

ANTICUERPOS ANTI-GARP-TGF- β

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente del Reino Unido N°: 1707561.5, presentada el 11 de mayo de 2017, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias presentado por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a un complejo de GARP y TGF- β 1, en particular un complejo de la GARP humana y el TGF- β 1 humano. Estos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno presentan una combinación de propiedades ventajosas que incluyen una gran afinidad de unión al antígeno y la capacidad para inhibir la liberación del TGF- β activo desde las células T reguladoras. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención son mejores en comparación con los anticuerpos que se unen al complejo de GARP y TGF- β 1 del arte previo. En particular, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención son relativamente resistentes a la desamidación, isomerización y oxidación, de modo que presentan una estabilidad mejorada en comparación con los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 descritos en el arte anterior.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células T reguladoras (también conocidas como "Treg" o células T

reguladoras Foxp3⁺) son un importante componente del sistema inmunológico. En particular, las Treg cumplen un rol crítico en la homeostasis inmunológica mediante supresión de diversos aspectos de la respuesta inmune. Como consecuencia de su rol en la coordinación de la respuesta inmune, una actividad de Treg desregulada puede conducir al desarrollo de distintas enfermedades y condiciones. En particular, una función insuficiente de Treg puede dar como resultado una patología autoinmune, en tanto una actividad Treg excesiva se ha relacionado con la inhibición de las respuestas antitumorales en los pacientes con cáncer.

La proteína GARP (proteína con repeticiones predominantes de glicoproteína A) se ha identificado como un marcador de gran expresión sobre la superficie de las Treg, en particular Treg activadas. La GARP es una proteína transmembrana de 80 kDa con una región extracelular que comprende 20 repeticiones ricas en leucina. También se conoce como LRRC32. La GARP sirve como receptor para el TGF- β , en particular la forma latente del TGF- β , y se requiere para la expresión del TGF- β latente sobre las células Treg (EM Shevach, *Expert Opin Ther Targets* (2016) 21(2), 191-200).

El TGF- β es una citoquina conocida por cumplir funciones en múltiples procesos que incluyen proliferación y diferenciación celular, morfogénesis de tejidos, inflamación y apoptosis. También se lo ha identificado como un importante factor de crecimiento implicado en el desarrollo de cáncer y, menos habitualmente, se lo ha identificado como una citoquina con propiedades promotoras de tumores y supresoras de tumores.

La producción y activación del TGF- β es un proceso de múltiples pasos, que está regulado a diferentes niveles. El TGF- β es sintetizado como un

precursor dimérico pro-TGF- β , donde cada cadena de polipéptidos consiste en un péptido asociado a latencia (LAP) y una región de TGF- β maduro. El pro-TGF- β sufre un corte por la enzima furina formando el “TGF- β latente”, una forma inactiva en la cual el LAP permanece asociado de manera no covalente a la región del TGF- β maduro de cada cadena de polipéptidos (véase la Figura 1). La GARP localizada en membrana sirve para transportar y anclar el TGF- β latente a la superficie celular de las Treg, y es de este complejo de GARP unida a membrana-TGF- β latente que luego se liberará la forma activa del TGF- β . Se ha propuesto una variedad de mecanismos para explicar cómo es liberado el TGF- β activo del complejo de GARP-TGF- β latente sobre la superficie de las Treg. Sin embargo, ahora se cree que las integrinas, en particular $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$, cumplen un rol importante en dirigir las fuerzas de cizallamiento necesarias para liberar el dímero del TGF- β maduro.

Una vez liberado, el dímero del TGF- β activo puede actuar como un mediador autócrino o parácrino de las vías de señalización corriente abajo. En el contexto del sistema inmunológico, se cree que la liberación del TGF- β de las células Treg afecta la actividad de varias células T efectoras y también de las propias Treg (véase la Figura 1). Dado que las Treg cumplen un rol importante en la supresión de la inmunidad, se cree que el TGF- β liberado de las Treg y que actúa según una modalidad autócrina puede estar involucrado en la mediación de la supresión de Treg. En particular, se cree que el TGF- $\beta 1$ derivado de Treg cumple un rol significativo en la supresión mediada por Treg de la inmunidad tumoral.

Dado el rol del TGF- β derivado de Treg en la supresión de la respuesta inmune en el microentorno tumoral, ha surgido un interés por abordar esta vía

como un enfoque alternativo de las inmunoterapias contra el cáncer. Por ejemplo, los agentes terapéuticos capaces de atenuar esta vía pueden servir como herramientas útiles para mejorar la eficacia de las vacunas contra el cáncer u otras estrategias de inmunoterapias contra el cáncer diseñadas para aprovechar el poder del sistema inmunológico del cuerpo para tratar el cáncer.

