D11 – D5	13C4	Normal
Facción expulsada (%)	61,3 $\pm$ 3,4	57,1 $\pm$ 2,9	59,9 $\pm$ 3,8	66,3 $\pm$ 2,7	83,9 $\pm$ 0,7
Acortamiento fraccional (%)	27,7 $\pm$ 2,0	24,9 $\pm$ 1,7	27,1 $\pm$ 2,3	30,9 $\pm$ 2,0	45,9 $\pm$ 0,7
EPA (cm)	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,13	0,07 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,004
EPP (cm)	0,097 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01+	0,07 $\pm$ 0,01+	0,1 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,004
EPA/EPP	0,51 $\pm$ 0,2	0,91 $\pm$ 0,20	1,01 $\pm$ 0,15	0,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2

+  $p < 0,05$  frente a 13C4

4 semanas tras I/R, la función cardíaca en todos los grupos que se sometieron a I/R fue inferior a la observada en el grupo de animales normales. EPA y EPP fueron similares en los grupos 1D11-D3 y 1D11-D5 (Tabla 1 y Figura 2) y las puntuaciones de movimiento de la pared regional fueron 0,91  $\pm$  0,2 y 1,01  $\pm$  0,15 en los grupos 1D11-D3 y 1D11-D5, respectivamente (Tabla 1 y Figura 3). Se observó adicionalmente que las puntuaciones de movimiento de la pared regional fueron compatibles con alteración mínima en la región funcional en comparación con un valor de animal normal de  $\geq 1$ . A diferencia, EPA es notablemente inferior a EPP en los grupos de 13C4 de control negativo y de vehículo (Tabla 1 y Figura 2) y puntuaciones de movimiento de la pared regional fueron 0,7  $\pm$  0,1 y 0,51  $\pm$  0,2 en los grupos de 13C4 y de vehículo, respectivamente, compatibles con alteración significativa en comparación con los grupos tratados con 1D11 y animales normales. Notablemente, la ausencia relativa de alteración en la función cardíaca regional en los grupos tratados con 1D11 fue coherente con las reducciones en la fibrosis observadas en estos grupos en comparación con los grupos de vehículo y de anticuerpo de control negativo 13C4.

Aunque la región funcional en los grupos tratados con 1D11 mejoró en comparación con los grupos de vehículo y de 13C4, la fracción expulsada y el acortamiento fraccional fueron similares entre estos grupos. Esto es probablemente atribuible a la compensación en la función del VI que no estaba infartado en los grupos de 13C4 y de vehículo. El aumento en EPP, compatible con hipertrofia, observado en estos grupos es coherente con esta interpretación. Este ejemplo permitió la evaluación de si la iniciación del antagonismo de TGF- $\beta$  en el día 3 o en el día 5 tras I/R produciría fibrosis reducida en el infarto y función cardíaca mejorada. Hubo una marcada reducción en el porcentaje de fibrosis en el VI en ambos grupos tratados con 1D11 en comparación con los grupos tratados con vehículo y 13C4. Aunque el nivel de fibrosis en los grupos de 1D11-D3 y 1D11-D5 fue similar, el grupo de 1D11-D5 alcanzó significancia estadística en comparación con el grupo de 13C4 de control negativo ( $p < 0,05$ ). Se ha mostrado en modelos de IM que el desarrollo de fibrosis después de IM está asociado a regulación por incremento de TGF- $\beta$ , señalizando TGF- $\beta$  por la ruta smad y genes regulados por TGF- $\beta$ . La administración de 1D11 en modelo de I/R cardíaco de roedor suaviza la regulación por incremento de TGF- $\beta$  y genes asociados a TGF- $\beta$  tras I/R, que incluye colágeno 3 y fibronectina que están asociados a fibrosis. La reducción observada en fibrosis con administración de 1D11 es coherente con el suavizamiento de 1D11 de fibrosis mediada por TGF- $\beta$  en este modelo.

La reducción en la fibrosis en los grupos tratados con 1D11 se correspondió con alteraciones mínimas en la función regional cardíaca, mientras que los grupos de control negativo, 13C4, y de vehículo mostraron una marcada alteración en la función regional. EPA, EPP, y puntuaciones de movimiento de la pared regional, fueron similares en tanto los grupos de 1D11-D3 como de 1D11-5. Esto sugiere que la reducción en la fibrosis en animales tratados con 1D11 produjo ahorro o salvación de miocardio que contribuyó a ahorrar función cardíaca regional tras IM. Mientras que los grupos tratados con 1D11 mejoraron la región funcional en comparación con los grupos de 13C4 y de

vehículo, la fracción expulsada y el acortamiento fraccional fueron similares entre grupos. Esto es coherente con la capacidad del corazón para compensar funcionalmente la alteración en la región funcional en los grupos de 13C4 y de vehículo. La finalización de este estudio fue 28 días después de I/R. Es posible que la compensación en los grupos de 13C4 y de vehículo no se mantuviera durante un largo plazo en este modelo y las diferencias en la función global entre los animales tratados con 1D11, 13C4 y vehículo se hicieran evidentes durante un largo plazo.

El antagonismo de TGF- $\beta$  mediado por 1D11 empezando en el día 3 o en el día 5 tras I/R produjo reducciones en la fibrosis cardíaca que alcanzaron significancia en el grupo de 1D11-D5. Las reducciones en la fibrosis se correspondieron con función cardíaca regional mejorada en comparación con animales que recibieron el anticuerpo de control negativo, 13C4, o vehículo, y sugirieron ahorro o salvación de miocardio en los animales tratados con 1D11.

### **EJEMPLO 3 Efecto del momento de administración de un inhibidor de TGF- $\beta$ en un modelo de rata de reperfusión de isquemia cardíaca**

Se observó el efecto de diferentes momentos de administración de 1D11, un anticuerpo inhibidor de TGF- $\beta$ , sobre la fibrosis miocárdica en un modelo de rata de isquemia cardíaca seguido de reperfusión (I/R). La administración de 1D11 se inició 0, 1 o 5 días después de I/R cardíaco. El efecto de una reducción en la fibrosis miocárdica produjo función del corazón mejorada como se mide por ecocardiografía.

Ratas Lewis hembra de doce a catorce semanas de edad se asignaron a siete grupos de tratamiento diferentes. Todos los animales se sometieron a isquemia cardíaca seguida de un procedimiento de reperfusión (I/R). La isquemia cardíaca se creó ligando temporalmente la arteria coronaria descendente anterior izquierda sobre el ventrículo izquierdo del corazón durante 60 minutos. Después se soltó la ligación permitiendo la reperfusión de la parte isquémica del corazón. A partir de 0 (2 horas después de la reperfusión), 1 o 5 días tras I/R se administraron 5 mg/kg de 1D11 o artículo de control (anticuerpo de control negativo 13C4 o vehículo) por inyección intravenosa (IV) y luego se readministró cada 3<sup>o</sup> día hasta el día 28.

Con el fin de analizar el área en riesgo, microesferas de 15 micrómetros de diámetro se marcaron con un fluorocromo amarillo y luego se inyectaron en el VI del corazón. Esto se hizo inmediatamente antes de soltar la ligación temporal de la arteria coronaria descendente izquierda. Las microesferas se distribuyeron homogéneamente en la sangre y se alojaron en capilares del corazón y otros órganos y tejidos. El AER en el corazón se definió como el área de tejido miocárdico que no recibió ninguna microesfera (o sangre) durante el periodo de ligación.

El día 28, el animal se anestesió ligeramente con isoflurano y la frecuencia cardíaca se mantuvo a  $350 \pm 50$  lpm. Posteriormente se realizó una ecocardiografía en la vista de eje largo para función cardíaca regional y global. Tras el examen de la ecocardiografía, el animal se sacrificó con una sobredosis de pentobarbital sódico. Después, el corazón se extirpó, se pesó y luego se procesó para análisis histológico. Se asignó una puntuación cualitativa al AER. Los animales con AER pequeña (<~20% del VI) o sin AER se eliminaron del análisis del estudio.

La fibrosis cardíaca en el VI se evaluó histológicamente y usando el peso del corazón y se expresó como un porcentaje de peso de fibrosis/peso de VI total. La función cardíaca regional se evaluó por evaluación del engrosamiento de la pared anterior (EPA) en comparación con el engrosamiento de la pared posterior (EPP) en el área en riesgo. El engrosamiento de la pared es la diferencia en el espesor de pared en la sístole y el espesor de pared en la diástole. La función global se evaluó por evaluación de la fracción expulsada (FE) y el acortamiento fraccional (AF).

La administración de 1D11 empezando en el día 0 o en el día 5 redujo significativamente el porcentaje de fibrosis en el VI en comparación con los grupos tratados con vehículo y con anticuerpo de control negativo, 13C4 (Figura 4). La administración de 1D11 empezando en D1 mostró una tendencia hacia la reducción en la fibrosis en comparación con control de 13C4 de correspondencia o de vehículo.

La Tabla 2 muestra los parámetros de la función cardíaca que se evaluaron por ecocardiografía a las 4 semanas tras I/R. La fracción expulsada y el acortamiento fraccional representan la función cardíaca global. EPA, EPP y EPA/EPP (puntuación de movimiento de la pared regional) representan la función cardíaca regional. En el roedor normal, EPA es aproximadamente igual a, y puede ser mayor que, EPP. Después, de esto resulta que la relación de EPA/EPP, que los presentes inventores han llamado puntuación de movimiento de la pared regional, en un animal normal sería  $\geq 1$ . En la Tabla 2, el grupo de animales normales mostró EPA superior a EPP, y puntuación de movimiento de la pared regional (EPA/EPP) de  $1,7 \pm 0,2$ .



Tabla 2

Resultados de ecocardiografía a las 4 semanas					
	FE (%)	AF (%)	EPA (cm)	EPP (cm)	EPA/EPP
Vehículo	50,5 ± 2,6	21,1 ± 1,4	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01\$	0,6 ± 0,13+
1D11 – D0	51,2 ± 2,9	21,5 ± 1,5	0,06 ± 0,01*+	0,04 ± 0,01*	1,38 ± 0,2*
1D11 – D1	52,3 ± 3,3	22,3 ± 1,9	0,05 ± 0,01*	0,07 ± 0,01\$	0,79 ± 0,1
1D11 – D5	59,2 ± 2,7*	26,1 ± 1,7*	0,06 ± 0,01*+	0,06 ± 0,01	0,92 ± 0,18
13C4 – D0	48,4 ± 1,1	19,8 ± 0,6	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01\$	0,52 ± 0,08
13C4 – D1	53,0 ± 2,9	22,5 ± 1,6	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,58 ± 0,19
13C4 – D5	52,9 ± 2,3	22,3 ± 1,2	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01\$	0,54 ± 0,12
Normal	83,9 ± 0,7	45,9 ± 0,7	0,12 ± 0,004	0,09 ± 0,004	1,7 ± 0,2

\* p<0,05 frente a vehículo, + p<0,05 frente a 13C4, \$ p<0,05 EPA frente a EPP

4 semanas tras I/R, la función cardíaca en todos los grupos que se sometieron a I/R fue inferior a la observada en el grupo de animales normales. EPA y EPP fueron similares en los grupos 1D11-D0, 1D11-D3 y 1D11-D5 (Tabla 2 y Figura 5). Las puntuaciones de movimiento de la pared regional fueron 1,38 ± 0,2, 0,79 ± 0,1 y 0,92 ± 0,18 en los grupos 1D11-D0, 1D11-D1 y 1D11-D5, respectivamente (Tabla 2 y Figura 3). Las puntuaciones de movimiento de la pared regional fueron compatibles con alteración mínima en la región funcional en comparación con un valor de animal normal de ≥1. A diferencia, EPA es notablemente inferior a EPP en los grupos de 13C4 de control negativo y de vehículo (Tabla 2 y Figura 5). Las puntuaciones de movimiento de la pared regional fueron 0,52 ± 0,08, 0,58 ± 0,19, 0,54 ± 0,12 y 0,6 ± 0,13 en los grupos 13C4-D0, 13C4-D1, 13C4-D5 y de vehículo, respectivamente (Tabla 2 y Figura 6), y compatibles con alteración significativa en comparación con los grupos tratados con 1D11 y animales normales. La ausencia relativa de alteración en la función cardíaca regional en los grupos tratados con 1D11 fue coherente con las reducciones en la fibrosis observada en estos grupos en comparación con los grupos de vehículo y de anticuerpo 13C4 de control negativo de correspondencia.

El grupo 1D11-D5 también mostró mejoras significativas en los parámetros de la función cardíaca global de fracción expulsada y acortamiento fraccional en comparación con el control de vehículo (Tabla 2), que es coherente con las evaluaciones de fibrosis y función cardíaca regional. Sin embargo, los otros grupos tratados con 1D11 no demostraron cambios en la función global en comparación con los grupos de vehículo y de 13C4 de correspondencia. La reducción en la fibrosis con ausencia relativa de alteración en la región funcional en animales tratados con 1D11 sin mejoras significativas en la función cardíaca global también se observó en un estudio previo y es probablemente atribuible a la compensación en la función del VI que no estaba infartado en los grupos de 13C4 de correspondencia y de vehículo haciendo difícil detectar cambios entre los grupos en este momento. El aumento en EPP, compatible con hipertrofia, observado en estos grupos es coherente con esta interpretación.

Este ejemplo comparó la bioactividad del anticuerpo anti-TGF-β, 1D11, empezando en momentos diferentes después del infarto de miocardio en un modelo de rata de infarto de miocardio en el que los animales se sometieron a isquemia cardíaca seguida de perfusión. Es posible que TGF-β desempeñe diferentes funciones en la respuesta de reparación en el D0, D1 y en el D5, y que el antagonismo de TGF-β que se inicia en estos momentos diferentes produzca una respuesta diferencial. El grupo de 1D11-D1 mostró tendencias hacia la reducción en la fibrosis y mejora en la función cardíaca.

