

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 412**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2015 PCT/US2015/036284**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15195835**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2015 E 15809699 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3157561**

54 Título: **Anticuerpos Alfa-V Beta-8 mejorados**

30 Prioridad:

**17.06.2014 US 201462013114 P**

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

**17.08.2020**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)  
Milstein Building Granta Park Cambridge  
CB21 6GH, GB y  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NISHIMURA, STEPHEN;  
LOU, JIANLONG;  
CORMIER, ANTHONY;  
BARON, JODY LYNN;  
MARKS, JAMES D.;  
MURRAY, LYNNE;  
TSUI, PING y  
WU, YANLI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 779 412 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos Alfa-V Beta-8 mejorados

5 **REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente EE.UU. N.º de serie 62/013,114, presentada el 17 de junio de 2014.

10 **ANTECEDENTES**

15 El factor- $\beta$  de crecimiento transformante de citocinas multifuncional (TGF- $\beta$ ) afecta a las células inmunes, endoteliales, epiteliales y mesenquimales durante el desarrollo y la vida adulta en especies de invertebrados y vertebrados. TGF- $\beta$  desempeña un papel en el desarrollo de células T, cardíacas, pulmonares, vasculares y del paladar. Los ratones deficientes en TGF- $\beta$ 1 o bien mueren en el útero, debido a defectos en la vasculogénesis del saco vitelino, o bien sobreviven hasta la edad adulta con autoinmunidad multiorgánica severa. La delección genética del mediador de señalización de TGF- $\beta$  Smad2 revela que es esencial en el patrón temprano y la formación mesodérmica. Los ratones que carecen de Smad3 son viables y fértiles, pero presentan malformaciones de las extremidades, desregulación inmune, colitis, carcinomas de colon y agrandamiento alveolar. En los tejidos adultos, la ruta TGF- $\beta$  está implicada en las interacciones de células inmunes, mesenquimatosas y epiteliales para mantener la homeostasis en respuesta al estrés ambiental.

25 Las rutas homeostáticas mediadas por TGF- $\beta$  están perturbadas en respuesta a lesión repetitiva crónica. El TGF- $\beta$  es una citocina profibrogénica importante en respuesta a una lesión, lo que retrasa la cicatrización de la herida epitelial. El TGF- $\beta$  inhibe la proliferación y migración epitelial, promueve la apoptosis y expande el compartimento mesenquimatoso induciendo el reclutamiento de fibroblastos, la contractilidad de los fibroblastos y la deposición de la matriz extracelular. La transferencia intratraqueal de TGF- $\beta$ 1 recombinante adenoviral al pulmón de roedores aumenta drásticamente la acumulación de fibroblastos y la expresión de colágeno tipo I y tipo III alrededor de las vías respiratorias y en el intersticio pulmonar. Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  de neutralización pueden bloquear la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina o radiación.

35 La actividad de TGF- $\beta$  aumentada puede desempeñar un papel en la enfermedad pulmonar fibrótica, glomeruloesclerosis y reestenosis de los vasos cardíacos, mediada principalmente por TGF- $\beta$ 1. La función de TGF- $\beta$ 1 en seres humanos es compleja, tal como se indica por los trastornos hereditarios que implican o bien al TGF- $\beta$ 1 o bien sus efectores de señalización. Las mutaciones que aumentan la actividad de la ruta de TGF- $\beta$  conducen a defectos en el metabolismo óseo (es decir, enfermedad de Camurati-Engelmann), en el tejido conectivo (es decir, síndrome de Marfan), y en aneurismas aórticos (es decir, síndrome de Loeys-Dietz). Las mutaciones que conducen a una actividad disminuida de la ruta de TGF- $\beta$  se correlacionan con el cáncer. Sin embargo, el papel del TGF- $\beta$  como un supresor tumoral en el cáncer no es sencillo, debido a que el TGF- $\beta$  también puede potenciar el crecimiento tumoral y la metástasis.

40 A pesar de las múltiples funciones esenciales de TGF- $\beta$ , una dosis única de administración a corto plazo de un anticuerpo de neutralización de pan-TGF- $\beta$  se tolera bien. No se observan efectos secundarios en roedores a dosis que inhiben la fibrosis orgánica o el crecimiento de células de carcinoma y metástasis. Este tratamiento también inhibe eficazmente la fibrosis experimental. Se están realizando ensayos clínicos de fase única I/II con anticuerpos pan-TGF- $\beta$  de neutralización para el carcinoma de células renales metastásico, melanoma, glomeruloesclerosis segmentaria focal, y fibrosis pulmonar idiopática.

50 Algunas isoformas de TGF- $\beta$  se expresan de forma ubicua en mamíferos (TGF- $\beta$  1-3), pero se mantienen en forma inactiva por interacción no covalente con un propéptido, el dominio asociado a la latencia de TGF- $\beta$  (LAP). Para que TGF $\beta$  señale, debe liberarse de su complejo inactivo por un procedimiento denominado activación de TGF $\beta$ . El complejo de TGF latente incluye 3 componentes: el atenuador de TGF $\beta$  activo (maduro), LAP (péptido asociado a la latencia) y LTBP (proteína de unión a TGF $\beta$  latente).

55 LAP es un dímero, unido por dos enlaces disulfuro, que representa el extremo N-terminal de la proteína precursora de TGF $\beta$ . La proteína TGF $\beta$  madura representa el extremo C terminal del precursor, y forma un dímero unido por disulfuro de aproximadamente 25 kD. El enlace entre TGF $\beta$  y LAP se escinde proteolíticamente dentro del Golgi, pero el propéptido TGF- $\beta$  permanece unido al TGF $\beta$  por interacciones no covalentes. El complejo de TGF $\beta$  y LAP se denomina complejo latente pequeño (SLC). Es la asociación de LAP y TGF $\beta$  lo que confiere latencia. La unión de LAP-TGF $\beta$  es reversible y los componentes purificados aislados pueden recombinarse para formar un SLC inactivo. Tanto el SLC como el complejo más grande se denominan en el presente documento TGF- $\beta$  latente, ya que ambos están inactivos.

60 En general, las integrinas son moléculas de adhesión y median la unión de las células a las proteínas de la matriz extracelular. La integrina  $\alpha$ v $\beta$ 8 se une al LAP de TGF- $\beta$  y media la activación de TGF- $\beta$ 1 y 3 (Mu *et al.* (2002) J. Cell Biol. 159:493). La activación de TGF- $\beta$  mediada por integrina  $\alpha$ v $\beta$ 8 es necesaria para la activación *in vivo* de TGF- $\beta$  (es decir, la liberación del polipéptido TGF- $\beta$  maduro), por lo que  $\alpha$ v $\beta$ 8 es un guardián de la función de TGF- $\beta$ . La integrina  $\alpha$ v $\beta$ 8 se

expresa en epitelios normales (por ejemplo, epitelios de las vías respiratorias), células mesenquimales y tejidos neuronales. La activación mediada por la integrina  $\alpha\beta 8$  de TGF- $\beta$  puede dar como resultado COPD, fibrosis pulmonar, artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis hepática y renal, enfermedades autoinmunes cerebral inflamatorias y enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, MS, mielitis transversa, enfermedad de Devic, síndrome de Guillain-Barré), neuroinflamación, enfermedad renal y crecimiento del cáncer y metástasis (véase, por ejemplo, WO2013/026004).

## BREVE RESUMEN

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos (por ejemplo, monoclonales, recombinantes, y/o modificados químicamente) que se unen específicamente a la integrina  $\alpha\beta 8$  de modo que la unión del anticuerpo inhibe la liberación del péptido de TGF $\beta$  maduro activo, pero no inhibe significativamente la adhesión de TGF $\beta$  latente a  $\alpha\beta 8$  en una célula que expresa  $\alpha\beta 8$ , en la que el anticuerpo no incluye la secuencia de CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 37E1B5 (por ejemplo, SEQ ID NO:7). En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo en los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta 8$ , y al unirse, provoca un cambio conformacional en  $\beta 8$  que reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo que incluye la secuencia de SEQ ID NO:16. En algunos aspectos, al menos un aminoácido en una CDR del anticuerpo está glicosilado. En algunos aspectos, la CDR se selecciona de la CDR1, CDR2, CDR3 de cadena ligera, y la CDR1, CDR2, CDR3 de cadena pesada. Las CDR pueden determinarse según cualquier método conocido, por ejemplo, Kabat, Chothia, IMGT, o AbM. En algunos aspectos, el aminoácido glicosilado está en la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo. En algunos aspectos, el aminoácido glicosilado está en una posición correspondiente a la posición 10 del aminoácido en una cualquiera de SEQ ID NO:1-6.