En Cuende *et al.*, (*Sci Transl Med.*, abril de 2015, 22; 7(284): 284ra56) se describe la producción y caracterización de dos anticuerpos monoclonales (MHG-8 y LHG10), que se unen al complejo de GARP-TGF- β sobre las Treg e inhiben la producción del TGF- β . Estos dos anticuerpos también se describen y caracterizan en las Solicitudes de Patente Internacional WO2015/015003 y WO2016/125017. Se demostró que estos anticuerpos podían inhibir la actividad inmunosupresora de la Treg humana en un modelo en ratón de la enfermedad de injerto xenogénico versus huésped. Este trabajo sirve para validar el complejo de GARP-TGF- β como un blanco terapéutico de interés para modular la función de Treg y como consecuencia tratar enfermedades tales como cáncer y enfermedades autoinmunes en las cuales el nivel de actividad de Treg cumple una función importante. Sin embargo, persiste la necesidad de anticuerpos anti-GARP-TGF- β mejorados capaces de inhibir la liberación del TGF- β y de esa manera modificar la actividad de Treg. La presente invención aborda este problema como se describe en la presente.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención ofrece mejoras con respecto al estado del arte con nuevos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen al complejo de GARP-TGF- β 1 humano. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención derivan del anticuerpo anti-

GARP-TGF- β 1 “LHG-10”, descrito en las Solicitudes de Patente Internacional WO2015/015003 y WO2016/125017. Las secuencias del dominio variable de la cadena pesada y de la cadena liviana de LHG-10 se muestran en las SEQ ID N°: 1 y 2, respectivamente, y el dominio variable de la cadena liviana de una variante de cadenas entremezcladas, LHG-10.6 (también descrito en WO2015/015003 y WO2016/125017), se muestra en la SEQ ID N°: 3. Los anticuerpos de la presente invención difieren particularmente con respecto a determinadas secuencias de CDR en comparación con LHG-10 y LHG-10.6, específicamente con respecto a las secuencias de CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena pesada. Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β , LHG-10 y LHG-10.6, tienen la siguiente secuencia de la CDR2 de la cadena pesada: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 5); y la siguiente secuencia de la CDR3 de la cadena pesada: NEWETVVGDLMYEY (SEQ ID N°: 6), en tanto los anticuerpos de la presente invención comprenden la siguiente secuencia de la CDR2 de la cadena pesada: RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12); y la siguiente secuencia de la CDR3 de la cadena pesada: YEWETVVGDLMYEY (SEQ ID N°: 13).

Las diferencias en las secuencias de CDR2 y CDR3 de la cadena pesada informadas en la presente dan como resultado anticuerpos mejorados en comparación con los anticuerpos del arte previo en virtud de su estabilidad mejorada. Más específicamente, los anticuerpos de la presente invención son relativamente resistentes a una desamidación, isomerización y oxidación, de modo que presentan una mayor estabilidad. Sorprendentemente, estas sustituciones específicas en las regiones CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que conducen a una mayor estabilidad no disminuyen significativamente la

afinidad de unión de los anticuerpos por el complejo de GARP-TGF- β 1. La estabilidad mejorada combinada con una gran afinidad de unión al blanco, vuelven a los anticuerpos de la presente invención particularmente adecuados para el desarrollo clínico como agentes terapéuticos, por ejemplo como agentes terapéuticos contra el cáncer.

En un primer aspecto, la presente invención provee un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un complejo de GARP-TGF- β 1 humano, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) en donde:

el VH CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAKFQG (SEQ ID N°: 12) y

el VH CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4).

En algunas formas de realización, la presente invención provee un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un complejo de GARP-TGF- β 1 humano, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) en donde:

el VH CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAKFQG (SEQ ID N°: 12), y

el VH CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4).

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender adicionalmente un dominio variable de la cadena liviana (VL) en donde:

el VL CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender adicionalmente un dominio variable de la cadena liviana (VL) en donde:

el VL CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende

un dominio variable de la cadena pesada (VH), en donde:

el VH CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos

RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12) y

el VH CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4); y

un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde:

el VL CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende

un dominio variable de la cadena pesada (VH), en donde:

el VH CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12), y

el VH CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4); y

un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde:

el VL CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA

(SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno incluyen por lo menos un dominio variable de la cadena pesada (VH) y/o por lo menos un dominio variable de la cadena liviana (VL) que es una variante humanizada, adaptada a la línea germinal o de afinidad de un dominio VH o VL derivado de camélidos.