El antagonismo de TGF-β mediado por 1D11 que empezó en el día 0, día 1 en el o en el día 5 tras I/R produjo reducciones en la fibrosis cardíaca que alcanzaron significancia en el grupo de 1D11-D0 y 1D11-D5 en comparación con los grupos de vehículo y de anticuerpo de control de 13C4 de correspondencia. En los grupos de 1D11-D0 y 1D11-D5, las reducciones en la fibrosis se correspondieron con función cardíaca regional significativamente mejorada en comparación con animales que recibieron el anticuerpo de control negativo, 13C4, o vehículo, además de función cardíaca global significativamente mejorada en comparación con el control de vehículo en el grupo de 1D11-D5. Estos resultados sugirieron ahorro o salvación de miocardio en los animales tratados con 1D11.

**EJEMPLO 4 - Efectos del inhibidor de TGF-β, 1D11, en un modelo de roedor de remodelación miocárdica tras isquemia miocárdica**

La administración de 1D11, un inhibidor de TGF-β, redujo el desarrollo de fibrosis y posteriormente mejoró la función cardíaca de un modo dependiente de la dosis. En el día 0, la arteria coronaria ascendente izquierda se ligó durante 60 minutos (oclusión de la arteria coronaria u OAC) y luego se soltó para permitir la perfusión (reperfusión de la

arteria coronaria o RAC). En el día 5 se administraron vehículo, 1D11 y 13C4 (anticuerpo de control) por vía IV y se continuó cada 3 días hasta el sacrificio en el día 28 (semana 4). Se realizó ecocardiografía a las 2 semanas y 4 semanas siguientes a la RAC con el fin de determinar la función ventricular izquierda. 4 semanas después de la RAC se realizó un procedimiento quirúrgico terminal para medir directamente la función del VI usando hemodinámica de presión-volumen (PV). También se realizó un ensayo de estrés por dobutamina. Después de completarse todos los procedimientos anteriores, las ratas se sacrificaron, y se recogieron los tejidos miocárdicos de las zonas isquémicas y no isquémicas para análisis patológicos. Se usó un subgrupo de nueve ratas para la evaluación del tamaño del infarto y se sacrificaron siete días después de la OAC/RAC. Después, los corazones se perfundieron y se tiñeron. El área en riesgo y el tamaño del infarto se midieron y se compararon entre los grupos de vehículo y de 1D11 (25 mg/kg).

Los resultados de este ejemplo indican que 1D11 redujo significativamente el volumen de cicatriz ventricular izquierda con la dosis de 5 mg/kg en comparación con vehículo. De forma interesante, con la dosis de 25 mg/kg, el volumen de cicatriz del VI aumentó en comparación con los controles (Figura 6). El análisis histológico demuestra una disminución significativa en la apoptosis en el área adyacente a la cicatriz con 1D11 con la dosis de 5 mg/kg. Hubo un aumento de la apoptosis en el grupo que recibió 25 mg/kg de 1D11 (Figura 7). No hubo diferencias en la fibrosis intersticial subepicárdica en el área adyacente a la cicatriz entre todos los grupos (datos no mostrados).

La fracción expulsada ventricular izquierda (FEVI), una medida de la función sistólica global, se informó en la semana 2 y la semana 4 (Figura 8). La FEVI a las 4 semanas mejoró significativamente con 1D11 con la dosis de 5 mg/kg en comparación con animales tratados con vehículo. Sin embargo, el tratamiento con 1D11 con 25 mg/kg condujo a una disminución significativa en FE. Esto es coherente con los datos de volumen de cicatriz informados en la Figura 6. De la semana 2 a la semana 4 hubo una mejora significativa en el cambio porcentual en FEVI en el grupo de 5 mg/kg de 1D11 (Figura 9).

El tiempo de relajación isovolumétrica del VI (TRIV), una medida de la función diastólica, también mejoró significativamente en el grupo de 5 mg/kg de 1D11 en comparación con grupos de control y la dosis alta de 1D11. Hubo una normalización aparente de la función diastólica en comparación con animales tratados con placebo (Figura 10). El movimiento de la pared regional mostrado como un porcentaje de engrosamiento en la pared anterior demostró una mejora significativa en el grupo de 5 mg/kg de 1D11 en comparación con el grupo de vehículo (Figura 11).

Las relaciones de presión diastólica final ventricular izquierda-volumen, una medida de la función diastólica evaluada por hemodinámica de PV, demostró mejora significativa en el grupo de 5 mg/kg de 1D11 en el que los datos son comparables a los animales tratados con placebo (Figura 12). El estrés por dobutamina indicó que existe una tendencia hacia la mejora en el grupo de 5 mg/kg de 1D11 (datos no mostrados).

La dosis menor (5 mg/kg) de 1D11 demostró efectos saludables claros y significativos. Primero, el volumen de cicatriz del VI a las 4 semanas fue más bajo, que indica que hubo menos lesión residual del infarto. Segundo, hubo significativamente menos apoptosis en el área adyacente a la cicatriz en comparación con los otros grupos. Tercero, la función del VI evaluada por fracción expulsada del VI fue significativamente mayor en este grupo que en los otros grupos, que indica la mejor salvación de la función del VI. Finalmente, este grupo fue único en demostrar una mejora entre 2 y 4 semanas en la fracción expulsada del VI. La pendiente de la relación presión diastólica final del VI-volumen a las 4 semanas fue la menor en este grupo, que indica rigidez del VI reducida y función diastólica del VI mejorada. Esto corroboró los resultados de TRIV, una medida ecocardiográfica de la función diastólica, que mostró que este grupo fue el único en demostrar preservación de la función diastólica a las 4 semanas. El ensayo de estrés por dobutamina mostró una tendencia hacia una mejora en la función cardíaca, aunque las cuestiones inherentes a la anestesia y cateterización contribuyeron a variabilidad y menos confianza en estos datos a diferencia de los datos ecocardiográficos. Los experimentos del anticuerpo de control no mostraron mucha diferencia de las ratas tratadas con vehículo.

Por otra parte, la alta dosis de 1D11 demostró efectos adversos. La cicatriz a las 4 semanas fue mayor que en los otros grupos, incluyendo el grupo tratado con vehículo. Hubo más apoptosis en el área adyacente. Cuando la función del VI se evaluó por fracción expulsada del VI, fue más baja que todos los otros grupos a las 4 semanas. Por tanto, el antagonismo de TGF- $\beta$ , utilizando 1D11 con la dosis de 5 mg/kg, fue eficaz en prevenir los efectos adversos de la remodelación tras infarto de miocardio en la rata. Las significativas reducciones del volumen de cicatriz del VI y la apoptosis fueron coherentes con las mejoras en la función sistólica y diastólica cardíaca en este modelo. Sin embargo, la alta dosis del fármaco provocó efectos adversos opuestos sobre los criterios de valoración histológicos y funcionales.

#### **EJEMPLO 5 – Efectos del inhibidor de TGF- $\beta$ , 1D11, sobre la preservación miocárdica en un modelo de roedor de isquemia miocárdica seguida de reperfusión**

La administración de 1D11, un inhibidor de TGF- $\beta$ , redujo la fibrosis, preservó el miocardio y mejoró la función cardíaca con 2 dosis diferentes. En el día 0, la arteria coronaria ascendente izquierda se ligó durante 60 minutos y luego se soltó para permitir la reperfusión (I/R). En el día 5 se administraron dos dosis diferentes (1 o 5 mg/kg) de una de cualquiera de las dos formulaciones diferentes de 1D11 (primera y segunda formulaciones), vehículo y 13C4

(anticuerpo de control negativo) por vía IV y se continuó cada 3 días hasta el día 28.

Con el fin de analizar el área en riesgo, microesferas de 15 micrómetros de diámetro que se marcaron con un fluorocromo amarillo se inyectaron en el VI del corazón. Esto se hizo inmediatamente antes de soltar la ligación temporal de la arteria coronaria descendente izquierda. Las microesferas se distribuyeron homogéneamente en la sangre y se alojaron en capilares del corazón y otros órganos y tejidos. El AER en el corazón se definió como el área de tejido miocárdico que no recibió ninguna microesfera (o sangre) durante el periodo de ligación.

El día 28, el animal se anestesió ligeramente con isoflurano y la frecuencia cardíaca se mantuvo a  $350 \pm 50$  lpm. Posteriormente se realizó una ecocardiografía en la vista de eje largo para función cardíaca regional. Tras el examen de la ecocardiografía, el animal se sacrificó con una sobredosis de pentobarbital sódico. Después, el corazón se extirpó, se pesó y luego se procesó para análisis histológico. El AER se evaluó morfológicamente sobre secciones de corazón y usando el peso del corazón y se expresó como un porcentaje de peso de AER/peso de VI total. Los animales con AER pequeña (<20%) o sin AER se eliminaron del análisis del estudio.

La fibrosis cardíaca en el VI se evaluó histológicamente y usando el peso del corazón y se expresó como un porcentaje de peso de fibrosis/peso de VI total. La función cardíaca regional se evaluó por evaluación del engrosamiento de la pared anterior (EPA) en comparación con el engrosamiento de la pared posterior (EPP) en el área en riesgo. El engrosamiento de la pared es la diferencia en el espesor de pared en la sístole y el espesor de pared en la diástole.

Los resultados en este ejemplo demuestran que a las 4 semanas tras I/R, 1D11 con la dosis de 1 y 5 mg/kg de las dos formulaciones diferentes redujo significativamente el porcentaje de fibrosis en el VI en comparación con los controles de 13C4 y de vehículo (Figura 14). Además, ambas dosis de 1D11 de ambas formulaciones redujeron significativamente el porcentaje de fibrosis en el AER en comparación con los controles de 13C4 y de vehículo (Figura 15). De manera importante, ambas dosis de 1D11 de ambas formulaciones aumentaron significativamente el porcentaje de miocardio en el AER en comparación con los controles (Figura 16). Este resultado indica que el tratamiento con 1D11 tras I/R no sólo redujo la fibrosis, sino que también preservó miocardio en el AER.

4 semanas tras I/R, la función cardíaca expresada como puntuación de movimiento de la pared regional (EPA/EPP) mostró menos alteración en todos los grupos tratados con 1D11 (dosis de 1 y 5 mg/kg de ambas formulaciones) en comparación con los controles de 13C4 y de vehículo (Figura 17).

Este ejemplo evaluó la bioactividad del anticuerpo antagonista para TGF- $\beta$ , 1D11, con dos dosis (1 y 5 mg/kg) y de dos formulaciones diferentes, iniciadas 5 días tras isquemia miocárdica seguida de reperfusión. Tanto la dosis de 1 como de 5 mg/kg de 1D11 de ambas formulaciones redujo significativamente la fibrosis y, lo que es más importante, preservó miocardio en el AER en comparación con los controles negativos. De acuerdo con estas mejoras, la función cardíaca regional también mejoró en comparación con los controles negativos.

#### **Ejemplo 6 – Efectos del inhibidor de TGF- $\beta$ , 1D11, sobre la expresión cardíaca de TGF- $\beta$ y genes relacionados en un modelo de roedor de isquemia miocárdica seguida de reperfusión**

La administración de 1D11, un inhibidor de TGF- $\beta$ , redujo la expresión cardíaca de TGF- $\beta$  y genes relacionados, coherente con sus efectos sobre la remodelación miocárdica, preservación miocárdica y función miocárdica como se observó en los ejemplos previos. En el día 0, la arteria coronaria ascendente izquierda se ligó durante 60 minutos y luego se soltó para permitir la reperfusión (I/R). En el día 3 se administraron dos dosis diferentes (5 o 50 mg/kg) de 1D11 por vía IV y se continuó cada 3 días hasta el día 7 o el día 12 para animales que recibieron 5 mg/kg de 1D11, o hasta el día 12 para animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11. Otro grupo de animales sometido a I/R no recibió ningún tratamiento.

Dependiendo del grupo de estudio, en el día 7 o el día 12 el animal se sacrificó con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se recogió la sangre en un tubo separador de suero y el suero se recogió para análisis de niveles de 1D11 y osteopontina (un posible biomarcador en suero de efectos de 1D11 sobre la reducción de fibrosis) usando ELISA de 1D11 o de osteopontina, respectivamente. Después, el corazón se extirpó, las aurículas y el ventrículo derecho se cortaron y el ventrículo izquierdo se seccionó longitudinalmente por el centro del área en riesgo (el área del corazón que no recibió sangre durante la ligación de la arteria coronaria ascendente izquierda). La mitad del ventrículo se sometió a un proceso de congelación muy rápido para análisis de TGF- $\beta$  y expresión génica relacionada por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Para el análisis por RT-PCR, esta porción del ventrículo se subdividió adicionalmente en una porción apical, que incluyó el área en riesgo, y una porción basal que no se sometió a isquemia. La otra mitad del ventrículo se fijó en formalina para el posterior análisis. Un grupo de ratas normales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se sometieron a recogida de suero y corazón como se ha descrito anteriormente.