Se proporcionan adicionalmente anticuerpos (por ejemplo, monoclonal, recombinantes, y/o modificados químicamente) que se unen de manera específica a la integrina  $\alpha\beta 8$  de modo que la unión del anticuerpo inhibe la liberación del péptido de TGF $\beta$  maduro activo, pero no inhiben de manera significativa la adhesión de TGF $\beta$  latente a  $\alpha\beta 8$  en una célula que expresa  $\alpha\beta 8$ , en la que el anticuerpo se une a un epítipo en los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta 8$ , y al unirse, provoca un cambio conformacional en  $\beta 8$  que reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo; y en la que el anticuerpo se modifica para comprender un aminoácido glicosilado heterólogo en al menos un aminoácido en una CDR del anticuerpo. Las CDR pueden determinarse según cualquier método conocido, por ejemplo, Kabat, Chothia, IMGT, o AbM. En algunos aspectos, la CDR se selecciona de la CDR1, CDR2, CDR3 de cadena ligera, y la CDR1, CDR2, CDR3 de cadena pesada. En algunos aspectos, el aminoácido glicosilado está en la CDR2 de cadena pesada del anticuerpo. En algunos aspectos, el aminoácido glicosilado está en una posición correspondiente a la posición 10 del aminoácido en una cualquiera de SEQ ID NO:1-6. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo que incluye la secuencia de SEQ ID NO:16. En algunos aspectos, el anticuerpo no comprende la secuencia de CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO:7.

En algunos aspectos, el anticuerpo, al unirse a  $\beta 8$ , reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en al menos 5° (por ejemplo, al menos 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, 11°, 12° o more) en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo, o en comparación con un anticuerpo que carece de un glicano en una CDR (por ejemplo, CDR2 de cadena pesada).

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo 14E5 o variante del mismo (por ejemplo, 2A8, 2A10, 2C6), en el que al menos un aminoácido en una CDR se modifica para introducir un aminoácido glicosilado. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo 11E8 o variante del mismo (por ejemplo, 2B8, 2A4), en el que al menos un aminoácido en una CDR se modifica para introducir un aminoácido glicosilado. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo 37E1B5 modificado, en el que el Asn en la posición 10 de SEQ ID NO:7 está sustituido, y la CDR2 de cadena pesada se modifica para introducir un aminoácido glicosilado en una posición diferente.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende las secuencias de CDR1 y CDR3 de cadena pesada de una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 18, y 19; las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:9, 23 y 24; y secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-3, en la que el Asn en la posición 12 (de SEQ ID NO:1-3) se reemplaza con Thr o Ser. En algunos aspectos, las secuencias de CDR1 y CDR3 de cadena pesada de una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, 20, 21, y 22; las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:11, 25, 26 y 27; y secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4-6, en la que el Asn en la posición 12 se reemplaza con Thr o Ser. De nuevo, las CDR pueden determinarse según cualquier método conocido (por ejemplo, Kabat, Chothia, IGMT, o AbM).

En algunos aspectos, el anticuerpo es humanizado. En algunos aspectos, el anticuerpo es un Fab, y F(ab)<sub>2</sub>, o un Fv de cadena única (scFv).

5 Se proporcionan además métodos de reducción de la señalización de TGF $\beta$  (reducción de la actividad de TGF $\beta$ , reducción de la liberación de TGF $\beta$  activo maduro) en un individuo, que comprende administrar un anticuerpo tal como se describió anteriormente al individuo, reduciendo así la señalización de TGF $\beta$  en el individuo. En algunos aspectos, el individuo tiene al menos un estado (enfermedad, trastorno) seleccionado del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, artritis, fibrosis hepática, un trastorno fibrótico pulmonar, una enfermedad autoinmune cerebral inflamatoria, esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neuroinflamación, enfermedad renal, adenocarcinoma, carcinoma escamoso, glioma, y carcinoma de mama; y la reducción de la señalización de TGF $\beta$  da como resultado una mejora del estado.

10 Se proporcionan también métodos para la producción de un anticuerpo recombinante específico para la integrina  $\alpha\beta 8$  que inhibe la liberación del péptido de TGF $\beta$  maduro, activo, que comprende modificar de manera recombinante un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se une a  $\beta 8$  para introducir un aminoácido glicosilado en una CDR del anticuerpo, y producir el anticuerpo (*por ejemplo* expresando en una línea celular o sintetizando químicamente), en el que, al unirse a  $\beta 8$ , el anticuerpo provoca un cambio conformacional que reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo en los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta 8$ . En algunos aspectos, el epítipo incluye la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:16.

20 En algunos aspectos, la modificación recombinante comprende introducir un sitio de glicosilación en la CDR (por ejemplo, para permitir el reconocimiento enzimático y la glicosilación del sitio). En algunos aspectos, la modificación recombinante comprende introducir un aminoácido que puede estar glicosilado en la CDR (por ejemplo, Asn, Ser, Thr, Tyr). En algunos aspectos, la modificación recombinante comprende introducir un aminoácido glicosilado no natural en la CDR. En algunos aspectos, la CDR es la CDR2 de cadena pesada. En algunos aspectos, el aminoácido glicosilado corresponde a la posición 10 del aminoácido de una cualquiera de SEQ ID NO:1-6 (por ejemplo, cuando la secuencia de CDR está óptimamente alineada a una cualquiera de SEQ ID NO:1-6). En algunos aspectos, el anticuerpo reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en al menos 5° (por ejemplo, al menos 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, 11°, 12° o más) en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo.

30 Se proporcionan adicionalmente métodos para la producción de un anticuerpo glicosilado específico para la integrina  $\alpha\beta 8$  que inhibe la liberación del péptido de TGF $\beta$  maduro, activo, produciendo un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se une a  $\beta 8$  y que comprende un aminoácido que puede estar glicosilado en una CDR (por ejemplo, Asn, Ser, Thr, Tyr), y glicosilando químicamente el aminoácido, en el que, al unirse a  $\beta 8$ , el anticuerpo provoca un cambio conformacional que reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo. En algunos aspectos, la producción comprende expresar el anticuerpo en una línea celular o sintetizar químicamente el anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo en los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta 8$ . En algunos aspectos, el epítipo incluye la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:16. En algunos aspectos, la CDR es la CDR2 de cadena pesada. En algunos aspectos, el aminoácido glicosilado corresponde a la posición 10 del aminoácido de una cualquiera de SEQ ID NO:1-6 (por ejemplo, cuando la secuencia de CDR está óptimamente alineada a una cualquiera de SEQ ID NO:1-6). En algunos aspectos, el anticuerpo reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta 8$  en al menos 5° (por ejemplo, al menos 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, 11°, 12° o más) en comparación con  $\beta 8$  que no está en contacto con el anticuerpo.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La **Figura 1** muestra la alineación de las secuencias de región variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos 11E8 y 14E5, y las variantes de los mismos. De la parte superior a la parte inferior, las secuencias se designan: SEQ ID NO:10, 18, 19, 10, 20-22, 9, 23, 24, 11, 25-27. La CDR y regiones de entramado indicadas corresponden a la numeración de Kabat.

50 **Figura 2.** A) Tinción de células 293 transfectadas de manera simulada y que expresan  $\beta 8$  que usan 37E1B5 (B5) en comparación con 37E1B5 desglicosiladas con PNGasaF (De-glicoB5); y 2A10 en comparación con 2A10 con el glicano modificado en CDR2 (NYT-2A10). B) Bioensayos de TGF $\beta$  de células 293 que expresan  $\beta 8$  tratadas con 37E1B5, 37E1B5 desglicosilado, 2A10 (NYT 2A10) desglicosilado, o 2A10 original (2.5 ug/ml). Los resultados muestran que la glicosilación de CDR2 de cadena pesada se correlaciona con la capacidad de bloqueo de la función \*\*\* <0.001, \*\* p <0.01. n = 4.

55 **Figura 3.** A) Diagrama de la cinta (PyMOL V1.1r1) de la estructura extendida, cerrada de la subunidad  $\beta 8$  generada por el modelado de homología (Modeller) a  $\alpha\beta 3$  (PDB 3IJE; Dong *et al.* (2012) Biochem. 51:8814). Modelado  $\beta 8$  (verde) con las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 7$  en rojo superpuestas en  $\alpha\beta 3$  (púrpura). Se indican los átomos del epítipo B5 en la hélice  $\alpha 1$  (R<sub>133</sub>, F<sub>137</sub>, F<sub>138</sub>). Se muestra el tripéptido RGD modelado basado en PDB 3ZDX (Askari *et al.* (2010) J Cell Biol 188: 891) unido a la bolsa de unión a ligando en el complejo con el catión MIDAS Ca<sup>2+</sup>. La distancia desde el borde de la bolsa de unión al ligando (A<sub>115</sub>) a R<sub>133</sub> del epítipo B5 es de 28 Å, indicada por flechas punteadas. Se indican los dominios de cabeza, híbrido y Psi. La subunidad  $\alpha\gamma$  y los dominios de pierna no están incluidos. B) Análisis de imagen que mide los ángulos del dominio de la cabeza-híbrido de  $\alpha\beta 8$  apretados y no apretados sin complejos Fab en comparación con Fabs de  $\alpha\beta 8$ -B5 o  $\alpha\beta 8$ -clon 68 purificados con SEC. Los ángulos individuales medidos a partir de promedios de clase donde los dominios de cabeza e híbridos estaban bien resueltos. N = 15, 24, 10, 15, 37 y 30 mediciones de promedios de clase de

solo apretado (cuadrados rellenos), apretado + Fab B5 (triángulos abiertos hacia arriba), apretado + clon 68 Fab (rombos rellenos), solo no apretado (abierto triángulos hacia abajo), no apretado + Fab B5 (círculos cerrados), no apretado + clon 68 Fab (cuadrados abiertos), respectivamente.  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  mediante ANOVA y prueba posterior de Tukey. Los recuadros dentro del gráfico debajo de cada grupo son promedios de clase EM representativos. Los ángulos promedio del dominio cabeza-híbrido ( $\pm$  s.e.m.) se muestran debajo de las micrografías. Bar = 10 nm. Las caricaturas a continuación representan Fab unido con los dominios de cabeza ( $\beta$ I) e híbridos indicados y los ángulos medidos.