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen al complejo de la GARP humana y del TGF- β 1 humano, en donde los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre los que siguen:

(i) un VH que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14; o

(ii) un VH que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID N°: 14.

Como alternativa o además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender un dominio variable de la cadena liviana (VL) seleccionado entre los que siguen:

(i) un VL que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15; o

(ii) un VL que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID N°:

15.

En el caso de las formas de realización en donde los dominios de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno están definidos por un porcentaje de identidad de secuencia particular con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden retener secuencias de CDR idénticas a las secuencias de la secuencia de referencia de manera tal que la variación solamente está presente en las regiones de marco.

En una forma de realización particular, en la presente se proveen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en donde el dominio variable de la cadena pesada (VH) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y el dominio variable de la cadena liviana (VL) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención incluyen el dominio CH1, una región de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo incluye la región CH3 de una IgG4 humana e incluye la sustitución S228P en el dominio CH3.

Los anticuerpos que se unen al complejo de GARP-TGF- β 1 pueden comprender por lo menos una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa y/o por lo menos una cadena liviana lambda o kappa de longitud completa. En determinadas formas de realización, los anticuerpos comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17. En determinadas formas de realización, en la presente se

proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena pesada con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 16. En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena liviana con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 17. En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena pesada con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 16, y una cadena liviana con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 17.

En el caso de las formas de realización en donde las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos están definidas por un porcentaje de identidad de secuencia particular con una secuencia de referencia, dicha cadena pesada y/o cadena liviana puede retener secuencias de CDR idénticas a aquellas de la secuencia de referencia, de manera tal que la variación solamente estará presente fuera de las regiones CDR.

A menos que se defina de otra manera en la presente solicitud, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante comparación de estas dos secuencias alineadas de manera óptima y en donde la secuencia de aminoácidos a comparar puede

comprender adiciones o supresiones con respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando la cantidad de posiciones idénticas en las cuales el residuo de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo esta cantidad de posiciones idénticas por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 con el fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Por ejemplo, es posible usar el programa BLAST, las "secuencias BLAST 2" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.*, 174: 247-250), con los parámetros predeterminados (en particular, los parámetros de "penalidad por apertura de hueco": 5, y "penalidad por extensión de hueco": 2; siendo la matriz elegida, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), donde el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar es calculado directamente por el programa.

Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos provistos en la presente pueden presentar una o más de las siguientes propiedades/características:

- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede reaccionar de manera cruzada con el complejo de GARP-TGF- β de mono Cinomolgo;
- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se puede unir al GARP-TGF- β 1 humano con gran afinidad;
- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede incluir un dominio VH y un dominio VL que cuando se evalúa como un fragmento Fab presenta una velocidad de disociación (K_{off}) para el complejo de GARP y TGF-

$\beta 1$ humano menor que $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$;

- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede incluir un dominio VH y un dominio VL que cuando se evalúa como un fragmento Fab presenta una velocidad de disociación (K_{off}) para el complejo de GARP y TGF- $\beta 1$ humano en el rango entre $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ y $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$;

- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede incluir un dominio VH y un dominio VL que cuando se evalúa como un mAb presenta una K_D menor que $1,7 \times 10^{-9} \text{ M}$;

- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede bloquear o inhibir la liberación del TGF- $\beta 1$ activo de las células T reguladoras.

En otros aspectos, la invención también provee moléculas de polinucleótidos que codifican los anticuerpos mencionados precedentemente y fragmentos de unión al antígeno, además de vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos, células huésped que contienen a los vectores y métodos de expresión/producción recombinante de los anticuerpos que se describen en la presente.

En aún otro aspecto, la invención provee una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-GARP-TGF- $\beta 1$ o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se describen en la presente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Aún otro aspecto adicional de la invención se refiere a métodos de tratamiento médico que utilizan los anticuerpos anti-GARP-TGF- $\beta 1$ o fragmentos de unión al antígeno de los mismos mencionados precedentemente, en particular en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos relacionados con TGF- β . En determinadas formas de realización, la invención

se relaciona con métodos de tratamiento que utilizan los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en donde la enfermedad o condición a tratar se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, una infección crónica, cáncer, fibrosis, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad cerebrovascular y una enfermedad neurodegenerativa. En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se administran en combinación con otro tratamiento como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden administrar en combinación con un agente inmunoterapéutico, opcionalmente un anticuerpo inmunoestimulante o una vacuna contra tumores.