Los animales que recibieron 1D11 demostraron 1D11 en sus sueros, mientras que el grupo de I/R que no recibió 1D11 no tuvo 1D11 detectable en sus sueros (Figura 18). En los animales que recibieron 5 mg/kg de 1D11, los animales sacrificados en el día 7 tuvieron mayores niveles en suero de 1D11 que los observados en los animales sacrificados en el día 12. Esto era de esperar, ya que en los animales sacrificados en el día 7 sus sueros se habían

- recogido un día después de su última dosis de 1D11 mientras que en los animales sacrificados en el día 12 sus sueros se habían recogido 3 días después de su última dosis de 1D11. El nivel de 1D11 en suero en animales que recibieron la dosis de 50 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 12 fue aproximadamente 1,5 veces el de los animales que recibieron 5 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron el mismo día. La ausencia de proporcionalidad en los niveles en suero de 1D11 en comparación con la dosis puede ser atribuible a la rápida eliminación de 1D11 en animales que recibieron la alta dosis (50 mg/kg) de 1D11. Estos datos indican que la administración IV de 1D11 produce niveles dependientes de la dosis de 1D11 en la circulación y, supuestamente, exposición de 1D11 al corazón.
- La osteopontina es un posible marcador en suero de modulación mediada por 1D11 de fibrosis en I/R cardíaca. Los niveles de osteopontina en suero fueron similares en animales normales, animales I/R que no recibieron ningún tratamiento y se sacrificaron en el día 12 y animales I/R que recibieron dos dosis de 5 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 7 (Figura 19). Hubo tendencias hacia disminuciones en los niveles de osteopontina en animales I/R que recibieron tres dosis de 5 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 12 o tres dosis de 50 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 12.
- La expresión de TGF- $\beta$  y genes relacionados se analizó por RT-PCR en la porción apical del ventrículo izquierdo, que incluyó el área en riesgo y la porción basal del VI que no se sometió a isquemia. En la porción basal del VI, los niveles de expresión de todos los genes evaluados fueron similares a los observados en animales normales. El resto de las descripciones de expresión cardíaca génica se centran en cambios observados en la porción apical del ventrículo.
- La expresión cardíaca de todas las isoformas de TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, fue elevada en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento y se sacrificaron en el día 12. En comparación con animales normales, la expresión de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 aumentó aproximadamente 2,3 veces, 5 veces y 6 veces, respectivamente (Figuras 20-22). La administración de 1D11 con 5 mg/kg redujo la expresión de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (Figuras 20-22). Los animales que recibieron tres dosis de 5 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 12 tuvieron mayores reducciones en la expresión de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en comparación con animales que recibieron 2 dosis y se sacrificaron en el día 7 (Figuras 20, 21). Hubo reducciones similares en la expresión de TGF- $\beta$ 3 en animales que recibieron dos o tres dosis de 5 mg/kg de 1D11 (Figura 22). Los animales que recibieron tres dosis de 50 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 12 también mostraron reducción en la expresión de las tres isoformas de TGF- $\beta$ . Sin embargo, las reducciones en la expresión de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 fueron algo menos intensas que las observadas en animales que recibieron 2 dosis de 5 mg/kg de 1D11 y se sacrificaron en el día 7 (Figuras 19-21). Estos resultados demuestran supresión dependiente de la dosis de la expresión de todas las isoformas de TGF- $\beta$  por 1D11. De forma interesante, la mayor dosis de 1D11 (50 mg/kg) pareció producir menos supresión de la expresión de TGF- $\beta$  en comparación con la dosis de 5 mg/kg.
- El colágeno es un componente importante de fibrosis y se sabe que su expresión se regula por TGF- $\beta$ . La expresión cardíaca de colágeno 3 se elevó aproximadamente 14 veces en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de colágeno 3 en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron mayor reducción en la expresión de colágeno 3 en comparación con animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 23). Los animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 también demostraron una reducción en la expresión de colágeno 3 que fue comparable a la observada en animales que recibieron dos dosis de 5 mg/kg de 1D11. De acuerdo con la reducción mediada por 1D11 en la fibrosis cardíaca tras I/R, hubo una reducción dependiente de la dosis mediada por 1D11 en la expresión de colágeno 3 cardíaco. Similar a la supresión mediada por 1D11 de la expresión de TGF- $\beta$ , pareció que la mayor dosis de 1D11 (50 mg/kg) produjo menos supresión de colágeno 3 en comparación con la dosis de 5 mg/kg.
- La endotelina-1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor cuya expresión está regulada por TGF- $\beta$ . La expresión cardíaca de ET-1 aumentó aproximadamente 5,5 veces en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de ET-1 en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron mayor reducción en la expresión de ET-1 en comparación con los animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 24). Tres dosis de 5 mg/kg de 1D11 casi normalizaron la expresión de ET-1. Los animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 también demostraron una reducción en la expresión de ET-1 que fue comparable a la observada en animales que recibieron dos dosis de 5 mg/kg de 1D11. La inhibición mediada por 1D11 de la expresión de ET-1 tras I/R puede contribuir a perfusión mejorada en el miocardio lesionado y contribuir a la preservación miocárdica y remodelación reducida tras I/R. De forma interesante, pareció que los 50 mg/kg de 1D11 produjeron menos supresión de la expresión de ET-1 en comparación con la dosis de 5 mg/kg.
- El inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) es el principal inhibidor del activador del plasminógeno de tipo tejido y está regulado por TGF- $\beta$ . Niveles elevados de PAI-1 se han asociado a elevados eventos aterotrombóticos y enfermedad vascular. La expresión cardíaca de PAI-1 aumentó aproximadamente 6 veces en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de PAI-1 en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron mucha mayor reducción en la expresión de PAI-1 en comparación con animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 25). Los animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 mostraron reducción marginal en la expresión de PAI-1. Es probable que la reducción

mediada por 1D11 en la expresión de PAI-1 tras I/R contribuyera a las mejoras en la remodelación y preservación miocárdica. La dosis de 50 mg/kg de 1D11 pareció tener un efecto mucho menos intenso sobre la reducción de la expresión de PAI-1 en comparación con la dosis de 5 mg/kg.

5 Recientemente se ha reconocido que la transición endotelial-mesenquimatosa puede contribuir a fibrosis cardíaca. Los factores de transcripción Snail1 y Snail2 (Slug) participan en la transición endotelial-mesenquimatosa y estos factores de transcripción son inducidos por TGF- $\beta$ . La expresión cardíaca de Snail1 y Snail2 aumentó aproximadamente 4 veces y 3 veces, respectivamente, en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de tanto Snail1 como Snail2 en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron mucha mayor reducción en la expresión de Snail1 y Snail2 en comparación con animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 26 y 27). Tres dosis de 5 mg/kg de 1D11 normalizaron aparentemente la expresión de Snail2. Los animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 también demostraron reducciones en la expresión de Snail1 y Snail2 que fueron comparables a las observadas en animales que recibieron dos dosis de 5 mg/kg de 1D11. El aumento de la expresión de Snail1 y Snail2 tras I/R sugiere fuertemente que la transición endotelial-mesenquimatosa está contribuyendo a la fibrosis cardíaca en la respuesta de reparación a I/R. Las reducciones mediadas por 1D11 en la expresión de Snail1 y Snail2 tras I/R son probablemente un mecanismo contribuyente a la reducción observada en la fibrosis cardíaca y mejora en la remodelación. De forma interesante, pareció que la dosis de 50 mg/kg de 1D11 tenía un efecto menos intenso sobre la reducción de la expresión de Snail1 y Snail2 en comparación con la dosis de 5 mg/kg.

20 Un marcador de células mesenquimatosas que se observa en la transición endotelial-mesenquimatosa es  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). La expresión cardíaca de  $\alpha$ -SMA se elevó aproximadamente 4 veces en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de  $\alpha$ -SMA en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron mucha mayor reducción de la expresión de  $\alpha$ -SMA en comparación con animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 28). Los animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 también demostraron reducción en la expresión de  $\alpha$ -SMA que fue comparable a la observada en animales que recibieron dos dosis de 5 mg/kg de 1D11. De acuerdo con la reducción mediada por 1D11 en Snail1 y Snail 2 tras I/R, 1D11 redujo la expresión de  $\alpha$ -SMA. Pareció que la dosis de 50 mg/kg de 1D11 tuvo un efecto menos intenso sobre la reducción de la expresión de  $\alpha$ -SMA en comparación con la dosis de 5 mg/kg.

30 Se considera que la fibronectina es un marcador de transición epitelial-mesenquimatosa y probablemente es un marcador de transición endotelial-mesenquimatosa. La expresión cardíaca de fibronectina aumentó aproximadamente 16 veces en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de fibronectina en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron mucha mayor reducción de la expresión de fibronectina en comparación con animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 29). Los animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 también demostraron reducción en la expresión de fibronectina que fue comparable a la observada en animales que recibieron dos dosis de 5 mg/kg de 1D11. La reducción mediada por 1D11 en fibronectina fue compatible con las reducciones mediadas por 1D11 en la transición endotelial-mesenquimatosa de marcadores Snail1, Snail2 y  $\alpha$ -SMA. Pareció que la dosis de 50 mg/kg de 1D11 tuvo un efecto menos intenso sobre la reducción de la expresión de fibronectina en comparación con la dosis de 5 mg/kg.

40 La apoptosis contribuye a la pérdida de miocitos cardíacos durante la remodelación cardíaca. Bax es un gen pro-apoptótico muy reconocido y la expresión cardíaca de Bax aumentó aproximadamente 1,8 veces en animales I/R que no recibieron ningún tratamiento en comparación con animales normales. La administración de 5 mg/kg de 1D11 redujo la expresión de Bax en la que los animales que recibieron 3 dosis de 1D11 tuvieron una mayor reducción de la expresión de Bax en comparación con los animales que recibieron 2 dosis de 1D11 (Figura 30). Debido a limitaciones de muestras, los corazones de animales que recibieron 50 mg/kg de 1D11 no se analizaron para la expresión de Bax. La reducción mediada por 1D11 en la expresión de Bax es coherente con observaciones en ejemplos previos en los que hubo una reducción en la apoptosis en corazones de animales I/R que recibieron 5 mg/kg de 1D11, y hubo un aumento de la preservación miocárdica en animales I/R que recibieron 1 y 5 mg/kg de 1D11.

50 Los resultados descritos en este ejemplo demuestran que la administración IV de un antagonista de TGF- $\beta$  (por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ ) produce niveles en circulación dependientes de la dosis de 1D11 y, supuestamente, exposición al corazón. El nivel en suero de osteopontina puede ser un marcador de reducción mediada por 1D11 de fibrosis cardíaca. TGF- $\beta$  y genes relacionados se inducen en I/R y son conductores de la fibrosis cardíaca y remodelación que se produce tras I/R. La administración del anticuerpo antagonista para TGF- $\beta$ , 1D11, tras I/R media en la reducción en la expresión de estos genes que proporciona un mecanismo para la reducción en la fibrosis cardíaca, preservación miocárdica, mejoras en la remodelación y mejoras en la función cardíaca que se observaron con tratamiento con 1D11. Los resultados también demostraron que los genes que participaron en la transición endotelial-mesenquimatosa se indujeron tras I/R y que la transición endotelial-mesenquimatosa puede contribuir a la fibrosis cardíaca tras I/R. A nuestro leal saber, esto es un hallazgo novedoso. El tratamiento con 1D11 tras I/R reguló por disminución estos genes y moduló por disminución cualquier contribución de la transición endotelial-mesenquimatosa a la fibrosis cardíaca tras I/R. De forma interesante, la dosis de 5 mg/kg

de 1D11 produjo aparentemente reducciones más intensas en la expresión de TGF-β y genes relacionados tras I/R en comparación con la dosis de 50 mg/kg de 1D11.

<110> Akita, Geoff  
 Lonning, Scott  
 Gregory, Richard  
 Kudej, Amelia

<120> TRATAMIENTO DE INFARTO DE MIOCARDIO USANDO ANTAGONISTAS DE TGFEβ

<130> 0076524-000003

<140> Sin asignar

<141> 2011-09-01

<150> US 61/379,315

<151> 2010-09-01

<160> 31

<210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos sintéticos que codifica VH de PET1073G12

<400> 1

caggtgcagc	tggcgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccttcagt	agcaatgta	tcagctgggt	gcccaggcc	120
cctggacaag	ggctcgagtg	gatggggggg	gtcatcccta	ttgttgatat	tggaactac	180
gcacagagat	tcaagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	aatccactag	tacaacttac	240
atggagttga	gcagcctgag	gtctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagcacactt	300
ggtctcgtcc	tggatgctat	ggactactgg	ggtcagggta	cgttggtcac	cgtctcctca	360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de VH DE PET1073G12

<400> 2

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

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

# ES 2 715 177 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos HCDR1 de PET1073G12

<400> 3

Ser Asn Val Ile Ser  
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de HCDR2 de PET1073G12

<400> 4

Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de HCDR3 de PET1073G12

<400> 5

Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 6

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminácidos sintéticos de VH de PET1073G12

<400> 6

gaaacggtac	tcacgcagtc	tccaggtacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gagctctggc	agcagctact	tagcctggta	tcagcagaaa	120
cctggtcagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggcacc	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctggtacc	gacttcactc	tcaccatcag	ccgactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtta	ttactgtcag	cagtatgctg	actcaccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos sintéticos que codifica VL de PET1073G12

<400> 7

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

ES 2 715 177 T3

```

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

```

<210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de LCDR1 de PET1073G12

```

<400> 8
Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
1              5              10

```

<210> 9  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de LCDR2 de PET1073G12

```

<400> 9
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro
1              5

```

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de LCDR3 de PET1073G12

```

<400> 10
Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr
1              5

```

<210> 11  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintéticos de VH de PET1074B9

```

<400> 11
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcagt agcaatgta tcagctgggt gcgccaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatggggggg gtcattcccta ttgttgatat tgccaactac      180
gcacagagat tcaagggcag agtcacgatt accgcccagc aatccactag tacaacttac      240
atggagttga gcagcctgag gtctgaggac acggccgtgt attactgtgc gctgccacgc      300
gctttcgtcc tggatgctat ggactactgg ggtcagggta cgttggtgac cgtctcctca      360