**Figura 4.** Tinción EM negativa de  $\alpha\beta$ 8 en complejo con Fabs NYT-2A10 de tipo natural 2A10 y glicosilada, tal como se marcó. Se muestran los promedios de clase de  $> 10$  complejos proteicos individuales. Los ángulos se superponen en las micrografías inferiores para ilustrar las mediciones de ángulo de la cabeza-híbrido. La cuantificación de estos datos se muestra en el gráfico de la derecha con cada punto de datos que representa una medición de micrografías EM negativas promediadas por clase.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### I. Introducción

El anticuerpo 37E1B5 es específico para la subunidad  $\beta$ 8 de la integrina  $\alpha\beta$ 8. Al unirse a su diana, 37E1B5 tiene la propiedad única de inhibir la liberación del péptido TGF $\beta$  maduro activo, pero no inhibir significativamente la adhesión de TGF $\beta$  latente a  $\alpha\beta$ 8 en una célula que expresa  $\alpha\beta$ 8 (véanse los documentos WO2011/103490 y WO2013/026004).

La presente descripción revela que 37E1B5 con una única sustitución de aminoácidos que elimina el sitio de glicosilación en la cadena pesada CDR2 retiene la unión al antígeno, pero pierde la capacidad de bloquear la activación de TGF $\beta$ , lo que indica que se requiere el aminoácido sustituido para la función de bloqueo de TGF $\beta$ , y / o que el glicano en ese aminoácido se requiere para la función de bloqueo de TGF $\beta$ . Se ha desglicosilado químicamente el 37E1B5, conservando así la secuencia de aminoácidos, y se ha encontrado nuevamente que se mantiene la unión al antígeno, pero se pierde la función de bloqueo del TGF $\beta$ . Esto establece que la función biológica de 37E1B5 depende de la glicosilación en el CDR2 de cadena pesada, y que la capacidad funcional para bloquear la activación de TGF $\beta$  está desacoplada de su capacidad para unirse al antígeno ( $\beta$ 8).

Estudios estructurales coincidentes revelaron que Fab de 37E1B5 con la CDR2 de cadena pesada de glicosilación induce un cambio conformacional en  $\beta$ 8. El cambio no se induce por un Fab preparado a partir de otro anticuerpo  $\beta$ 8, el clon 68, que se une al mismo epítipo, pero no bloquea la activación de TGF $\beta$ . Se ha mostrado la glicosilación en la CDR2 de cadena pesada de otros anticuerpos, aunque normalmente reduce la actividad deseada del anticuerpo, por ejemplo, reduce la afinidad (Patente de los EE.UU. N.º 5714350).

Para someter a prueba si el glucano induce un cambio conformacional de  $\alpha\beta$ 8 que deteriora su capacidad de activar TGF $\beta$ , se ha introducido un glucano en el CDR2 de cadena pesada de un anticuerpo completamente no relacionado que une un epítipo en la subunidad  $\beta$ 8 que se superpone con el de 37E1B5. Se seleccionó el anticuerpo 2A10 (variante de 14E5). Los anticuerpos no relacionados tienen seis CDR con secuencias no relacionadas (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:21 y 26, en comparación con SEQ ID NO:12 y 13). De manera sorprendente, la glicosilación de la CDR2 de cadena pesada de 2A10 cambió su actividad de modo que el anticuerpo pudo inhibir la activación de TGF $\beta$  inducida por  $\alpha\beta$ 8. Además, el anticuerpo 2A10 glicosilado indujo un cambio conformacional en  $\beta$ 8 similar al inducido por 37E1B1, pero no por el anticuerpo 2A10 no glicosilado.

Los presentes resultados proporcionan un mecanismo más global para modificar la actividad de los anticuerpos al introducir glicanos en las regiones de los anticuerpos que median la interacción del epítipo.

### II. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto ordinario en la técnica. Véase, por ejemplo, Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4ª ed. 2007); Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Cualquier método, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica de esta presente descripción. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de determinados términos usados frecuentemente en el presente documento y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

Los términos "anticuerpo anti- $\alpha\beta$ 8", "anticuerpo específico de  $\alpha\beta$ 8", "anticuerpo  $\alpha\beta$ 8", y "anti- $\alpha\beta$ 8" se usan como sinónimos en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se une específicamente a  $\alpha\beta$ 8. De manera similar, un anticuerpo anti- $\beta$ 8 (y términos similares) se refieren a un anticuerpo que se une específicamente a  $\beta$ 8. Los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ 8 y anticuerpos anti- $\beta$ 8 descritos en el presente documento se unen a la proteína expresada en células que expresan  $\alpha\beta$ 8.

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

Las palabras "complementario" o "complementariedad" se refieren a la capacidad de un ácido nucleico en un polinucleótido para formar un par de bases con otro ácido nucleico en un segundo polinucleótido. Por ejemplo, la secuencia A-G-T es complementaria a la secuencia T-C-A. La complementariedad puede ser parcial, en la que solo algunos de los ácidos nucleicos coinciden según el emparejamiento de bases, o completa, en la que todos los ácidos nucleicos coinciden según el emparejamiento de bases.

Una variedad de métodos de mediciones específicas de ADN y ARN que usan técnicas de hibridación de ácidos nucleicos se conocen bien por los expertos en la técnica. (véase, Sambrook, *Id.*). Algunos métodos implican separación electroforética (por ejemplo, transferencia Southern para detectar ADN, y transferencia Northern para detección de ARN), pero la medición de ADN y ARN también puede realizarse en ausencia de separación electroforética (por ejemplo, PCR cuantitativa, transferencia puntual, o matriz).

Las palabras "proteína", "péptido", y "polipéptido" se usan de manera intercambiable para indicar un polímero aminoácido o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácido unidos o que interactúan. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido que se produce de manera natural, así como los polímeros de aminoácido que se producen de manera natural, aquellos que contienen residuos modificados y polímero de aminoácido que no se produce de manera natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos sintéticos y que se producen de manera natural, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que luego se modifican, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se produce de manera natural, por ejemplo, un  $\alpha$  carbono que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales de péptido modificado, pero retienen la misma estructura química básica como un aminoácido que se produce de manera natural. Los miméticos de aminoácido se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido que se produce de manera natural.

Se puede hacer referencia a los aminoácidos en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden ser referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Las "variantes conservativamente modificadas" se aplican tanto a las secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo, secuencias naturalmente contiguas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica para un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en determinados contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es un "variante conservativamente modificada" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Tales variantes conservativamente modificadas son además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de la presente descripción. Los siguientes aminoácidos son normalmente sustituciones conservativas

entre sí: 1) Alanina(A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

5 Los términos "idéntico" o "identidad en porcentaje," en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, o dos o más polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos, o aminoácidos, que son los mismos (es decir, una identidad de aproximadamente el 60%, preferiblemente el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o mayor identidad sobre una región especificada, cuando se compara y se alinea para la correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada), medido usando algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con parámetros predeterminados, o mediante alineación manual e inspección visual. Véase por ejemplo, el sitio web de NCBI en [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Entonces se dice que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere a, o puede aplicarse al cumplimiento de una secuencia de prueba de nucleótido. La definición también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Tal como se describe a continuación, los algoritmos pueden representar huecos y similares. Normalmente, la identidad existe sobre una región que comprende un epítipo de anticuerpo, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos en longitud, o sobre una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos en longitud, o sobre toda la longitud de la secuencia de referencia.

20 El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, ácido nucleico, proteína, vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de manera anormal, se expresan o no se expresan en absoluto.

30 El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce normalmente de manera recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para formar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

35 Un "aminoácido glicosilado heterólogo" se refiere a un aminoácido que es diferente del aminoácido en el anticuerpo original (por ejemplo, introducido de manera recombinante) o a un aminoácido que no está glicosilado en el anticuerpo original (por ejemplo, debido a la carencia de un sitio de glicosilación). En el primer caso, el aminoácido puede estar glicosilado (tal como Arg, Ser, Thr, o Cys) o un aminoácido no natural (glicosilado) puede estar sustituido por el aminoácido en el anticuerpo original. En este último caso, el anticuerpo original puede modificarse de manera recombinante para introducir un sitio de glicosilación enzimáticamente reconocido, o el anticuerpo original puede modificarse químicamente para introducir un glicano.

45 El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de entramado de un gen de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que se unen específicamente y reconocen un antígeno, por ejemplo,  $\beta 8$ , un marcador de superficie celular particular, o cualquier diana deseado. Normalmente, la "región variable" contiene la región de unión al antígeno del anticuerpo (o su equivalente funcional) y es más crítica en especificidad y afinidad de unión. Véase Paul, *Fundamental Immunology* (2003).