Estas y otras formas de realización de la invención se podrán apreciar y comprender mejor cuando se consideran junto con la siguiente descripción y las figuras adjuntas. Sin embargo, se comprenderá que la siguiente descripción, si bien indica varias formas de realización de la invención y numerosos detalles específicos de las mismas, solamente se ofrece a modo ilustrativo y no en un sentido limitante. Se pueden efectuar muchas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o reordenamientos dentro del alcance de la invención sin apartarse del espíritu de la misma, y la invención incluye todas dichas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o reordenamientos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un esquema donde se muestra la unión del TGF- β latente a GARP sobre la superficie de células T reguladoras. El TGF- β es producido

como un precursor, “pro-TGF- β ”, y sufre un corte para producir el “TGF- β latente”, una forma en la cual el dímero TGF- β maduro permanece asociado de manera no covalente con la región del péptido asociado a latencia (LAP) de cada polipéptido. Es precisamente esta forma latente que se une a GARP sobre la superficie de las células Treg. Se cree que las integrinas $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$ son responsables de mediar la liberación del “TGF- β activo” o maduro de la superficie celular. Esta forma activa puede actuar según una modalidad parácrina para lograr efectos en una variedad de células blanco, o puede actuar como un mediador autócrino mediante unión al receptor del TGF- β sobre las células Treg.

En la Figura 2 se muestra la actividad de unión al blanco medida mediante Biacore™ o resonancia de plasmón superficial (SPR) de los anticuerpos 39B6 IgG1^{N297Q} y 39B6 IgG4^{S228P} sobre un período de 56 días en muestras guardadas a -20 °C, 5 °C y 37 °C en PBS o PBS-Tween (PBSTw). La muestra de referencia (-20 °C) se definió como el 100% de actividad de unión en cada punto de tiempo.

En la Figura 3 se muestran los resultados de la prueba con las variantes del anticuerpo 39B6-A en un ensayo diseñado para monitorear la fosforilación de SMAD2 corriente abajo de la activación del receptor del TGF- β . La fosforilación de SMAD2 sirve como un marcador de activación de la vía de señalización del TGF- β , después de la unión del TGF- β a su receptor. Si se reduce la fosforilación de SMAD2, se inhibe la actividad del TGF- β . Figura 3A: transferencias Western que muestran disminuciones de la fosforilación de SMAD2 en presencia de diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β , 39B6-A, 39B6-AVE, 39B6-AEE, 39B6-AYE, 39B6-ANR y 39B6-

ANK. Figura 3B: representación gráfica de los datos de (A) donde se muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de SMAD2 a diferentes concentraciones de anticuerpo.

En la Figura 4 se muestran los resultados de la prueba con las variantes del anticuerpo 39B6-A en un ensayo diseñado para medir la actividad de la vía del TGF- β por medio de un gen informante de luciferasa conjugado con un promotor SMAD. En los gráficos se muestra el porcentaje de inhibición de la señal de luminiscencia en presencia de diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β , LHG-10, 39B6-A, 39B6-AVE, 39B6-AEE, 39B6-AYE, 39B6-ANR y 39B6-ANK.

En la Figura 5 se muestra el porcentaje de formación de agregados sobre un período de 56 días con los anticuerpos 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR guardados a 5 °C y 37 °C. La formación de agregados se monitoreó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

En la Figura 6 se muestra el porcentaje de formación de fragmentos sobre un período de 56 días con los anticuerpos 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR guardados a 37 °C. La formación de fragmentos se monitoreó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

En la Figura 7 se muestra el porcentaje de área de monómeros sobre un período de 56 días con los anticuerpos 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR guardados a 5 °C y 37 °C. El área de monómeros se monitoreó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

En la Figura 8 se muestran los resultados de un análisis por SDS-PAGE de muestras de anticuerpo guardadas durante 56 días a una temperatura de referencia (-20 °C), a 5 °C y a 37 °C. Figura 8A: 39B6-AVE. Figura 8B: 39B6-

AYE. Figura 8C: 39B6-ANK. Figura 8D: 39B6-ANR. Los marcadores aparecen en el centro de cada gel. A la izquierda de los marcadores, las 3 muestras comprenden las muestras (i) Ref; (ii) 5 °C; y (iii) 37 °C evaluadas en condiciones no reductoras y a la derecha de los marcadores, las 3 muestras comprenden las muestras (i) Ref; (ii) 5 °C; y (iii) 37 °C evaluadas en condiciones reductoras.