```

<210> 12



ES 2 715 177 T3

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

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos VH de PET1074B9

<400> 12  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Leu Pro Arg Ala Phe Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos HCDR1 de PET1074B9

<400> 13  
 Ser Asn Val Ile Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos HCDR2 de PET1074B9

<400> 14  
 Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

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

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos HCDR3 de PET1074B9

<400> 15  
 Pro Arg Ala Phe Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 16

ES 2 715 177 T3

<211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintéticos que codifica VL de PET1074B9

<400> 16  
 gaaacggtagc tcacgcagtc tccaggtacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtcttggc agcagctact tagcctggta tcagcagaaa 120  
 cctgggtcagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggtacc gacttcactc tcaccatcag ccgactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatgctg actcaccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 17  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos VL de PET1074B9

<400> 17  
 Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 18  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos LCDR1 de PET1074B9

<400> 18  
 Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos LCDR2 de PET1074B9

<400> 19  
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro  
 1 5

ES 2 715 177 T3

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos LCDR3 de PET1074B9

<400> 20  
 Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica VH de PET1287A10

<400> 21  
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaagtg 60  
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc acctctttca tcaattgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgatat aacaaactac 180  
 gcacagaaat ttcagagcag agtcactatt accgcggaca aatccacgag caccgcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag ctctgaggac acggctgtgt attactgcgc acgcggaaat 300  
 ggtaactacg ccttgatgc tatggactac tggggtcagc gtacgttggc caccgtctcc 360  
 tca 363

<210> 22  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de VH de PET1287A10

<400> 22  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Phe Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Asn Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

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

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de HCDR1 de PET1287A10

ES 2 715 177 T3

<400> 23  
 Thr Ser Phe Ile Asn  
 1 5

<210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de HCDR2 de PET1287A10

<400> 24  
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Ser

<210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de HCDR3 de PET1287A10

<400> 25  
 Gly Asn Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintéticos que codifica VL de PET1287A10

<400> 26  
 gaaattgtgc tgactcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gactgttagc agcagctact ttgcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccct 180  
 gacagattca gtggcagcgg gtctgggaca gatttcactc tcaccatcag cgcctggag 240  
 cctgaagatt tcgcagttta ttactgtcag caatattatg atagtcccat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 27  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de VL de PET1287A10

<400> 27  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

ES 2 715 177 T3

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

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de LCDR1 de PET1287A10

<400> 28

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ala
1			5						10		

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de LCDR2 de PET1287A10

<400> 29

Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr
1			5			

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de LCDR3 de PET1287A10

<400> 30

Gln	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Pro	Ile	Thr
1			5					

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos de FR4

<400> 31

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista de TGF- $\beta$  para su uso en el tratamiento de un infarto de miocardio en un paciente, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  al paciente comienza en el plazo de 72 h del inicio de la isquemia miocárdica, y
- 5 en el cual el antagonista de TGF- $\beta$  es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a una o más isoformas de TGF- $\beta$  y en el cual el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende el dominio VH de PET1073G12 (SEQ ID NO: 2) y el dominio VL de PET1073G12 (SEQ ID NO: 7).
2. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el paciente es un mamífero humano o no humano.
- 10 3. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual dicho uso preserva el miocardio.
4. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo o fragmento de anticuerpo neutraliza TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 humanos.
- 15 5. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el antagonista de TGF- $\beta$  se administra con una dosis de 1 mg por kilogramo de masa corporal del paciente.
6. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el antagonista de TGF- $\beta$  se administra con una dosis de 5 mg por kilogramo de masa corporal del paciente.
7. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza en un plazo de 48 horas desde la aparición de isquemia miocárdica.
- 20 8. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza en un plazo de 24 horas desde la aparición de isquemia miocárdica.
9. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza en un plazo de 12 horas desde la aparición de isquemia miocárdica.
- 25 10. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza antes de la infiltración sustancial de macrófagos y mononuclear de tejido afectado por el infarto de miocardio.
11. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por la infiltración neutrofílica de tejido afectado por el infarto de miocardio.
- 30 12. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la administración del antagonista de TGF- $\beta$  comienza durante un periodo caracterizado por la necrosis de tejido afectado por el infarto de miocardio.
13. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual también se administra un fármaco antiinflamatorio al paciente.
- 35 14. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual también se administra un antagonista de TNF- $\alpha$  al paciente.
15. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual también se administra un inhibidor de ACE al paciente.
- 40 16. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el inhibidor de ACE se selecciona del grupo compuesto por benazeprilo, captoprilo, fosinopril, moexiprilo, perindopril, quinapril, transdolapril, lisinopril, enalapril y ramipril.
17. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual también se administra un antagonista de receptor de angiotensina II al paciente.
- 45 18. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el cual el antagonista de receptor de angiotensina II se selecciona del grupo compuesto por eprosartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán y valsartán.
19. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual también se administra un antagonista beta-adrenérgico al paciente.
20. El antagonista para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el cual el antagonista beta-adrenérgico se selecciona del grupo compuesto por alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, oxprenolol,

## ES 2 715 177 T3

penbutolol, pindolol, propanolol, sotalol, timolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol y nebivolol.