50 Una unidad estructural de la inmunoglobulina (anticuerpo) a modo de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

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

60 Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como cualquiera de varios fragmentos bien caracterizados que incluyen actividad de unión a antígeno específica. Tales fragmentos pueden producirse mediante digestión con diversas peptidasas. La pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir  $F(ab)'_2$ , un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a  $V_H-C_H1$  por un enlace disulfuro. El  $F(ab)'_2$  puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de la bisagra, convirtiendo

así el dímero de F (ab)<sub>2</sub> en un monómero de Fab'.

El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse de nuevo, o bien químicamente o bien mediante el uso de metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos o bien producidos por la modificación de anticuerpos completos, o bien los sintetizados de nuevo usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados usando bibliotecas de visualización de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)).

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

Tal como se usa en el presente documento, "región V" se refiere a un dominio de la región de anticuerpo variable que comprende los segmentos de Entramado 1, CDR1, Entramado 2, CDR2, Entramado 3, CDR3, y Entramado 4. Estos segmentos se incluyen en el segmento V como consecuencia de la reorganización de los genes de la región V de la cadena pesada y la cadena ligera durante la diferenciación de células B.

Tal como se usa en el presente documento, "región determinante de la complementariedad (CDR)" se refiere a las tres regiones hipervariables en cada cadena que interrumpen las cuatro regiones "marco" establecidas por las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2, y CDR3, numeradas secuencialmente desde el extremo N, y también se identifican normalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V<sub>H</sub> está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V<sub>L</sub> es el CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra..

Las secuencias de las regiones de entramado de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región de entramado de un anticuerpo, que son las regiones de entramado combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.

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

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable, CDR o porción de la misma) se une a una constante región de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico (por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.); o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada (por ejemplo, CDR y regiones de entramado de diferentes especies).

El anticuerpo se une a un "epítipo" en el antígeno. El epítipo es el sitio de interacción de unión al anticuerpo específico en el antígeno, y puede incluir algunos aminoácidos o porciones de algunos aminoácidos, por ejemplo, 5 ó 6, o más, por ejemplo, 20 o más aminoácidos, o porciones de esos aminoácidos. En algunos casos, el epítipo incluye componentes sin proteína, por ejemplo, de un hidrato de carbono, ácido nucleico, o lípido. En algunos casos, el epítipo es un resto tridimensional. Por tanto, por ejemplo, cuando la diana es una proteína, el epítipo puede estar compuesto por aminoácidos consecutivos o aminoácidos de diferentes partes de la proteína que se acercan mediante el plegamiento de proteínas (por ejemplo, un epítipo discontinuo). Lo mismo es cierto para otros tipos de moléculas diana que forman estructuras tridimensionales.

El término "se une específicamente" se refiere a una molécula (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a una diana con al menos afinidad 2 veces mayor que los compuestos no diana, por ejemplo, al menos 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, o 100 veces mayor afinidad. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a β8 se unirá normalmente a β8 con al menos una afinidad 2 veces mayor que una diana sin β8 (por ejemplo, una diferente subunidad de integrina, por ejemplo, β6).



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

Tal como se usa en el presente documento, un primer anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, "compite" para unirse a una diana con un segundo anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, cuando la unión del segundo anticuerpo con la diana se disminuye de manera detectable en presencia del primer anticuerpo en comparación con la unión del segundo anticuerpo en ausencia del primer anticuerpo. La alternativa, cuando la unión del primer anticuerpo a la diana también se reduce de manera detectable en presencia del segundo anticuerpo, puede, pero no necesariamente, ser el caso. Es decir, un segundo anticuerpo puede inhibir la unión de un primer anticuerpo a la diana sin que ese primer anticuerpo inhiba la unión del segundo anticuerpo a la diana. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de manera detectable la unión del otro anticuerpo a su epítipo o ligando afín, ya sea en el mismo grado mayor o menor, se dice que los anticuerpos "compiten entre sí" para la unión de su(s) epítipo(s) respectivo(s). Tanto los anticuerpos competidores como los que compiten entre sí están abarcados por la presente descripción. El término anticuerpo "competidor" puede aplicarse al primer o segundo anticuerpo como puede determinarse por un experto en la técnica. En algunos casos, la presencia del anticuerpo competidor (por ejemplo, el primer anticuerpo) reduce la unión del segundo anticuerpo a la diana en al menos el 10%, por ejemplo, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, o más, por ejemplo, de modo que la unión del segundo anticuerpo al objetivo es indetectable en presencia del primer anticuerpo (competidor).

Los términos "agonista," "activador," "inductor" y términos similares se refieren a moléculas que aumentan la actividad o la expresión en comparación con un control. Los agonistas son agentes que, por ejemplo, se unen para, estimular, aumentar, activar, aumentar la activación, sensibilizar o regular por incremento la actividad de la diana. La expresión o la actividad puede aumentarse el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% el 100% o más que eso en un control. En determinados casos, la activación es 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, o más en comparación con un control.

Los términos "inhibidor," "represor" o "antagonista" o "regulador por disminución" se refieren de manera intercambiable a sustancia que produce una expresión o nivel de actividad detectablemente más bajo en comparación con un control. La expresión o actividad inhibida puede ser el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o menos que eso en un control. En determinados casos, la inhibición es 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, o más en comparación con un control.

Una muestra o valor "control" se refiere a una muestra que sirve como referencia, normalmente una referencia conocida, para comparar con una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba puede tomarse de una condición de prueba, por ejemplo, en presencia de un compuesto de prueba, y compararse con muestras de condiciones conocidas, por ejemplo, en ausencia del compuesto de prueba (control negativo), o en presencia de un compuesto conocido (control positivo). Un control también puede representar un valor promedio obtenido de una serie de pruebas o resultados. Un experto en la técnica reconocerá que los controles pueden diseñarse para evaluar cualquier número de parámetros. Por ejemplo, de puede diseñar un control para comparar el beneficio terapéutico basado en datos farmacológicos (por ejemplo, semivida) o medidas terapéuticas (por ejemplo, comparación de beneficio y/o efectos secundarios). Los controles pueden diseñarse para aplicaciones *in vitro*. Un experto en la materia comprenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos basados en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la importancia de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado varían ampliamente en los controles, la variación en las muestras de prueba no se considerará significativa.

Una "etiqueta" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, marcas útiles incluyen <sup>32</sup>P, colorantes fluorescentes, reactivos electo-densos, enzimas (por ejemplo, tal como se usa comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas u otras entidades que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en un péptido o anticuerpo específicamente reactivo con un péptido diana. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar un anticuerpo con el marcador, por ejemplo, usando métodos descritos en Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

Una molécula "marcada" (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, o anticuerpo) es una que se une, o bien covalentemente, a través de un conector o enlace químico, o bien no covalentemente, a través de enlaces iónicos, van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno a un marcador de tal manera que la presencia de la molécula puede detectarse detectando la presencia del marcador unido a la molécula.

### III. Anticuerpos específicos para $\alpha\beta 8$

La integrina  $\beta 8$  comparte una estructura de dominio general con otras subunidades de integrina  $\beta$ , tal como se da a conocer en Mould *et al.* (2006) BMC Cell Biol. 7:24. La región de la cabeza incluye el dominio A, que es seguido por el dominio híbrido y el dominio PSI en la "rodilla" de la proteína. A la rodilla le sigue una pierna de repeticiones EGF, seguida por un dominio de cola  $\beta$ , un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Detalles adicionales están disponibles en la entrada de SwissProt P26012.

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos que se unen específicamente a integrina  $\alpha\beta 8$ , pero no se unen de manera significativa a otras integrinas (por ejemplo,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ , etc.). Los anticuerpos dados a conocer actualmente se unen a un epítipo específico o región de epítipo dentro de  $\beta 8$ , por ejemplo, dentro de los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta 8$ , de modo que la unión al anticuerpo interfiere con la capacidad de  $\alpha\beta 8$  mediar la liberación de TGF $\beta$  activo. En algunos aspectos, la unión al anticuerpo provoca un cambio conformacional en  $\beta 8$ . En algunos aspectos, el anticuerpo se glicosila en una región que interactúa con el epítipo  $\beta 8$ , por ejemplo, CDR1, CDR2, CDR3, y/o cualquier combinación de las mismas. El epítipo puede ser un epítipo conformacional (no lineal) o no conformacional. Un anticuerpo de ese tipo puede unirse a  $\beta 8$  solo, es decir, el epítipo está ubicado dentro de  $\beta 8$ , o a un epítipo no lineal que comprende partes de ambas subunidades, o un epítipo que se basa en la interacción de  $\alpha$  y  $\beta 8$ .

Los presentes anticuerpos incluyen los anticuerpos específicos de  $\alpha\beta 8$  descritos anteriormente, así como versiones humanizadas, quiméricas, y/o marcadas de los mismos, y fragmentos de unión a  $\alpha\beta 8$  y/o variantes de los mismos. El isotopo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 puede usarse para anticuerpos humanizados o quiméricos. Algunos anticuerpos se unen específicamente a  $\alpha\beta 8$  con una afinidad de unión mayor que o igual a aproximadamente  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ , o  $10^{12}$  M $^{-1}$  (por ejemplo, con una Kd en el rango micromolar ( $10^{-6}$ ), nanomolar ( $10^{-9}$ ), picomolar ( $10^{-12}$ ), o inferior).