En la Figura 9 se muestra la actividad de unión al blanco medida mediante Biacore™ o SPR de los anticuerpos 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR sobre un período de 56 días en muestras guardadas a -20 °C, 5 °C y 37 °C. La muestra de referencia (-20 °C) se definió como el 100% de actividad de unión en cada punto de tiempo.

En la Figura 10 se muestra la concentración de proteínas (mg/ml) en muestras de los anticuerpos 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR sobre un período de 56 días para muestras guardadas a -20 °C (ref), 5 °C y 37 °C.

En la Figura 11 se muestran los resultados de un análisis por SDS-PAGE de muestras de anticuerpo después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Los marcadores aparecen en el centro del gel. A la izquierda de los marcadores, las 4 muestras son las muestras analizadas en condiciones no reductoras: (i) Ref para 39B6-AVE; (ii) Muestra de congelamiento-descongelamiento para 39B6-AVE; (iii) Ref para 39B6-AYE; y (iv) muestra de congelamiento-descongelamiento para 39B6-AYE. A la derecha de los marcadores, las 4 muestras son las muestras analizadas en condiciones reductoras: (i) Ref para 39B6-AVE; (ii) Muestra de congelamiento-descongelamiento para 39B6-AVE; (iii) Ref para 39B6-AYE; y (iv) muestra de

congelamiento-descongelamiento para 39B6-AYE.

En la Figura 12 se muestra la actividad de unión al blanco medida mediante Biacore™ o SPR después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento para los anticuerpos 39B6-AVE y 39B6-AYE. La muestra de referencia (-20 °C) se definió como el 100% de actividad de unión en cada punto de tiempo.

En la Figura 13 se muestra la concentración de proteínas (mg/ml) de las muestras de los anticuerpos 39B6-AVE y 39B6-AYE después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

En la Figura 14 se muestra la actividad de unión al blanco medida mediante Biacore™ o SPR después de una prueba de estabilidad térmica a temperaturas que varían en un rango entre 54,6 °C y 71,4 °C de los anticuerpos 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR. La muestra de referencia se definió como el 100% de actividad de unión.

En la Figura 15 se muestran los resultados de un análisis por SDS-PAGE de muestras de anticuerpo después de 96 horas de rotación. Los marcadores aparecen en el centro del gel. A la izquierda de los marcadores, las 4 muestras son las muestras analizadas en condiciones no reductoras: (i) Ref para 39B6-AVE; (ii) Muestra rotada para 39B6-AVE; (iii) Ref para 39B6-AYE; y (iv) muestra rotada para 39B6-AYE. A la derecha de los marcadores, las 4 muestras son las muestras analizadas en condiciones reductoras: (i) Ref para 39B6-AVE; (ii) Muestra rotada para 39B6-AVE; (iii) Ref para 39B6-AYE; y (iv) muestra rotada para 39B6-AYE.

En la Figura 16 se muestra la actividad de unión al blanco medida mediante Biacore™ o SPR después de una prueba de estabilidad a la rotación

para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE. La muestra de referencia se definió como el 100% de actividad de unión.

En la Figura 17 se muestra la concentración de proteínas (mg/ml) de muestras de los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE después de una prueba de estabilidad a la rotación.

En la Figura 18 se muestra la cantidad relativa de desamidación e isomerización de la posición N95 en los anticuerpos 39B6-ANE, 39B6-ANR y 39B6-ANK sobre un período de 56 días. No se incluyeron los anticuerpos 39B6-AVE y 39B6-AYE porque en estos anticuerpos se había eliminado el residuo "N95" de la CDR3. También se muestra la actividad de unión relativa de los mAbs 39B6-ANE, 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR durante el transcurso de 56 d, para muestras guardadas a 37 °C.