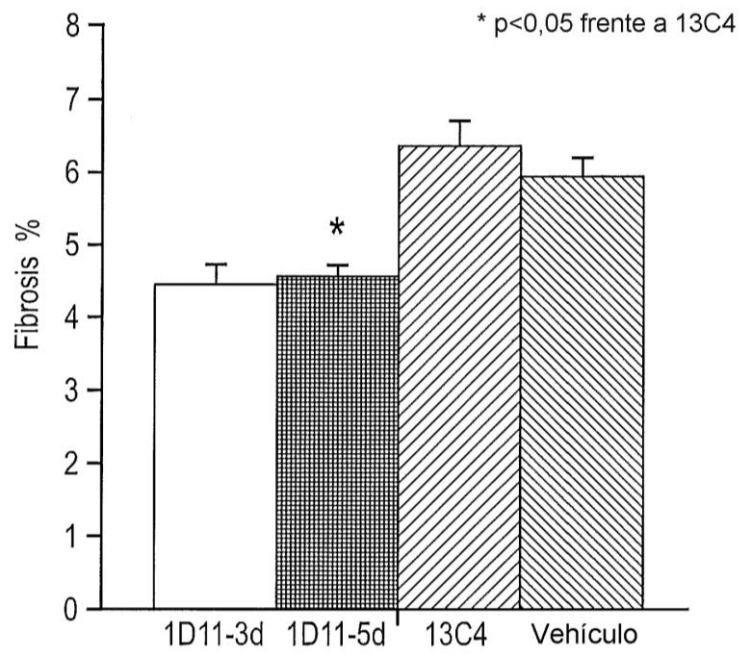


FIG. 1

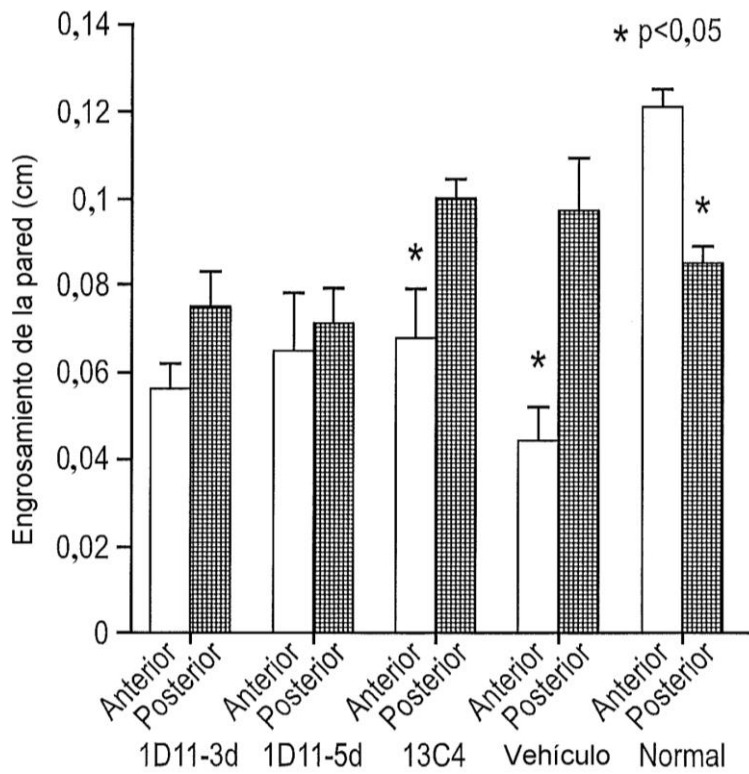


FIG. 2



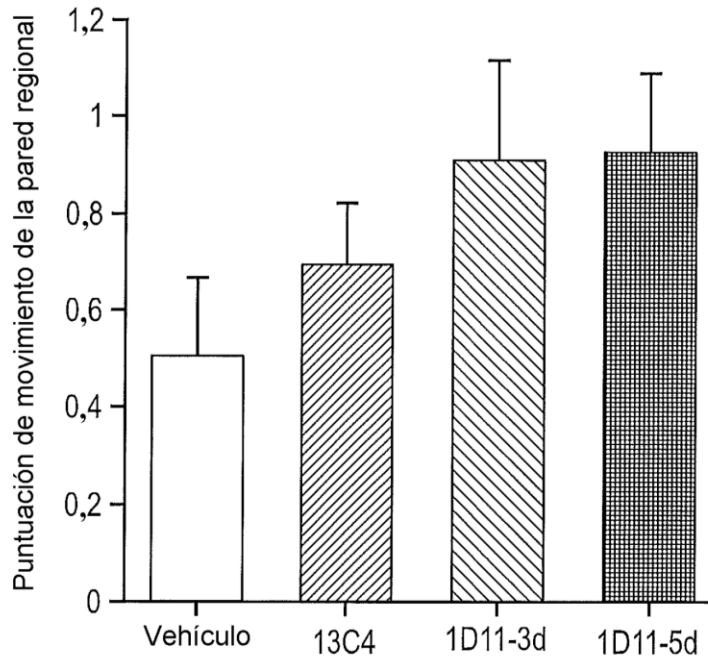


FIG. 3

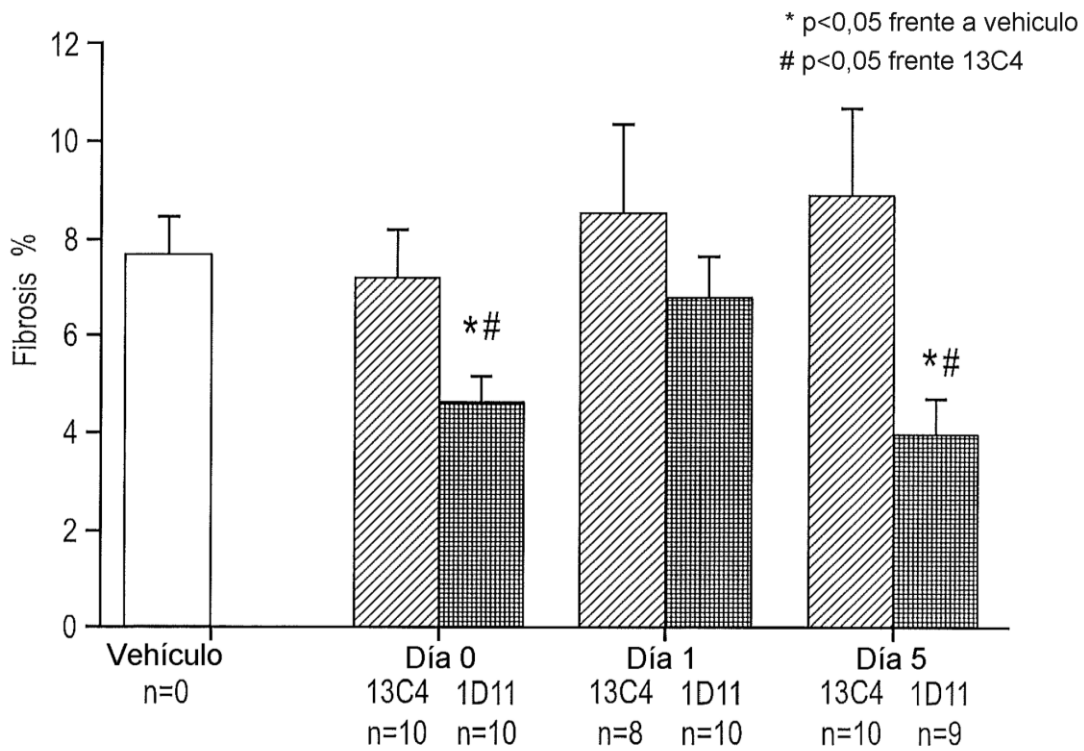


FIG. 4

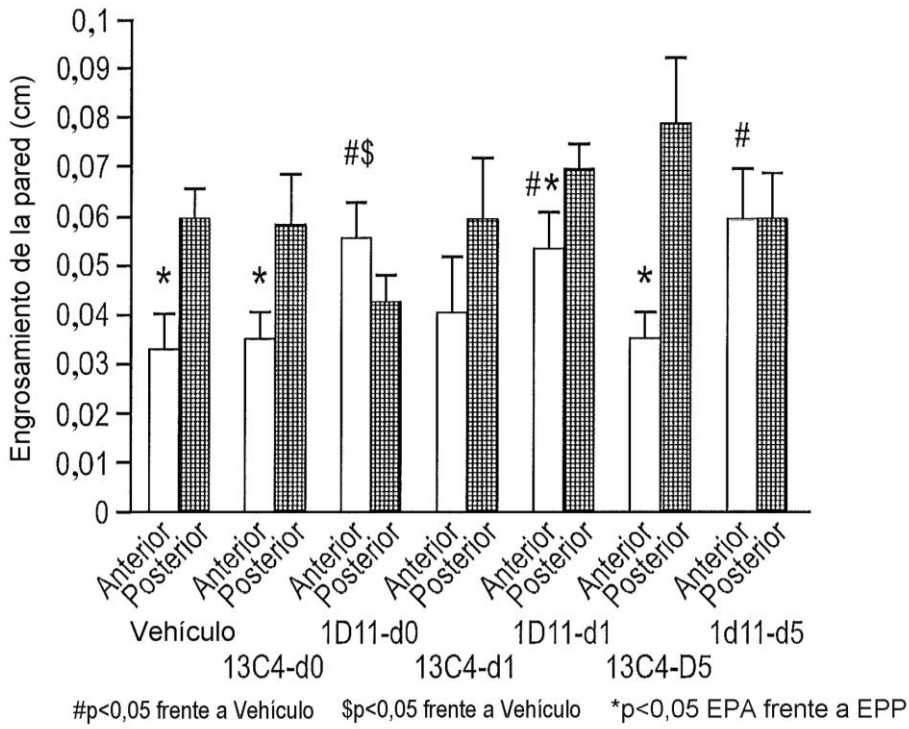


FIG. 5

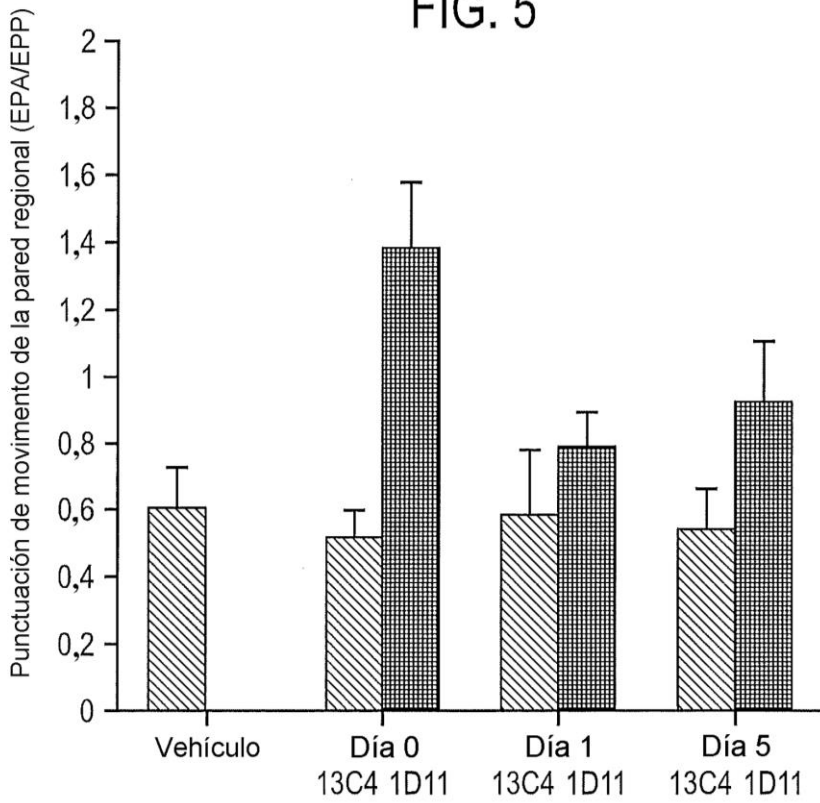


FIG. 6

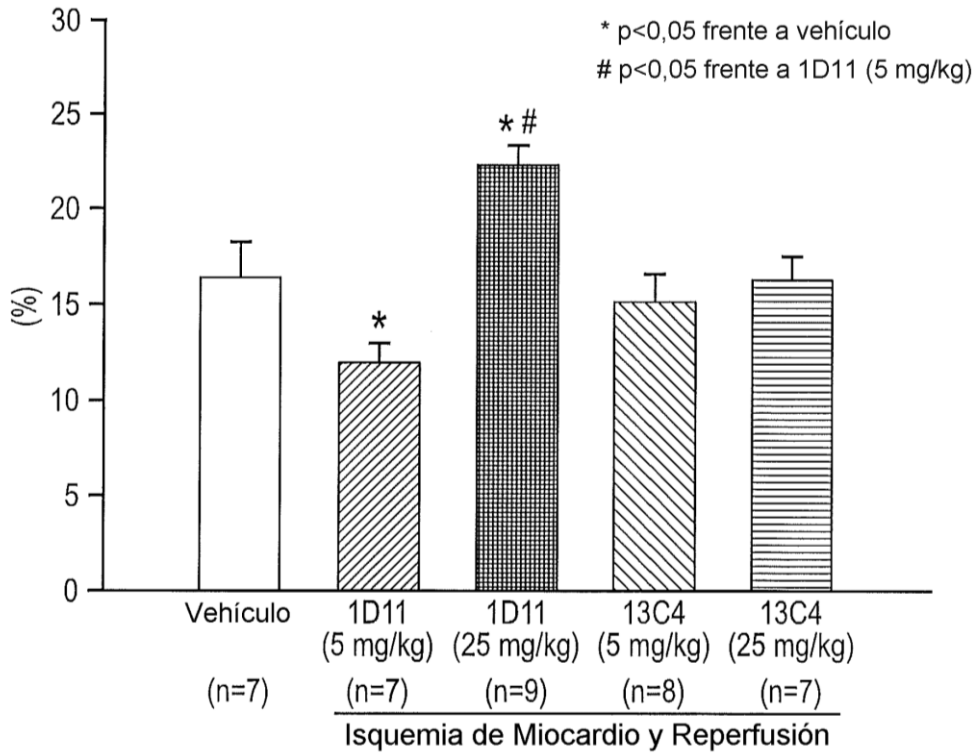


FIG. 7

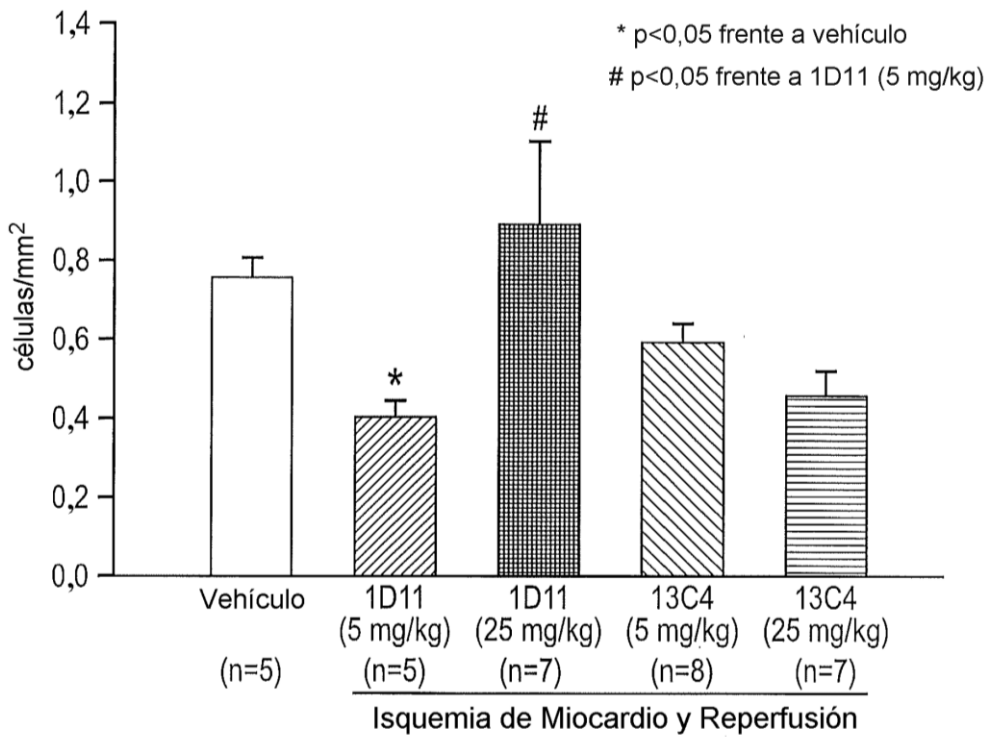