En algunos aspectos, el anticuerpo se une a  $\beta 8$  e inhibe la activación de TGF $\beta$ , por ejemplo, en comparación con la activación de TGF $\beta$  en ausencia del anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo no reduce la adhesión de células que expresan  $\alpha\beta 8$  a TGF $\beta$ , es decir, el anticuerpo no reduce la adhesión de células mediada por  $\alpha\beta 8$  a TGF $\beta$ . En algunos aspectos, el anticuerpo se glicosila, y el anticuerpo glicosilado inhibe la activación de TGF $\beta$ , por ejemplo, en comparación con la activación de TGF $\beta$  en ausencia del anticuerpo, o en comparación con la activación de TGF $\beta$  en presencia del anticuerpo no glicosilado.

En algunos aspectos, el anticuerpo puede unirse a un epítipo en  $\beta 8$  que incluye o está dentro de SEQ ID NO:16. El sitio de unión, es decir, el epítipo, de un anticuerpo producido frente a un antígeno dado puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ensayo de competición (por ejemplo, un ELISA competitivo) puede llevarse a cabo usando un anticuerpo con un epítipo conocido. Si el anticuerpo de prueba compite por la unión al antígeno, entonces es probable que comparta al menos parte del mismo epítipo. El epítipo también puede estar ubicado usando intercambio de dominio o mutagénesis selectiva del antígeno. Es decir, cada región, o cada aminoácido, del antígeno puede "intercambiarse", sustituirse con aminoácidos o componentes que se sabe que no interactúan con el anticuerpo de prueba. Si la sustitución de una región o aminoácido dada reduce la unión del anticuerpo de prueba al antígeno sustituido en comparación con el antígeno no sustituido, entonces esa región o aminoácido probablemente esté implicada en el epítipo.

La lista de secuencias informal proporciona ejemplos de tales anticuerpos, y muestra regiones variables de cadena pesada y ligera de 37E1B5, 11E8, 14E5 tal como se da a conocer en los documentos WO2011/103490 y WO2013/026004. Las CDR 1-3 (Kabat) se indican con subrayado en negrita. Se muestran las variantes de los anticuerpos 11E8 y 14E5 en la Figura 1.

#### IV. Detección de la actividad de TGF $\beta$

Para determinar el efecto de un anticuerpo sobre la actividad de TGF $\beta$ , varios bioensayos de TGF $\beta$  están disponibles. Por ejemplo, la activación de TGF $\beta$  puede someterse a prueba en un ensayo de cocultivo. Las células de prueba que expresan  $\alpha\beta 8$  se cocultivan con células TMLC, es decir, células epiteliales de pulmón de visón transfectadas de manera estable con un fragmento promotor sensible a TGF- $\beta$  que conduce el gen de la luciferasa (Abe *et al.* (1994) Annal Biochem 216:276). Las células TMLC son altamente sensibles al TGF $\beta$  con un fondo muy bajo de activación de TGF $\beta$ . Por lo tanto, las células TMLC pueden usarse en cocultivo con otras líneas celulares o fracciones libres de células para evaluar la presencia de TGF $\beta$  activo usando luminiscencia como lectura. Los ensayos pueden realizarse en presencia o ausencia de un anticuerpo de bloqueo de TGF $\beta$  control (por ejemplo, 10  $\mu$ g/ml, 1D11; R&D Systems).

Para medir el TGF $\beta$  activo en el tejido tumoral, pueden picarse pesos iguales del tejido tumoral e incubarse en DME estéril durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes que contienen TGF $\beta$  activo pueden recogerse después de la centrifugación (20 g) a 4°C. Los sedimentos pueden incubarse en DME sin suero durante 20 minutos a 80°C para activar SLC, después de lo cual pueden colectarse los sobrenadantes. Los sobrenadantes que contienen TGF $\beta$  activo o activado por calor (latente) se añaden luego a células TMLC sembradas en placas previamente con o sin 1D11. Para los ensayos de inhibidores de proteasa, se añaden inhibidores en la iniciación del cocultivo. La dosis máxima de cada inhibidor se define como la concentración más alta que no inhibe la capacidad de las células TMLC para responder al TGF $\beta$  activo recombinante. Para medir la actividad soluble de TGF $\beta$  de las células cultivadas, las células se incuban en 100  $\mu$ l de medio completo con o sin 37E1 o 10D5 durante 1 hora a 37°C con rotación suave. Los sobrenadantes libres de células se recogen por centrifugación (20 g) durante 5 minutos a 4°C y luego se añaden a las células TMLC sembradas en placas

previamente en presencia o ausencia de 1D11. Para los ensayos de receptor soluble, se usa medio condicionado obtenido de cultivos de células durante la noche. Las unidades de luciferasa relativas se definen como actividad menos la actividad de fondo de las células indicadoras de TMLC.

## 5 V. Métodos para la producción y modificación de anticuerpos

Para la preparación y uso de anticuerpos adecuados como se describe en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos recombinantes o monoclonales, pueden usarse muchas técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, págs. 77-96 en *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *antibodies, A Laboratory Manual* (1988); y Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986)). Los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés pueden clonarse por ejemplo, los genes que codifican para un anticuerpo monoclonal puede clonarse de un hibridoma y usarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las bibliotecas de genes que codifican para cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales también pueden hacerse a partir de hibridoma o células plasmáticas. Las combinaciones aleatorias de los productos génicos de la cadena pesada y ligera generan un gran conjunto de anticuerpos con diferente especificidad antigénica. (véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology* (3ª ed. 1997)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única o anticuerpos recombinantes (patente EE.UU. 4,946,778, patente EE.UU. No. 4,816,567) pueden adaptarse para producir anticuerpos frente a polipéptidos de esta presente descripción. Además, los ratones transgénicos u otros organismos como otros mamíferos pueden usarse para expresar anticuerpos humanizados o humanos. (véase, por ejemplo, patente EE.UU. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); y Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)). Alternativamente, la tecnología de visualización de fagos o levaduras puede usarse para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992); Lou *et al.* (2010) *PEDS* 23:311). Los anticuerpos también pueden hacerse biespecíficos, es decir, pueden reconocer dos antígenos diferentes (véase, por ejemplo, el documento WO 93/08829, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos covalentemente o inmunotoxinas (véase, por ejemplo, patente EE.UU. N.º 4,676,980, documentos WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

En el contexto de la presente descripción, los anticuerpos recombinantes pueden producirse a partir de un anticuerpo monoclonal (o policlonal) original de manera que un aminoácido que se puede glicosilar (por ejemplo, química o enzimáticamente) o un sitio de glicosilación (reconocido por una enzima de glicosilación) se incorpora a la región variable, por ejemplo un CDR. La glicosilación puede estar unida a N, unida a O, unida a fosfo, o unida a C. La glicosilación ligada a N se produce normalmente en Asn. Un sitio de glicosilación de enlace N canónico es Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, en el que Xaa no es Pro. La glicosilación ligada a O se produce en los residuos Ser, Thr, y Tyr, así como la hidroxilisina y la hidroxiprolina, y puede llevarse a cabo mediante la O-GlcNAc transferasa. El enlace de fosfo puede producirse en fosfoserina. El enlace C puede producirse en Trp, y un sitio de enlace C canónico es Trp-Ser/Thr-Xaa-Cys.

El anticuerpo puede producirse de forma recombinante de modo que se introduce un aminoácido glicosilado durante la traducción del anticuerpo, en lugar de durante el procesamiento postraduccional o el análisis *in vitro*. Se dan a conocer sistemas para introducir aminoácidos no naturales, por ejemplo, en Chin (2011) *EMBO* 30:2307; Kaya *et al.* (2009) *ChemBioChem* 10:2858; Wang *et al.* (2006) *Annu Rev Biophys Biomol Rev* 35:225.

Los anticuerpos pueden producirse usando cualquier número de sistemas de expresión, incluyendo sistemas de expresión procariotas y eucariotas. En algunos aspectos, el sistema de expresión es una expresión de célula de mamífero, tal como un hibridoma o un sistema de expresión de células CHO. Muchos de estos sistemas están ampliamente disponibles en proveedores comerciales. En aspectos en los que un anticuerpo comprende tanto una región V<sub>H</sub> como V<sub>L</sub>, las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden expresarse usando un único vector, por ejemplo, en una unidad de expresión di-cistrónica, o bajo el control de diferentes promotores. En otros aspectos, la región V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> puede expresarse usando vectores independientes. Una región V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> tal como se describe en el presente documento puede comprender opcionalmente una metionina en el extremo N terminal.

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

También se conocen en la técnica métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de importación, que generalmente se toman de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)), mediante la sustitución de las secuencias de CDR o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente EE.UU. N.º 4,816,567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

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

La especificidad de la unión del anticuerpo puede definirse en cuanto a las constantes de disociación comparativas (Kd) del anticuerpo para la diana (por ejemplo,  $\beta 8$ ) en comparación con la constante de disociación con respecto al anticuerpo y otros materiales en el entorno o moléculas no relacionadas en general. Normalmente, la Kd para el anticuerpo con respecto al material no relacionado será al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces o mayor que Kd con respecto a la diana.