En la Figura 19 se muestra el requerimiento del TGF- β maduro en la unión de 39B6-AYE (ARGX-115) al complejo de GARP-TGF- β . Se recubrieron placas para ELISA con GARP o bien con el Ab anti-GARP, ARGX-115. En las placas de ELISA recubiertas con GARP, se dejó que se formara un complejo ya sea con el TGF- β latente de longitud completa (incluyendo ambas regiones LAP y TGF- β maduro) o un complejo con un LAP recombinante mediante la adición de la proteína recombinante relevante. En las placas de ELISA recubiertas con ARGX-115, se agregó GARP y luego se agregó ya sea el TGF- β latente de longitud completa o LAP. El ARGX-115 solo se pudo unir a GARP en presencia del TGF- β de longitud completa. No se produjo unión de ARGX-115 al complejo de GARP-LAP. Por el contrario, un anticuerpo anti-LAP se pudo unir al complejo de GARP-LAP. Esto demuestra el requerimiento del TGF- β maduro para la unión de ARGX-115 al complejo de GARP-TGF- β .

En la Figura 20 se muestra la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la activación del TGF- β por el complejo de GARP-TGF- β con varias formas mutantes de TGF- β . La actividad neutralizante de ARGX-115 fue anulada por la mutación de R58 en LAP y de K338 en el TGF- β maduro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. Definiciones

“GARP”: GARP (proteína con repeticiones predominantes de glicoproteína A) es un miembro de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina. También se denomina proteína que contiene repeticiones ricas en leucina 32 (LRRC32). La GARP es una proteína transmembrana de 80 kDa con una región extracelular compuesta primariamente por 20 repeticiones ricas en leucina. La secuencia de aminoácidos completa de la variante de transcritos de la proteína GARP humana 2 (GenBank, Acceso N°: NP_001122394.1) es:

MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPP
DTETLDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAQFQALHLEHLSL
AHNRLAMATASAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLA
ENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLT
CISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAAL
PRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSPLL
NLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHN
ALETLELGARALGSLRTLTLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCG
GPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTELDLSSNPGLE
VATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICKRLNLAENRLSHLPAAWT
QAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQL
HQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIILTFILVSAIL

LTTLAACCCVRRQKFNQQYKA (SEQ ID N°: 33).

“TGF- β ”: El TGF- β es una citoquina que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento. Hay tres isoformas distintas del TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) codificadas por tres genes distintos, pero las estructuras generales de las isoformas del TGF- β son altamente similares, con homologías en el orden del 70-80%. El término TGF- β , según se usa en la presente, se usa típicamente para abarcar las tres isoformas diferentes de la citoquina TGF- β , a menos que el contexto indique lo contrario.

Las tres isoformas del TGF- β están codificadas como precursores de proteínas grandes; TGF- β 1 (GenBank, Acceso N°: NM_000660) contiene 390 aminoácidos y TGF- β 2 (GenBank, Acceso N°: NM_001135599 y NM_003238) y TGF- β 3 (GenBank, Acceso N°: XM_005268028) cada uno de los cuales contiene 412 aminoácidos. Cada uno tiene un péptido señal N-terminal de 20-30 aminoácidos necesario para la secreción desde una célula, una proregión (denominado péptido asociado a latencia o LAP) y una región C-terminal de 112-114 aminoácidos que se convierten en la molécula del TGF- β maduro después de su liberación de la proregión mediante corte proteolítico. Después del corte proteolítico, el LAP y el TGF- β maduro permanecen asociados de manera no covalente y forman la molécula de “TGF- β latente”. En esta forma latente, el LAP impide la unión del TGF- β maduro al receptor del TGF- β . Para mandar una señal, el TGF- β maduro debe ser liberado del LAP. El TGF- β maduro que no está asociado al LAP se denomina *TGF- β activo*, ya que se puede unir al receptor del TGF- β y transducir una señal.

El TGF- β 1 de longitud completa tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MPPSGLRLLPLLPLLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEAIR
GQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADY
YAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL
LRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLS
RGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMA
TPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP
KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIV
YYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID N°: 34).

El LAP tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLA
LYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIY
MFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNR
LLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDIN
GFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQSSRHRR (SEQ ID N°: 35).

El TGF- β 1 maduro tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC
PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQL
SNMIVRSCKCS (SEQ ID N°: 36).

“Complejo de GARP-TGF- β ”: Según se usa en la presente, el complejo de GARP-TGF- β se refiere al complejo nativo que se forma cuando el TGF- β latente se une a GARP, en particular la GARP localizada sobre la superficie de células Treg. Aunque no se especifica por completo, el “complejo de GARP-TGF- β ”, o simplemente “GARP-TGF- β ”, según se usa en la presente, se refiere al complejo entre la GARP y el TGF- β latente. La unión de GARP a TGF- β , más específicamente al TGF- β latente, se ha caracterizado a nivel molecular,

por ejemplo como se describe en Wang *et al.*, *Mol Biol Cell.*, marzo de 2012; 23(6): 1129-39. La GARP forma un enlace disulfuro a la Cys4 del TGF- β latente y también se asocia con el TGF- β latente por medio de interacciones no covalentes. Hay 15 residuos Cys en el dominio extracelular de GARP, y GARP utiliza la Cys-192 y la Cys-331 para formar enlaces disulfuro con los dos residuos Cys4 del TGF- β latente. De allí se desprende que una proteína GARP se asocia con un dímero TGF- β latente.