FIG. 8

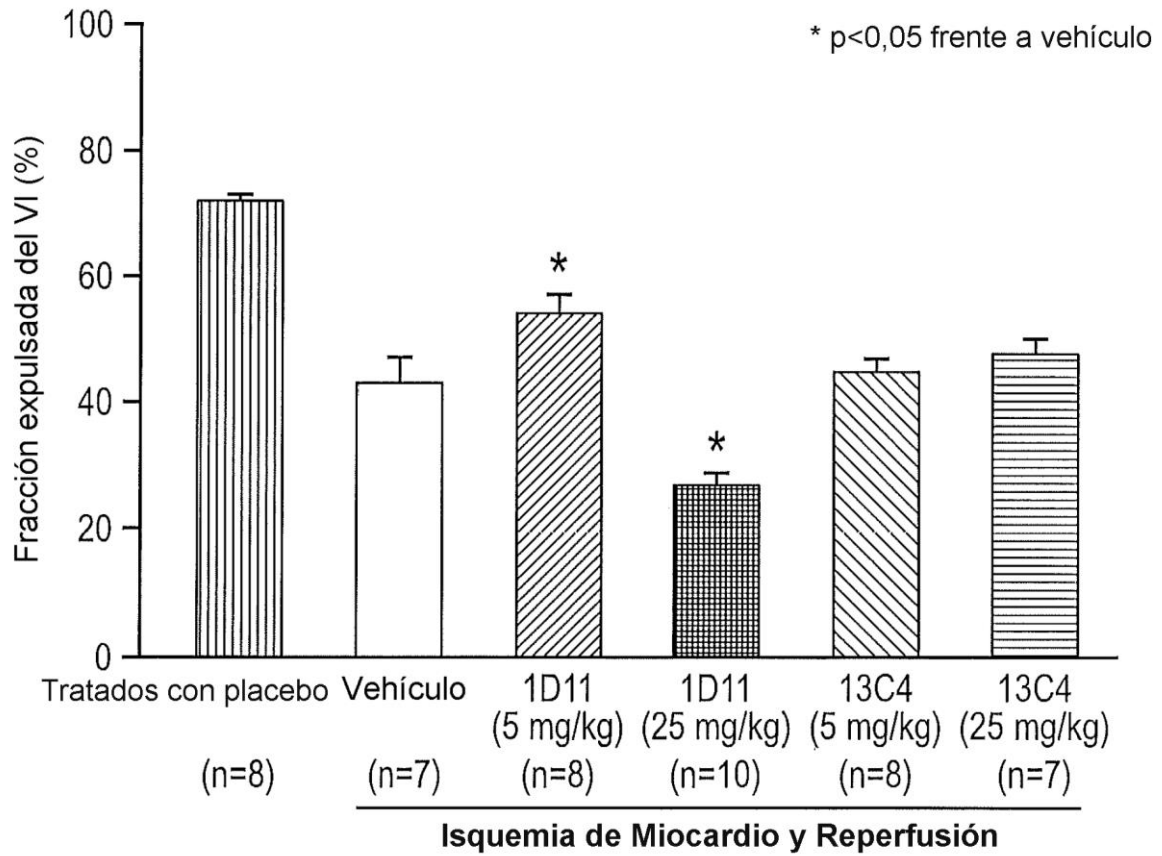


FIG. 9

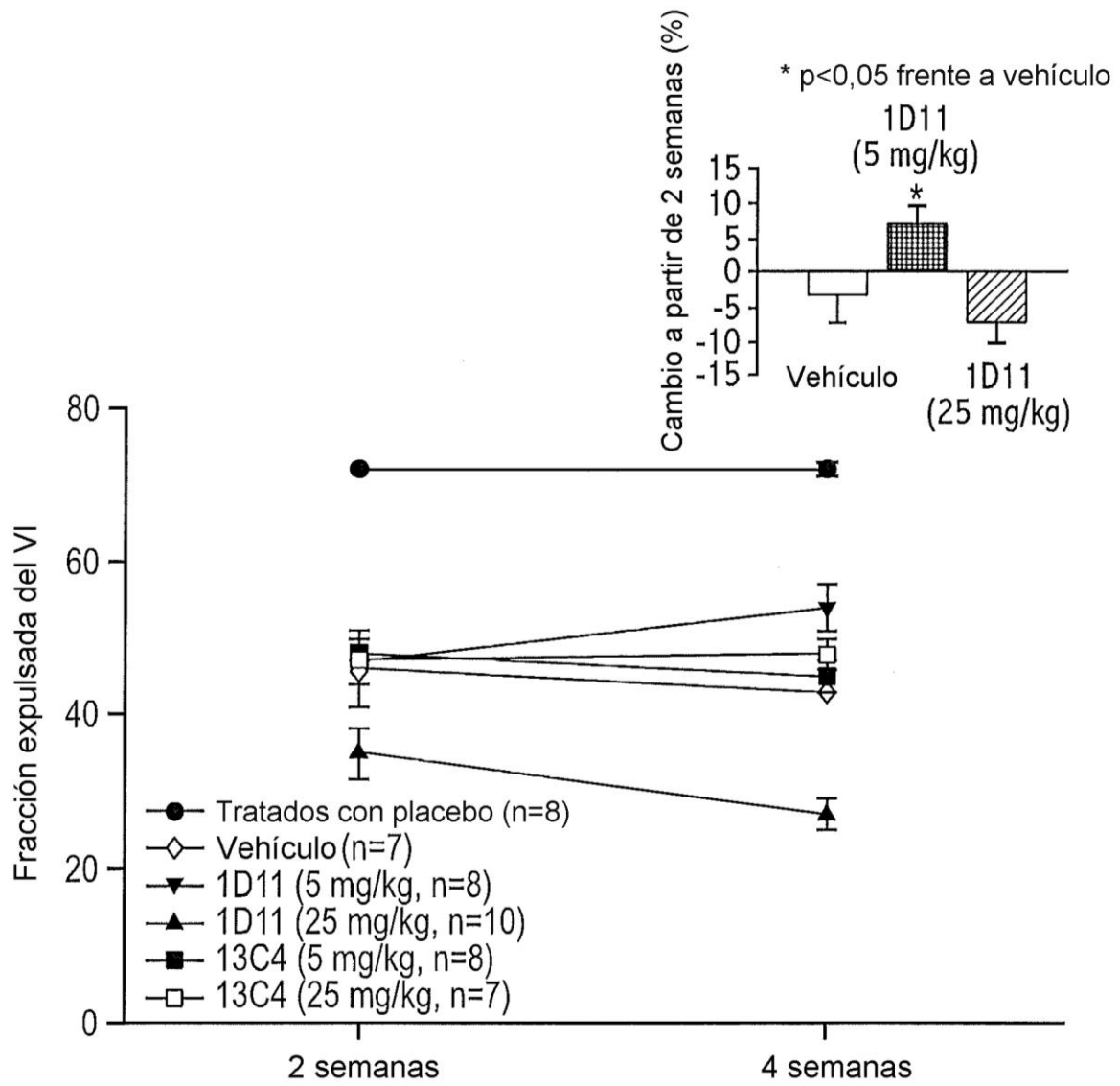


FIG. 10

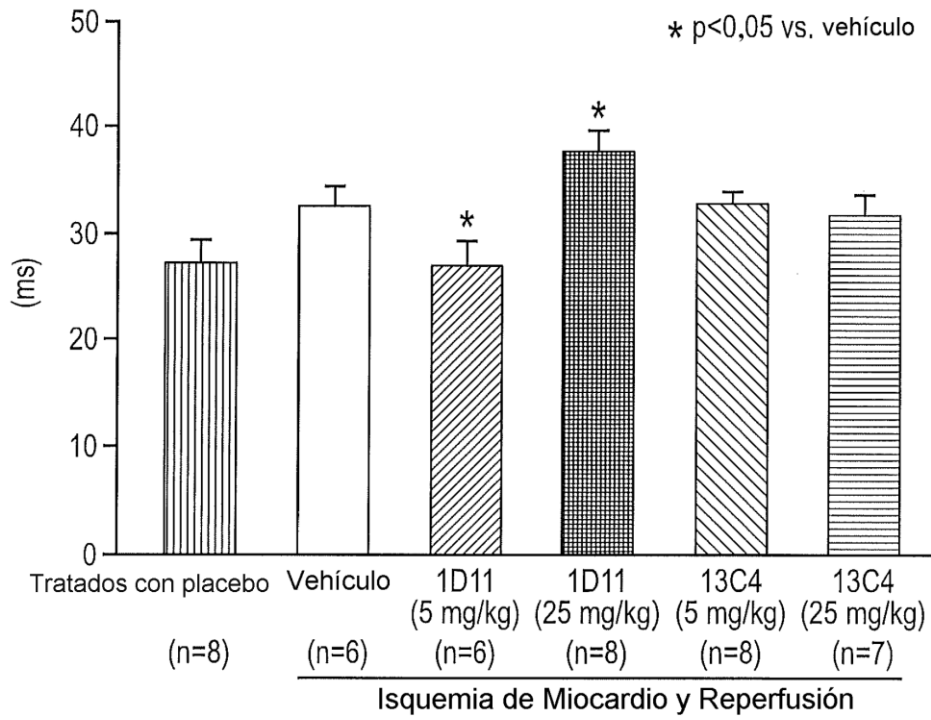


FIG. 11

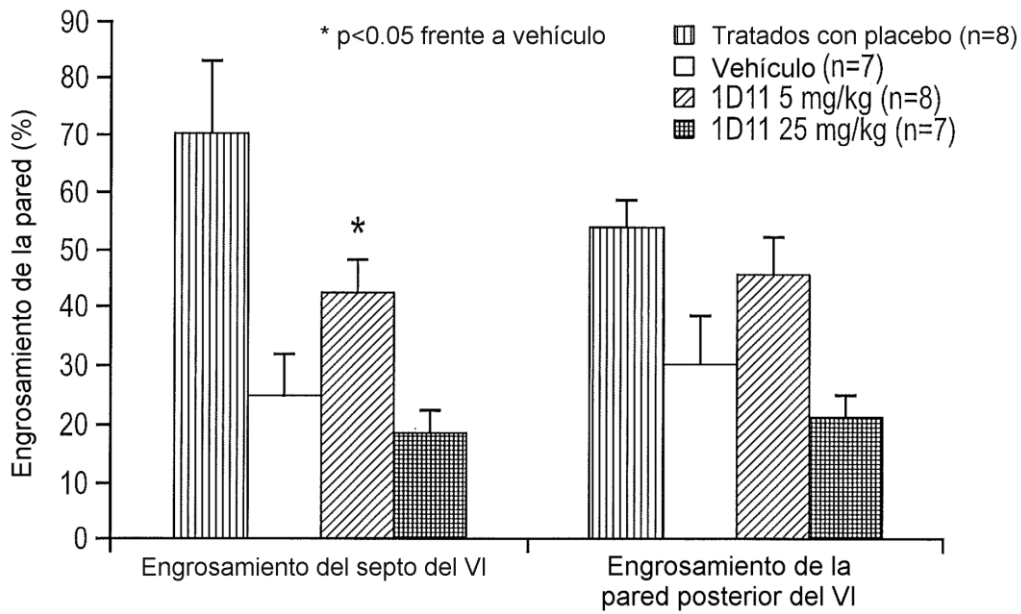


FIG. 12

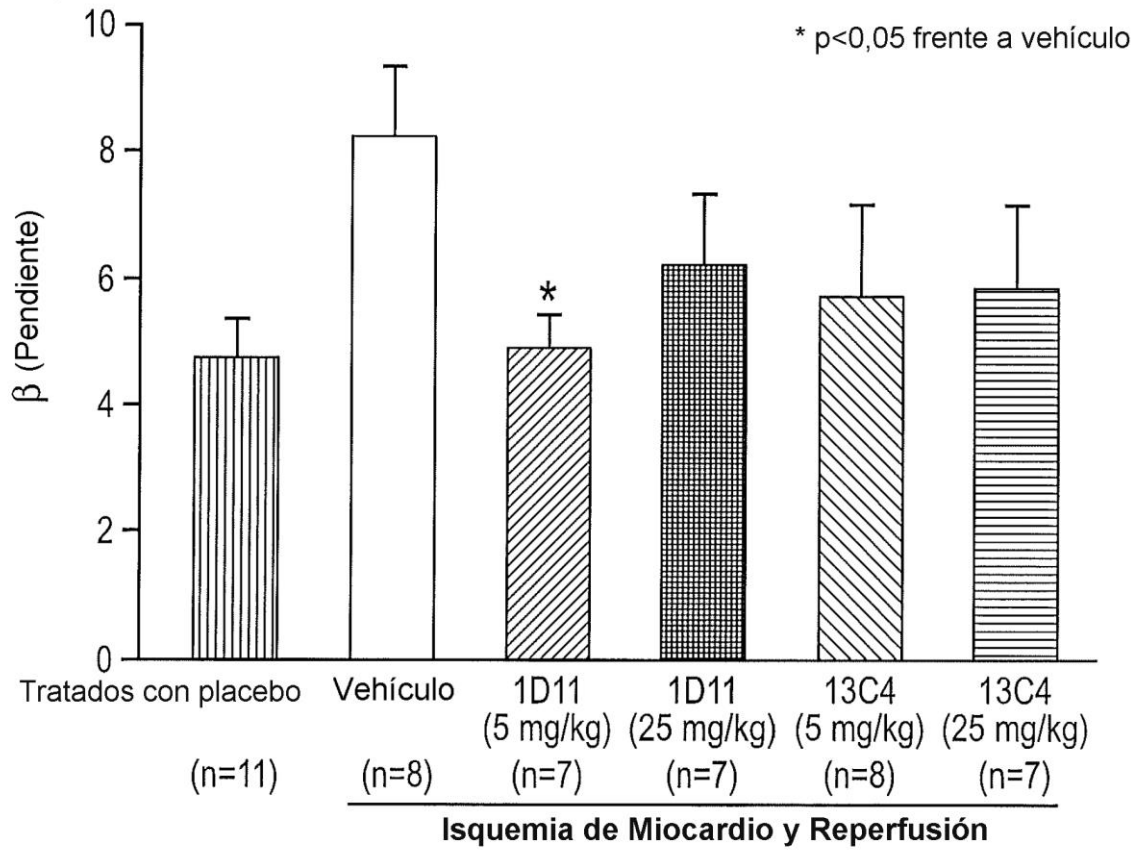


FIG. 13

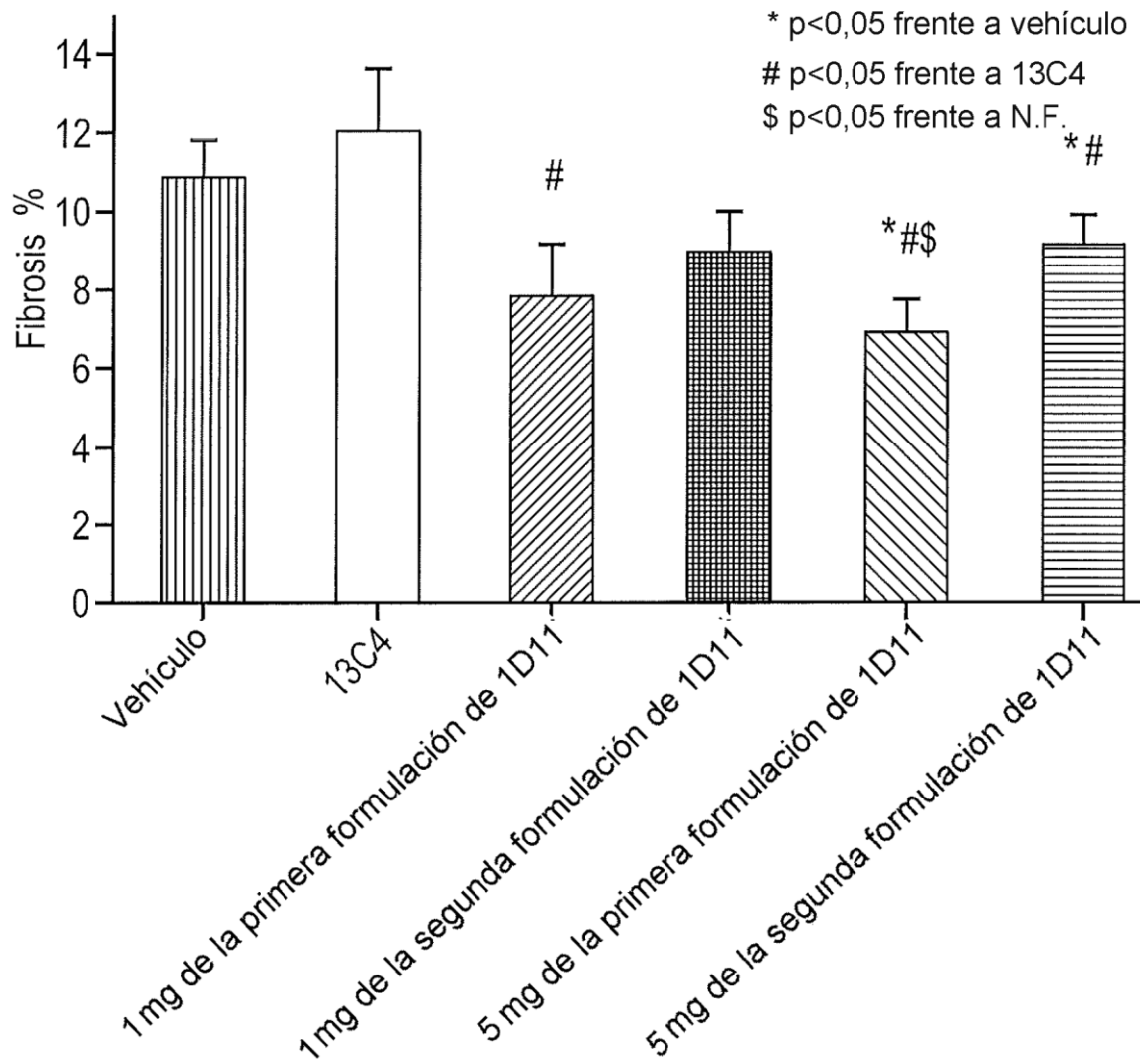


FIG. 14



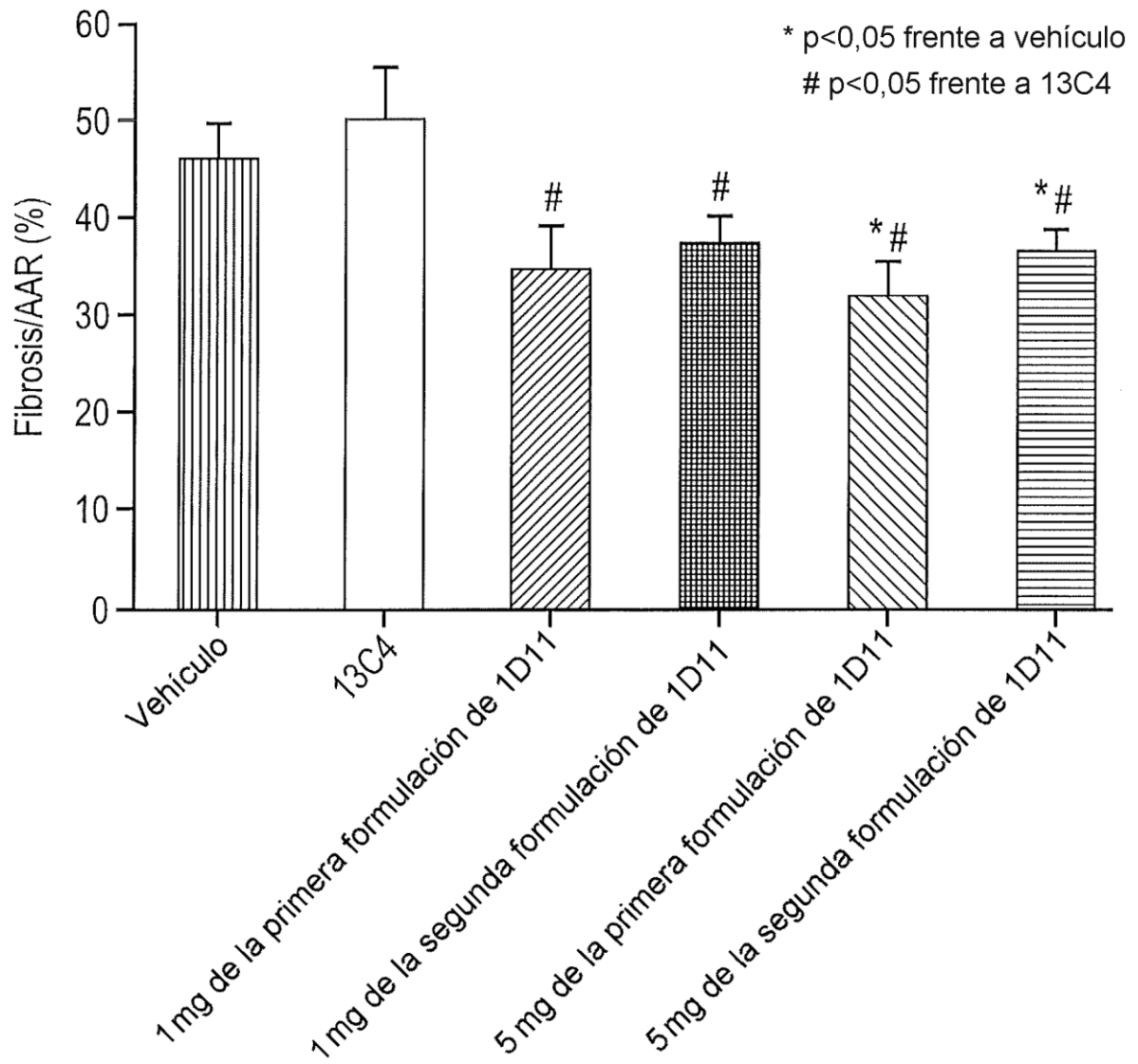


FIG. 15