La afinidad deseada para un anticuerpo, por ejemplo, alta (pM a baja nM), media (baja nM a 100nM), baja (aproximadamente 100nM o superior), puede diferir dependiendo de si se está usando como diagnóstico o terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo con afinidad media puede ser más exitoso en la ubicación del tejido deseado en comparación con uno con una alta afinidad. Por tanto, los anticuerpos que tienen diferentes afinidades pueden utilizarse para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Un resto de direccionamiento normalmente se unirá con una Kd de menos de aproximadamente 1000 nM, por ejemplo, menos de 250, 100, 50, 20 o nM inferior. En algunos aspectos, la Kd del agente de afinidad es menos de 15, 10, 5, o 1 nM. En algunos aspectos, la Kd es 1-100 nM, 0.1-50 nM, 0.1-10 nM, o 1-20 nM. El valor de la constante de disociación (Kd) puede determinarse mediante métodos bien conocidos, y puede calcularse incluso para mezclas complejas mediante los métodos tal como se da a conocer, por ejemplo, en Caceci *et al.*, Byte (1984) 9:340-362.

La afinidad de un anticuerpo, o cualquier agente de direccionamiento, para una diana puede determinarse según los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se revisó en Ernst *et al.* Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal antibodies (Wiley & Sons ed. 2009).

Puede usarse ELISA cuantitativo, y métodos de afinidad basados en matrices similares. ELISA (Ensayo de señalización inmunoabsorbente ligado a enzimas) es un método basado en anticuerpos. En algunos casos, un anticuerpo específico para la diana de interés se fija a un sustrato y se pone en contacto con una muestra sospechosa de contener la diana. Entonces se lava la superficie para eliminar sustancias no unidas. La unión a la diana puede detectarse en una variedad de maneras, por ejemplo, usando una segunda etapa con un anticuerpo marcado, marcado directo de la diana, o marcado del anticuerpo primario con un marcador que es detectable tras la unión al antígeno. En algunos casos, el antígeno se fija al sustrato (por ejemplo, usando un sustrato con alta afinidad para las proteínas, o una interacción estreptavidina-biotina) y se detecta usando un anticuerpo marcado (u otro resto de direccionamiento). Se han desarrollado varias permutaciones de los métodos ELISA originales y se conocen en la técnica (véase Lequin (2005) Clin. Chem. 51: 2415-18 for a review).

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

La afinidad de unión también puede determinarse anclando un interactuante biotinilado a un chip de sensor de estreptavidina (SA). Entonces se pone en contacto el otro interactuante con el chip y se detecta, por ejemplo, tal como se describe en Abdessamad *et al.* (2002) Nuc. Acids Res. 30:e45.

## VI. Ejemplos

**Ejemplo 1**

5 Se requiere un glicano en CDR2 de 37E1B5 para la actividad de bloqueo total de TGFβ, pero no para unirse a β8. Se ha sometido a prueba una variante de 37E1B5 con una única sustitución de aminoácido para interrumpir el sitio de glicosilación en CDR2 de cadena pesada (posición de aminoácido en SEQ ID NO: 7). El anticuerpo no pudo bloquear la activación y liberación de TGFβ.

10 La presencia de un sitio de glicosilación canónica, sin embargo, no necesariamente indica que la glicosilación se produce en ese sitio. Por tanto, el cambio en la actividad de la variante 37E1B5 podría deberse o bien a la falta de glicosilación, o bien al aminoácido sustituido.

15 Se ha desglicosilado 37E1B5 usando péptido -N-glicosidasa F (PNGasa F), conservando de ese modo la secuencia de aminoácido (CDR2 de cadena pesada se representa por SEQ ID NO:7). Tal como se muestra en la Figura 2A, 37E1B5 (B5) y 37E1B5 desglicosilado (de-glicoB5) se unen a β8 con afinidad igual. La figura 2B, sin embargo, muestra que el 37E1B5 desglicosilado no bloquea la activación de TGFβ. Los resultados indican que la glicosilación en la CDR2 de cadena pesada de 37E1B5 afecta la capacidad del anticuerpo de bloquear la activación de TGFβ.

20 Se ha modificado por ingeniería un sitio de glicosilación en la cadena pesada de la CDR2 de un anticuerpo no relacionado, 2A10 (véase la figura 1). El anticuerpo 2A10 es una variante del anticuerpo monoclonal 14E5, y se une a un epítipo que se superpone con el del 37E1B5, pero no inhibe la activación de TGFβ por αβ8. Las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de los anticuerpos 2A10 y 37E1B5 comparten el 38% y el 44% de identidad, respectivamente.

25 Se introdujo un sitio de glicosilación en la cadena pesada CDR2 de 2A10 sustituyendo el Asn en la posición 12 de SEQ ID NO:2 con un Thr. Esto da como resultado la glicosilación en el Asn en la posición 10 de SEQ ID NO:2.

30 De manera sorprendente, se ha observado resultados similares a los de las formas glicosiladas y no glicosiladas de 37E1B5 con las formas glicosiladas y no glicosiladas de 2A10. Es decir, la glicosilación de 2A10 convirtió la función del anticuerpo 2A10 de modo que pudiera inhibir la activación de TGFβ por αβ8. La figura 2A muestra que 2A10 no glicosilado (2A10) y 2A10 glicosilado (NYT-2A10) se unen a β8 con afinidad igual. La figura 2B, sin embargo, muestra que el 2A10 no glicosilado no bloquea la activación de TGFβ, mientras que el 2A10 glicosilado lo hace. Los resultados indican que la glicosilación tiene un papel más global en la capacidad de un anticuerpo de unión a β8 para bloquear la activación de TGFβ.

35 **Ejemplo 2**

Se ha llevado a cabo estudios estructurales con el Fab de 37E1B5 y el Fab del clon 68 del anticuerpo. El clon 68 se une a un epítipo en β8 que se superpone con el de 37E1B5, pero no inhibe la activación y liberación de TGFβ.

40 Un diagrama de cinta de los dominios de cabeza e híbridos de β8 se muestra en la figura 3A. La figura indica la orientación normal de β8 unido a RGD (izquierda superior), y los aminoácidos incluidos en el epítipo de 37E1B5 (derecha).

45 La figura 3B muestra que el Fab 37E1B5 que bloquea el TGFβ provoca una sutil flexión hacia adentro del ángulo del dominio de la cabeza híbrida β8 al unirse. Este cambio no se observa para el control sin anticuerpo, o para el anticuerpo 68 Fab sin bloqueo. La flexión dependiente de 37E1B5 se produjo tanto en las formas unidas como no unidas de β8. Los resultados indican que la actividad de inhibición de TGFβ de 37E1B5 está mediada por el cambio conformacional en β8 al unirse al anticuerpo.

50 **Ejemplo 3**

Los resultados combinados hasta ahora demuestran que la capacidad de un anticuerpo específico de β8 para inhibir la activación de TGFβ mediada por αβ8 se ve afectada por la glicosilación de la CDR2 de cadena pesada, y por la capacidad del anticuerpo para inducir un cambio conformacional en β8 al unirse.

55 Para determinar si la glicosilación está implicada en el cambio conformacional en β8, se ha realizado un análisis estructural de los Fabs de anticuerpos 2A10 glicosilados y no glicosilados. Al igual que con 37E1B5, un glicano en CDR2 de cadena pesada de 2A10 induce un cambio conformacional en el ángulo de la cabeza-híbrido de β8. La figura 4 muestra los resultados. El 2A10 glicosilado (Fab NYT 2A10) induce una reducción similar en el ángulo de cabeza-híbrido de β8 como el 37E1B5 glicosilado. Los resultados indican que la glicosilación de un anticuerpo que se une a la región de cabeza y/o región de β8 puede inducir un cambio conformacional en β8, e inhibe su capacidad para activar TGFβ.

**VII. Lista de Secuencia Informal**

65 CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 11E8 (SEQ ID NO:1)

# ES 2 779 412 T3

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

CDR2 de cadena pesada de los anticuerpos 11E8mut94 y 14E5 (2A10) (SEQ ID NO:2)

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

CDR2 de cadena pesada de 11E8mut39 (SEQ ID NO:3)

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

CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 14E5 (SEQ ID NO:4)

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

15 CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 14E5mut68 (SEQ ID NO:5)

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

CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 14E5 (2C6) (SEQ ID NO:6)

20 His Ile Leu Pro Gly Ser Ala Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

CDR2 de cadena pesada de los anticuerpos 37E1B5 y 37E1B5 humanizado (SEQ ID NO:7)

25 Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Ser Leu Lys

Región variable de cadena pesada del anticuerpo 11E8 (SEQ ID NO:8)

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Thr Gly Ala  
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser **Ser Tyr**  
**Trp Ile Glu** Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
Gly **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe**  
**Lys Gly** Arg Ala Thr Val Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Tyr Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
Ala Thr **Trp Gly Trp Asp Thr Tyr** Trp Asp Gln Gly Thr Ser Val Thr  
Val Ser Ser

30 Región variable de cadena ligera del anticuerpo 11E8 (SEQ ID NO:9)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys **Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr**  
**Leu Asn** Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
Tyr **Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser** Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys **Gln Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Tyr**  
**Thr** Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