“Anticuerpo” o “inmunoglobulina”: Según se usa en la presente, el término “inmunoglobulina” incluye un polipéptido que comprende una combinación de dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, ya sea si tiene, o no, alguna inmunorreactividad específica relevante. Los “anticuerpos” se refieren a aquellos ensamblajes que tienen una actividad inmunorreactiva específica conocida significativa con un antígeno de interés (por ejemplo, el complejo de GARP y TGF- β). El término “anticuerpos anti-GARP-TGF- β ” se usa en la presente para hacer referencia a anticuerpos que presentan especificidad inmunológica por el complejo de GARP y TGF- β 1, en particular el complejo de GARP-TGF- β 1 humano y, en algunos casos, especies homólogas del mismo. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas livianas y pesadas, con o sin un enlace covalente entre cadenas que las separa. Las estructuras básicas de las inmunoglobulinas en los sistemas vertebrados están relativamente bien comprendidas.

El término genérico “inmunoglobulina” comprende cinco clases distintas de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgD o IgE) que se pueden distinguir bioquímicamente. Las cinco clases de anticuerpos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. La siguiente descripción estará dirigida en

general a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, las inmunoglobulinas típicamente comprenden dos polipéptidos de cadena liviana idénticos, con un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos, con un peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas por medio de enlaces disulfuro en una configuración en “Y”, en donde las cadenas livianas encierran a las cadenas pesadas comenzando en la boca de la configuración en “Y” y continuando por la región variable.

Las cadenas livianas de un anticuerpo se clasifican ya sea como kappa (κ) o lambda (λ). Cada clase de cadenas pesadas se puede unir a cualquiera de las cadenas livianas kappa o lambda. En general, las cadenas liviana y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de la “cola” de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por medio de enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas o por células B o por células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van de un extremo N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración en Y al extremo C-terminal en la parte inferior de cada cadena. Los especialistas en el arte sabrán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), con algunas subclases en ellas (por ejemplo, γ 1- γ 4). Es precisamente la naturaleza de esta cadena que determina la “clase” del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fáciles

de discernir para el especialista en vista de la presente divulgación y, por lo tanto, se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Como se indicó antes, la región variable de un anticuerpo permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a los epitopes sobre los antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define una unión tridimensional al sitio del antígeno. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión al antígeno presente en cada extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno está definido por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en cada una de las cadenas VH y VL.

“Sitio de unión”: Según se usa en la presente, el término “sitio de unión” comprende una región de un polipéptido que es responsable de unirse selectivamente a un antígeno blanco de interés. Los dominios de unión comprenden por lo menos un sitio de unión. Los ejemplos de dominios de unión incluyen un dominio variable del anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden comprender un solo sitio de unión o múltiples (por ejemplo, dos, tres o cuatro) sitios de unión.

“Región variable” o “dominio variable”: Los términos “región variable” y “dominio variable” se usan indistintamente en la presente y se considera que su significado es equivalente. El término “variable” se refiere al hecho que determinadas porciones de los dominios variables VH y VL difieren ampliamente en cuanto a secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno blanco. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida homogéneamente por todos los

dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados "bucles hipervariables" en cada uno del dominio VL y el dominio VH que forman parte del sitio de unión al antígeno. El primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VLambda de la cadena liviana se denominan L1(λ), L2(λ) y L3(λ) en la presente y se pueden definir por comprender los residuos 24-33 (L1(λ), que consiste en 9, 10 ú 11 residuos de aminoácidos), 49-53 (L2(λ), que consiste en 3 residuos) y 90-96 (L3(λ), que consiste en 5 residuos) en el dominio VL (Morea *et al.*, *Methods* 20: 267-279 (2000)). El primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VKappa de la cadena liviana se denominan L1(κ), L2(κ) y L3(κ) en la presente y se pueden definir por comprender los residuos 25-33 (L1(κ), que consiste en 6, 7, 8, 11, 12 ó 13 residuos), 49-53 (L2(κ), que consisten en 3 residuos) y 90-97 (L3(κ), que consiste en 6 residuos) en el dominio VL (Morea *et al.*, *Methods* 20:267-279 (2000)). El primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VH se denominan H1, H2 y H3 en la presente y se pueden definir por comprender los residuos 25-33 (H1, que consiste en 7, 8 o 9 residuos), 52-56 (H2, que consiste en 3 ó 4 residuos) y 91-105 (H3, de longitud altamente variable) en el dominio VH (Morea *et al.*, *Methods* 20: 267-279 (2000)).