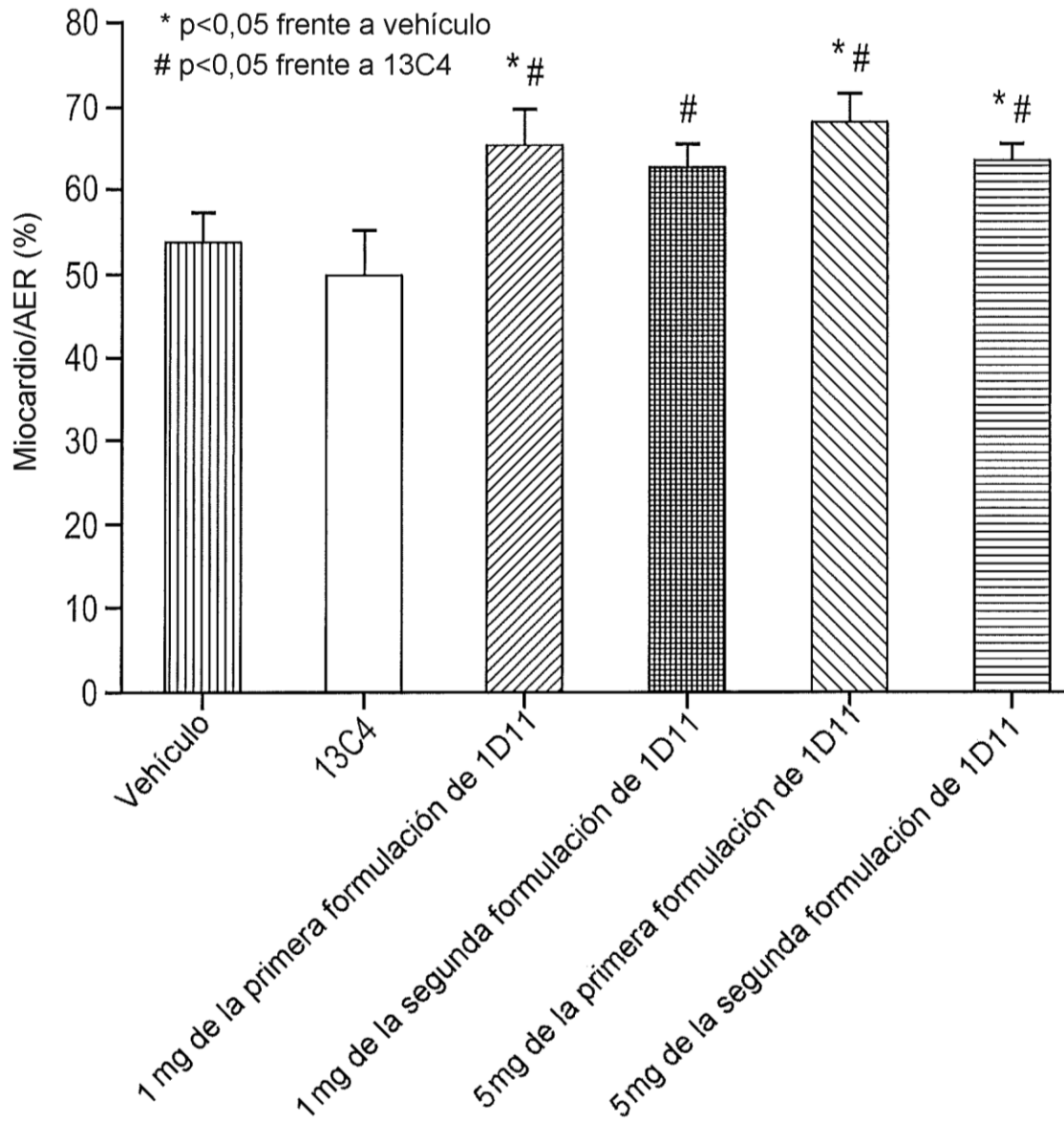


FIG. 16

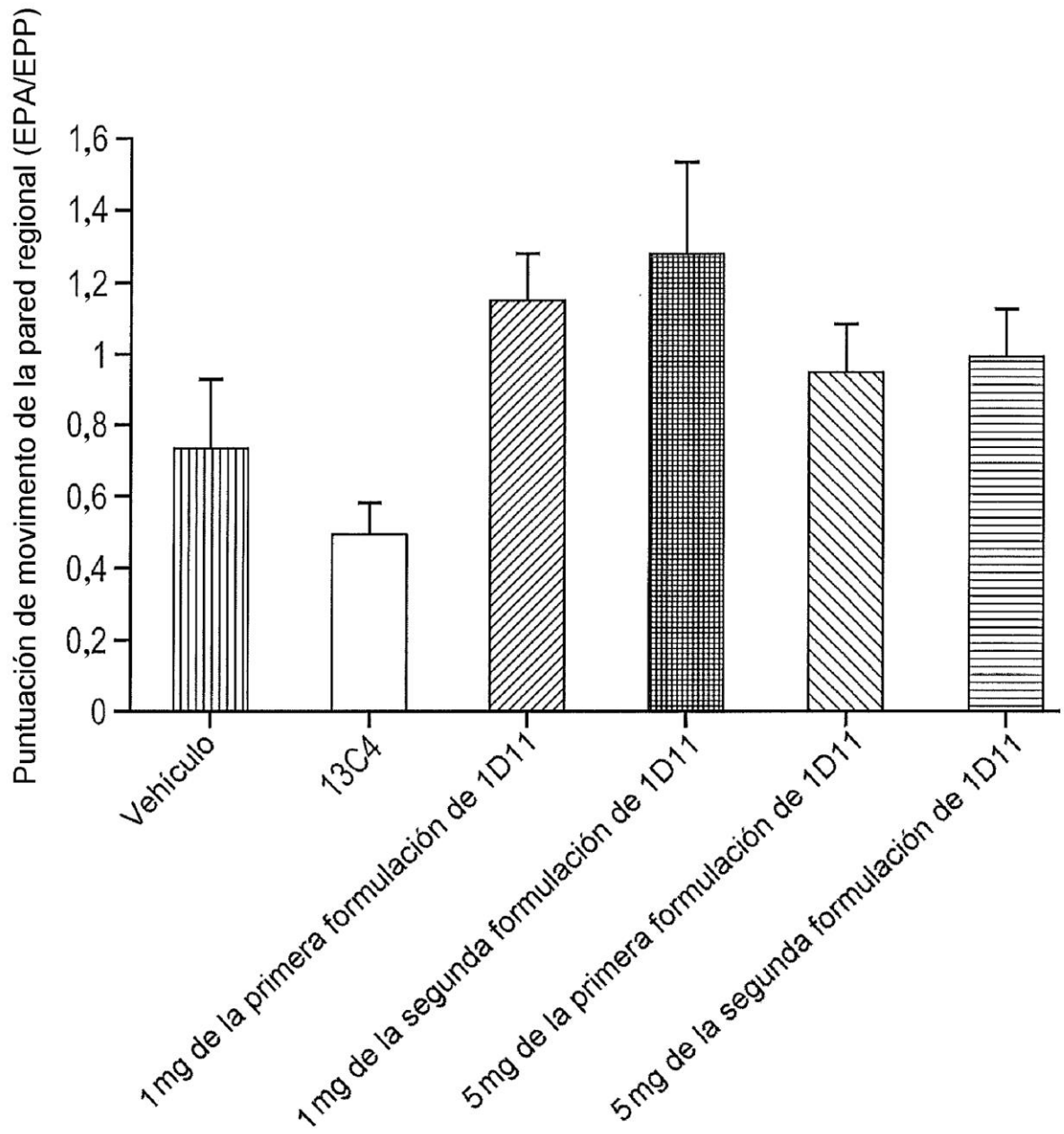


FIG. 17

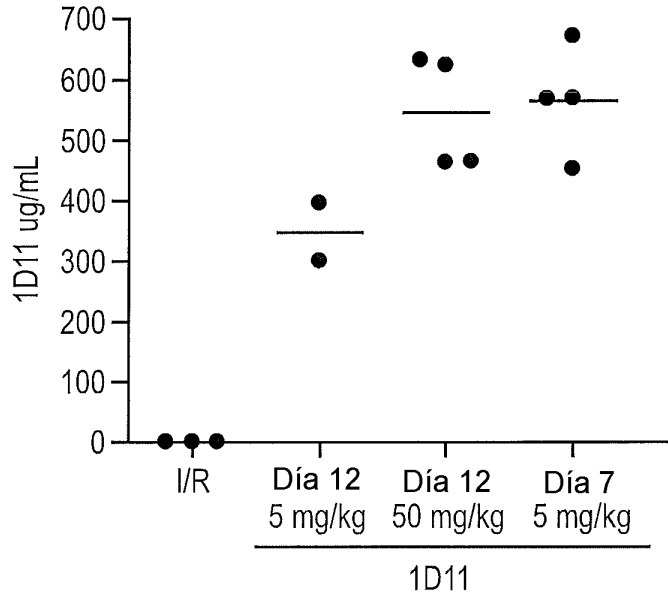


FIG. 18

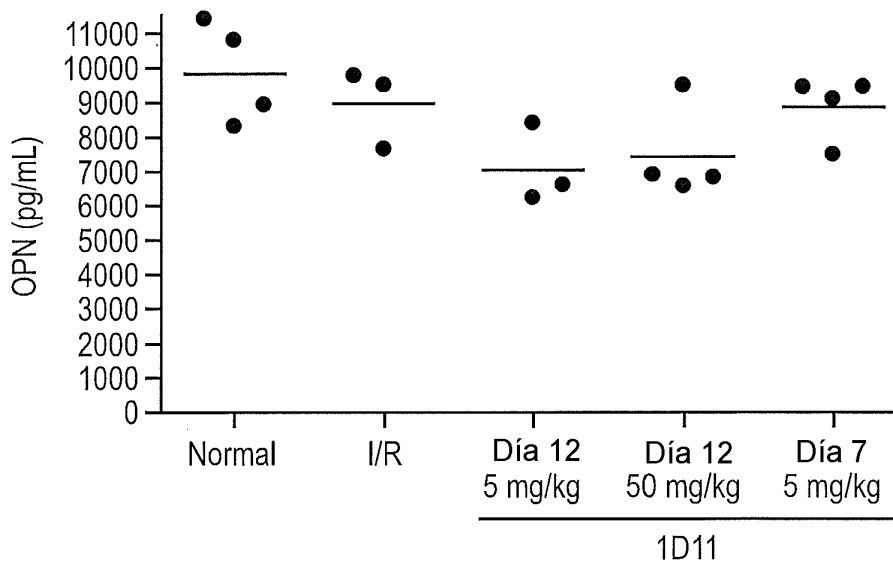


FIG. 19

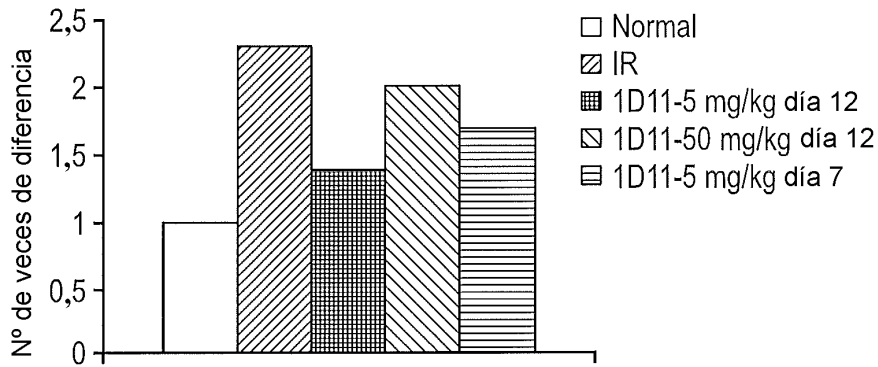


FIG. 20

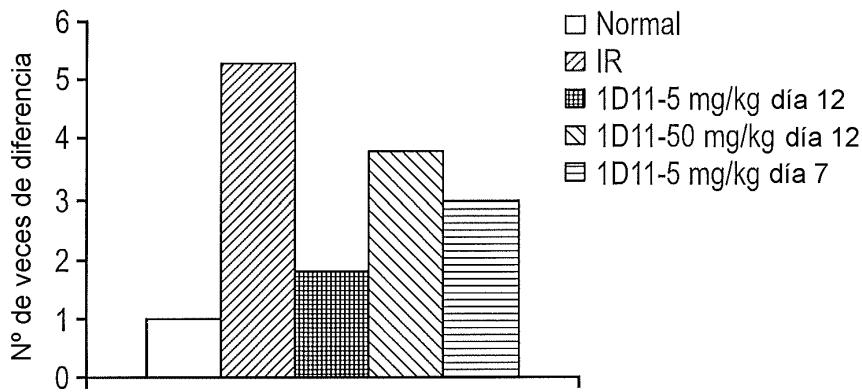


FIG. 21

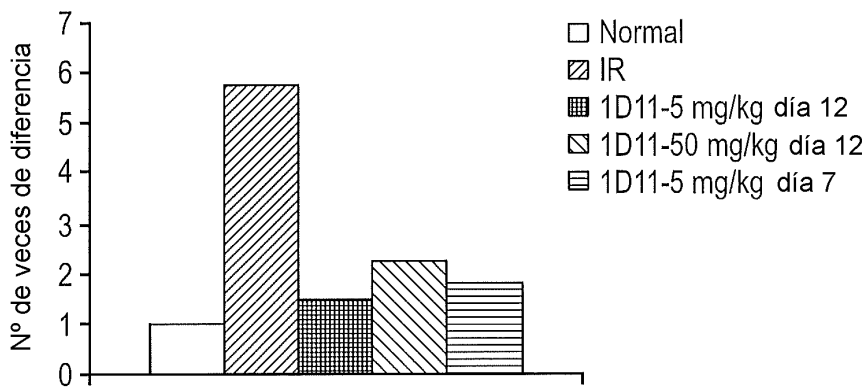


FIG. 22

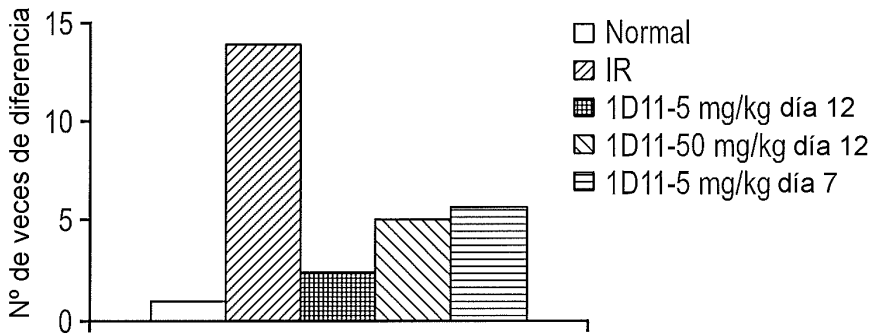