35 Región variable de cadena pesada del anticuerpo 14E5 (SEQ ID NO:10)

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala  
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser **Thr Tyr**  
**Trp Ile Glu** Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
Gly **His Ile Leu Pro Gly Ser Val Ile Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe**  
**Lys Gly** Lys Ala Ala Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ser Tyr  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
Ala Arg **Trp Gly Trp Asp Ser Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
Val Ser Ser

40 Región variable de cadena ligera del anticuerpo 14E5 (SEQ ID NO:11)

# ES 2 779 412 T3

Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ser  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Thr Leu Leu Ile  
Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## Región variable de cadena pesada del anticuerpo 37E1B5 (SEQ ID NO:12)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Asn Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Val Phe Ser Arg Tyr  
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Ser Leu  
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
Leu Gln Met Asn Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
Ala Cys Leu Ile Thr Thr Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val  
5 Thr Val Ser Ser

## Región variable de cadena ligera del anticuerpo 37E1B5 (SEQ ID NO:13)

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly  
Glu Arg Val Thr Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
Tyr Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr  
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala  
10

## Región variable de cadena pesada del anticuerpo 37E1B5 humanizado (SEQ ID NO:14)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Val Phe Ser Arg Tyr  
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Ser Ser Leu  
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
Ala Ser Leu Ile Thr Thr Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
Thr Val Ser Ser

## 15 Región variable de cadena ligera del anticuerpo 37E1B5 humanizado (SEQ ID NO:15)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
Tyr Tyr Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## Epítipo de integrina beta 8 a modo de ejemplo (SEQ ID NO:16)

20

Ser Arg Lys Met Ala Phe Phe

## Integrina beta 8 humana de longitud completa (SEQ ID NO:17)

ES 2 779 412 T3

Met Cys Gly Ser Ala Leu Ala Phe Phe Thr Ala Ala Phe Val Cys Leu  
Gln Asn Asp Arg Arg Gly Pro Ala Ser Phe Leu Trp Ala Ala Trp Val  
Phe Ser Leu Val Leu Gly Leu Gly Gln Gly Glu Asp Asn Arg Cys Ala  
Ser Ser Asn Ala Ala Ser Cys Ala Arg Cys Leu Ala Leu Gly Pro Glu  
Cys Gly Trp Cys Val Gln Glu Asp Phe Ile Ser Gly Gly Ser Arg Ser  
Glu Arg Cys Asp Ile Val Ser Asn Leu Ile Ser Lys Gly Cys Ser Val  
Asp Ser Ile Glu Tyr Pro Ser Val His Val Ile Ile Pro Thr Glu Asn  
Glu Ile Asn Thr Gln Val Thr Pro Gly Glu Val Ser Ile Gln Leu Arg  
Pro Gly Ala Glu Ala Asn Phe Met Leu Lys Val His Pro Leu Lys Lys  
Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Val Asp Val Ser Ala Ser Met His  
Asn Asn Ile Glu Lys Leu Asn Ser Val Gly Asn Asp Leu Ser Arg Lys  
Met Ala Phe Phe Ser Arg Asp Phe Arg Leu Gly Phe Gly Ser Tyr Val  
Asp Lys Thr Val Ser Pro Tyr Ile Ser Ile His Pro Glu Arg Ile His  
Asn Gln Cys Ser Asp Tyr Asn Leu Asp Cys Met Pro Pro His Gly Tyr  
Ile His Val Leu Ser Leu Thr Glu Asn Ile Thr Glu Phe Glu Lys Ala  
Val His Arg Gln Lys Ile Ser Gly Asn Ile Asp Thr Pro Glu Gly Gly  
Phe Asp Ala Met Leu Gln Ala Ala Val Cys Glu Ser His Ile Gly Trp  
Arg Lys Glu Ala Lys Arg Leu Leu Leu Val Met Thr Asp Gln Thr Ser  
His Leu Ala Leu Asp Ser Lys Leu Ala Gly Ile Val Val Pro Asn Asp  
Gly Asn Cys His Leu Lys Asn Asn Val Tyr Val Lys Ser Thr Thr Met  
Glu His Pro Ser Leu Gly Gln Leu Ser Glu Lys Leu Ile Asp Asn Asn  
Ile Asn Val Ile Phe Ala Val Gln Gly Lys Gln Phe His Trp Tyr Lys  
Asp Leu Leu Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ile Ala Gly Glu Ile Glu Ser  
Lys Ala Ala Asn Leu Asn Asn Leu Val Val Glu Ala Tyr Gln Lys Leu  
Ile Ser Glu Val Lys Val Gln Val Glu Asn Gln Val Gln Gly Ile Tyr  
Phe Asn Ile Thr Ala Ile Cys Pro Asp Gly Ser Arg Lys Pro Gly Met  
Glu Gly Cys Arg Asn Val Thr Ser Asn Asp Glu Val Leu Phe Asn Val  
Thr Val Thr Met Lys Lys Cys Asp Val Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala  
Ile Ile Lys Pro Ile Gly Phe Asn Glu Thr Ala Lys Ile His Ile His  
Arg Asn Cys Ser Cys Gln Cys Glu Asp Asn Arg Gly Pro Lys Gly Lys  
Cys Val Asp Glu Thr Phe Leu Asp Ser Lys Cys Phe Gln Cys Asp Glu  
Asn Lys Cys His Phe Asp Glu Asp Gln Phe Ser Ser Glu Ser Cys Lys  
Ser His Lys Asp Gln Pro Val Cys Ser Gly Arg Gly Val Cys Val Cys  
Gly Lys Cys Ser Cys His Lys Ile Lys Leu Gly Lys Val Tyr Gly Lys  
Tyr Cys Glu Lys Asp Asp Phe Ser Cys Pro Tyr His His Gly Asn Leu  
Cys Ala Gly His Gly Glu Cys Glu Ala Gly Arg Cys Gln Cys Phe Ser  
Gly Trp Glu Gly Asp Arg Cys Gln Cys Pro Ser Ala Ala Ala Gln His  
Cys Val Asn Ser Lys Gly Gln Val Cys Ser Gly Arg Gly Thr Cys Val  
Cys Gly Arg Cys Glu Cys Thr Asp Pro Arg Ser Ile Gly Arg Phe Cys  
Glu His Cys Pro Thr Cys Tyr Thr Ala Cys Lys Glu Asn Trp Asn Cys  
Met Gln Cys Leu His Pro His Asn Leu Ser Gln Ala Ile Leu Asp Gln  
Cys Lys Thr Ser Cys Ala Leu Met Glu Gln Gln His Tyr Val Asp Gln  
Thr Ser Glu Cys Phe Ser Ser Pro Ser Tyr Leu Arg Ile Phe Phe Ile  
Ile Phe Ile Val Thr Phe Leu Ile Gly Leu Leu Lys Val Leu Ile Ile  
Arg Gln Val Ile Leu Gln Trp Asn Ser Asn Lys Ile Lys Ser Ser Ser  
Asp Tyr Arg Val Ser Ala Ser Lys Lys Asp Lys Leu Ile Leu Gln Ser  
Val Cys Thr Arg Ala Val Thr Tyr Arg Arg Glu Lys Pro Glu Glu Ile  
Lys Met Asp Ile Ser Lys Leu Asn Ala His Glu Thr Phe Arg Cys Asn  
Phe



**REIVINDICACIONES**

1. Método de producción de un anticuerpo recombinante que inhibe la liberación del péptido TGF $\beta$  maduro activo, que comprende:
- 5 identificar un anticuerpo que se une a un epítipo en los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta$ 8; modificar de manera recombinante la secuencia de CDR2 de cadena pesada para introducir un sitio de glicosilación; y expresar el anticuerpo, en el que, al unirse a  $\beta$ 8, el anticuerpo provoca un cambio conformacional que reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta$ 8 en comparación con  $\beta$ 8 que no está en contacto con el anticuerpo.
- 10 2. Método de producción de un anticuerpo glicosilado que inhibe la liberación del péptido TGF $\beta$  maduro activo, que comprende:
- identificar un anticuerpo que se une a un epítipo en los dominios de cabeza y/o híbridos de  $\beta$ 8, y que comprende un aminoácido que puede estar glicosilado en la secuencia de CDR2 de cadena pesada; expresar el anticuerpo; y
- 15 glicosilar químicamente el aminoácido, en el que, al unirse a  $\beta$ 8, el anticuerpo provoca un cambio conformacional que reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta$ 8 en comparación con  $\beta$ 8 que está en contacto con el anticuerpo sin la glicosilación química.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo recombinante o glicosilado se une a un epítipo que comprende SEQ ID NO: 16.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que, al unirse a  $\beta$ 8, el anticuerpo recombinante o glicosilado reduce el ángulo entre los dominios de cabeza e híbridos de  $\beta$ 8 en al menos 5° en comparación con  $\beta$ 8 que no está en contacto con el anticuerpo.
- 25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el aminoácido que está glicosilado corresponde a la posición 10 del aminoácido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-6.