FIG. 23

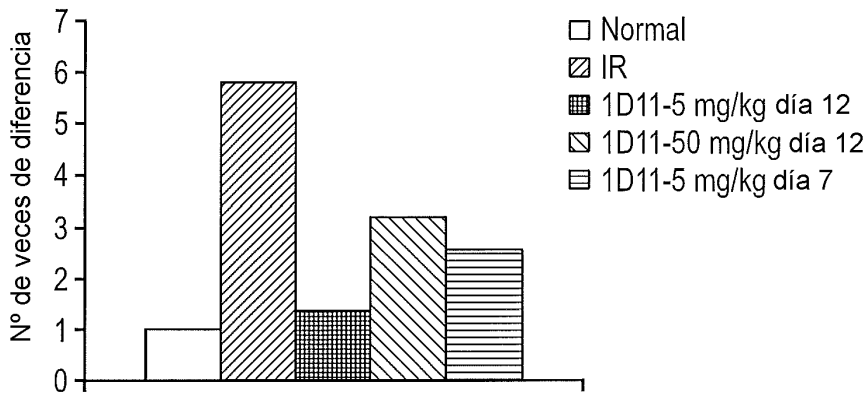


FIG. 24

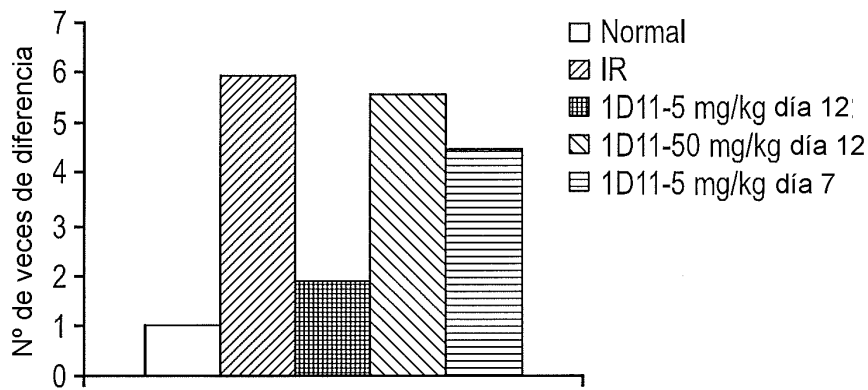


FIG. 25

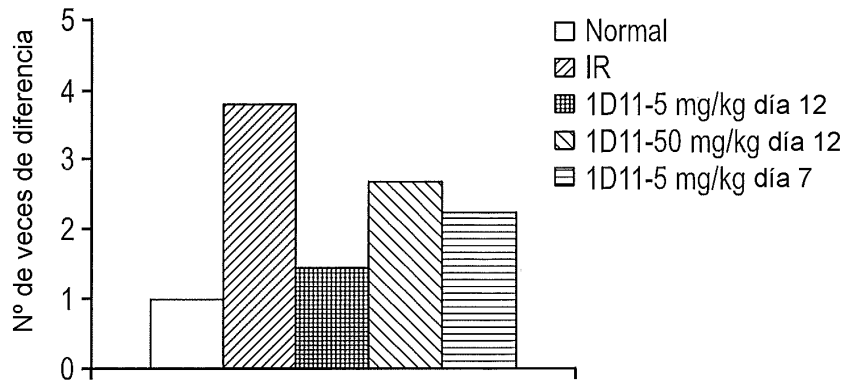


FIG. 26

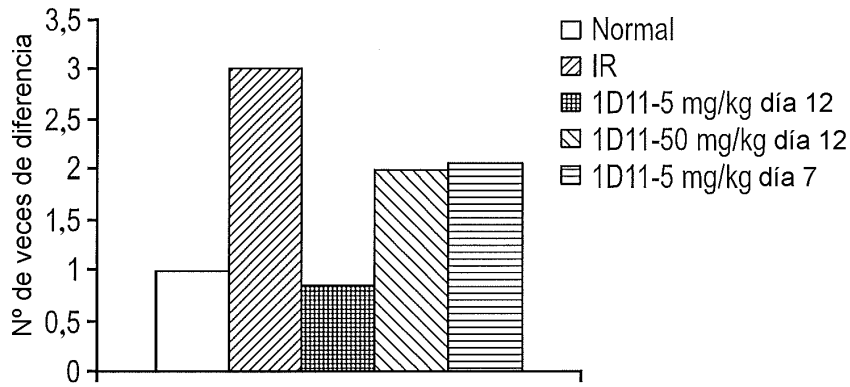


FIG. 27

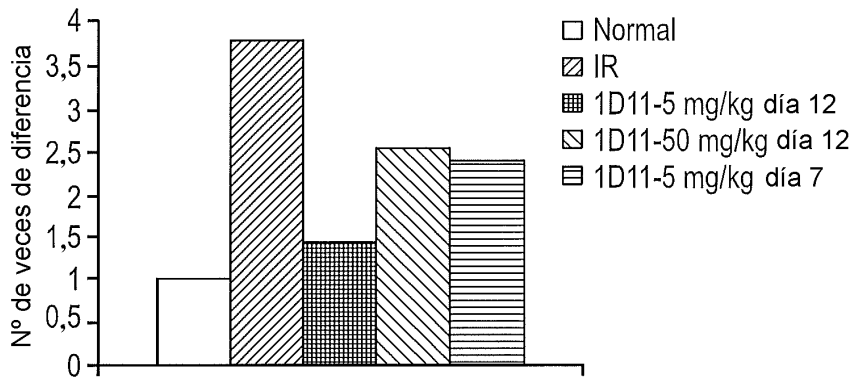


FIG. 28

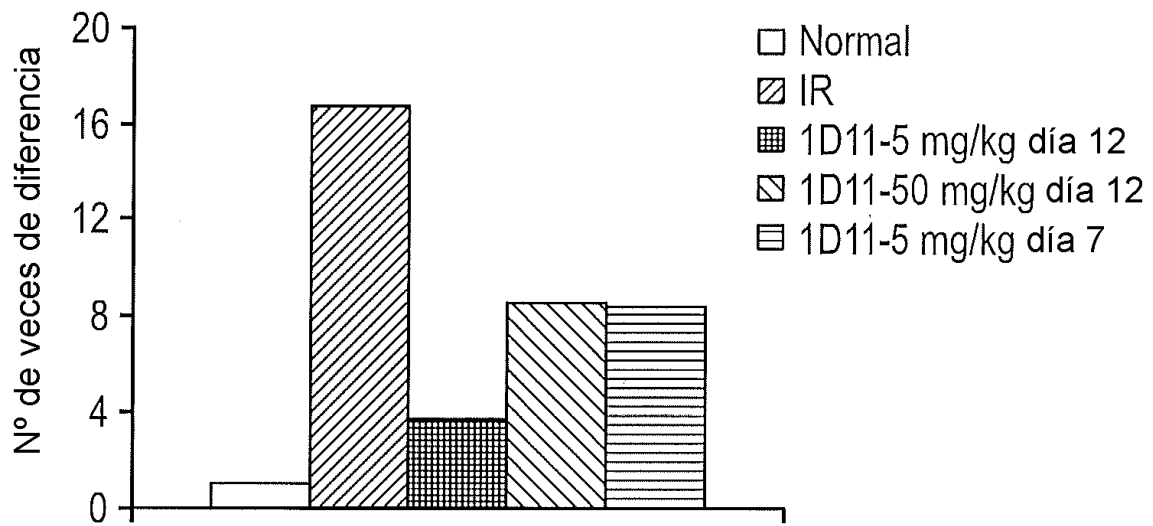


FIG. 29

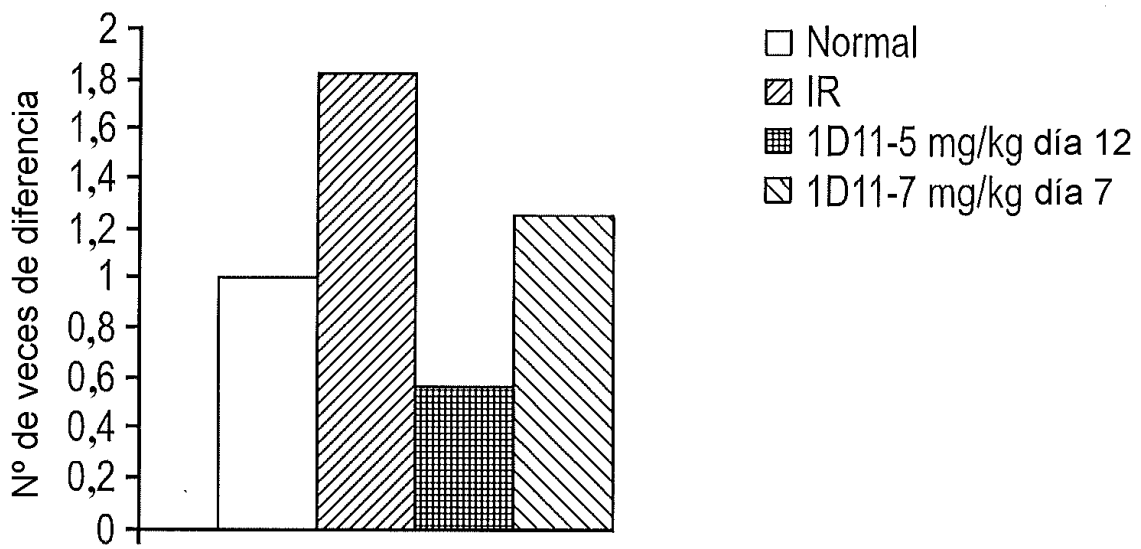


FIG. 30