FIGURA 1

Aminoácidos mutantes 11E8/14E5 con KD de scFv

<b>VH</b>	Entramado 1	CDR1	Entramado 2	CDR2
<u>11E8</u>	EVQLQQSGPELTKTASVKISKATGYTFS	SYWIE	WVKQRPGHGLEWIG	DILPGSGTNNYNEKFKG
<u>2B8</u>	EVQLQQSGPELTKTASVKISKATGYTFS	SYWIE	WVKQRPGHGFEGWIG	DILPGSGTNNYNEKFEFEG
<u>2A4</u>	EVQLQQSGPELTKTASVKISKATGYTFS	SSWIE	WVKQRPGHGFEGWIG	DILPGSGTNNYNEKFEFEG
<u>14E5</u>	EVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFS	TYWIE	WIKQRPGHGLEWIG	HILPGSVITNNYNEKFKG
<u>2A8</u>	EVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFS	TNWIIE	WIKQRPGHGFEGWIG	DILPGSGTNNYNEKFEFEG
<u>2A10</u>	EVQLQQSGPELTKTASVKISKATGYTFS	THWIE	WIKQRPGHGFEGWIG	DILPGSGTNNYNEKFEFEG
<u>2C6</u>	EVQLQQSGAVLMKPGASVKISKATGYTFS	THWIE	WIKQRPGHGLEWIG	HILPGSAITNNYNEKFKG
Entramado 3				
<u>11E8</u>	RAITVADRSSNTAYMQLSSLTYGDSAVYYCAT	WCHDTY	WDQGTISVTVSS	
<u>2B8</u>	RAAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTTLVTVSA	
<u>2A4</u>	RAAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTTLVTVSA	
<u>14E5</u>	KAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTTLVTVSS	
<u>2A8</u>	RAAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTTLVTVSA	
<u>2A10</u>	RAAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTTLVTVSA	
<u>2C6</u>	KAITADTSSNTSYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	WGWDSY	WGQGTTLVTVSA	
Entramado 4				
<b>VK</b>	Entramado 1	CDR1	Entramado 2	CDR2
<u>11E8</u>	DIIVMTQSPSSLASLGLDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS
<u>2B8</u>	DIILMTQFPSSLASLGLDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS
<u>2A4</u>	DIEMTQFPSSLASLGLDRVTISC	SASQGISIYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS
<u>14E5</u>	DIEMTQSPSSLASLGLDRVTISC	STSQDISSSLN	WYQQKPDGTVLLIY	YTSNLSHS
<u>2A8</u>	DIKMTQFPSSLASLGLDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS
<u>2A10</u>	DIMMTQFPSSLASLGLDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS
<u>2C6</u>	DIKMTQFPSSLASLGLDRVTISC	SASQGISNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSSLHS
Entramado 3				
<u>11E8</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQYSNLPLYT	FGGGTKLEIKR	
<u>2B8</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQFSNLPLYT	FGGGTKLEIKA	
<u>2A4</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQFSNLPLYT	FGGGTKLEIKA	
<u>14E5</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQYSKLPLYT	FGGGTKLEIKR	
<u>2A8</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQFSDLPLYT	FGGGTKLEIKA	
<u>2A10</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQFSDLPLYT	FGGGTKLEIKA	
<u>2C6</u>	GVPSRFSGSGGTDSLTIINLEPEDIATYYC	QQFSDLPLYT	FGGGTKLEIKA	
Entramado 4				

FIGURA 2

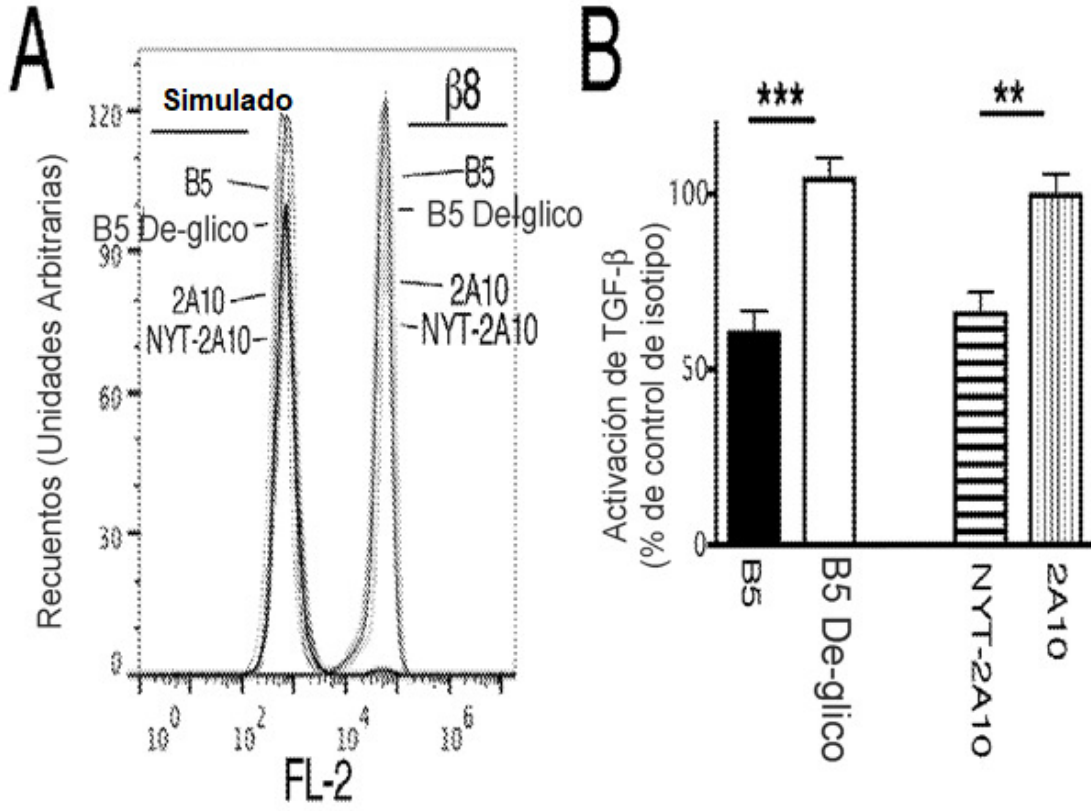


FIGURA 3

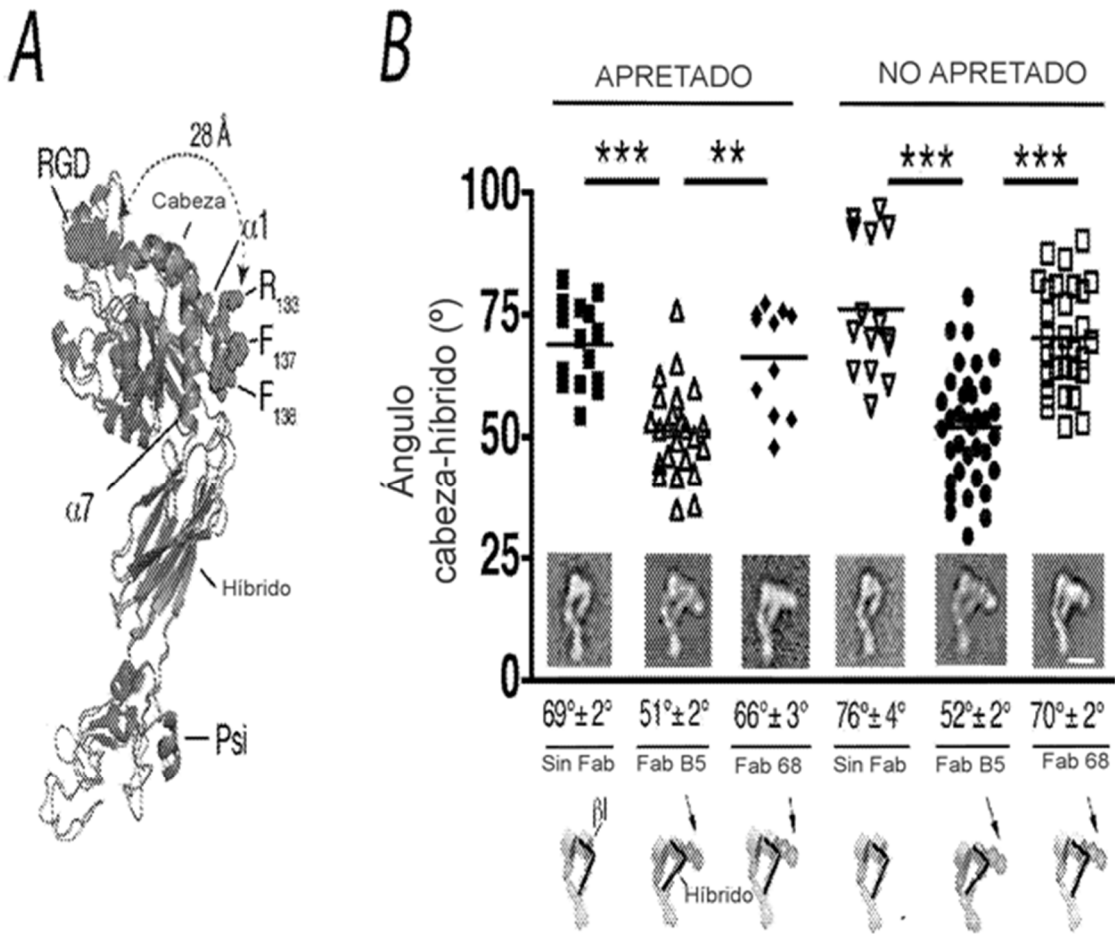


FIGURA 4