A menos que se indique de otra manera, los términos L1, L2 y L3, respectivamente, se refieren al primer, segundo y tercer bucles hipervariables de un dominio VL, y abarcan los bucles hipervariables obtenidos de ambos isotipos VKappa y VLambda. Los términos H1, H2 y H3, respectivamente, se refieren al primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VH, y abarcan los bucles hipervariables obtenidos a partir de cualquiera de los isotipos de cadena pesada conocidos, incluyendo γ , ϵ , δ , α o μ .

Los bucles hipervariables L1, L2, L3, H1, H2 y H3 pueden comprender, cada uno, parte de una "región determinante de complementariedad" o "CDR", como se define más adelante. Los términos "bucle hipervariable" y "región determinante de complementariedad" no son estrictamente sinónimos, dado que los bucles hipervariables (HV) se define sobre la base de su estructura, en tanto las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen sobre la base de su variabilidad de secuencia (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) y los límites de los HV y las CDR pueden ser diferentes en algunos dominios VH y VL.

Las CDR de los dominios VL y VH típicamente se pueden definir por comprender los siguientes aminoácidos: los residuos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en el dominio variable de la cadena liviana, y los residuos 31-35 ó 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en el dominio variable de la cadena pesada; (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Por lo tanto, los HV pueden estar comprendidos en las correspondientes CDR y se comprenderá que las referencias en la presente a los "bucles hipervariables" de los dominios VH y VL también abarcan las correspondientes CDR, y viceversa, a menos que se indique de otra manera.

Las porciones más conservadas de los dominios variables se conocen como regiones de marco (FR), como se definirá más adelante. Los dominios variables de las cadenas pesada y liviana nativas comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan mayormente una

configuración de lámina β , conectados por los tres bucles hipervariables. Los bucles hipervariables de cada cadena son mantenidas juntas en proximidad estrecha por las regiones de marco y, junto con los bucles hipervariables de la otra cadena, contribuyen en la formación del sitio de unión de los anticuerpos. El análisis estructural de los anticuerpos reveló la relación entre la secuencia y la forma del sitio de unión formado por las regiones determinantes de complementariedad (Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227: 799-817 (1992)); Tramontano *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 175-182 (1990)). A pesar de su gran variabilidad de secuencia, cinco de los seis bucles adoptan solo un pequeño repertorio de conformaciones de la cadena principal, denominadas "estructuras canónicas". Estas conformaciones están determinadas en primer lugar por la longitud de los bucles y en segundo lugar by la presencia de residuos clave en determinadas posiciones en los bucles y en las regiones de marco que determinan la conformación por medio de su empaquetamiento, enlaces de hidrógeno o capacidad para asumir conformaciones de cadena principal poco comunes.

"CDR": Según se usa en la presente, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" se refiere a los sitios de combinación de antígenos no contiguos presentes dentro de la región variable de polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. Estas regiones particulares fueron descritas por Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y Kabat *et al.*, *Sequences of protein of immunological interest*, (1991) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) y por MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996), donde dichas definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos de

aminoácidos que abarcan las CDR definidas en cada una de las referencias citadas precedentemente se describen a efectos comparativos. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR definida por Kabat, basada en comparaciones de secuencia.

Tabla 1: Definiciones de las CDR

	Definiciones de las CDR		
	Kabat ¹	Chotia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹Numeración de los residuos acorde con la nomenclatura de Kabat et al., *supra*.

²Numeración de los residuos acorde con la nomenclatura de Chotia et al., *supra*.

³Numeración de los residuos acorde con la nomenclatura de MacCallum et al., *supra*.

“Región de marco”: Los términos “región de marco” y “región FR”, tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a los residuos de aminoácidos que forman parte de la región variable pero que no forman parte de las CDR (por ejemplo, de acuerdo con la definición de Kabat de las CDR). Por lo tanto, el marco de una región variable tiene una longitud de aproximadamente 100-120 aminoácidos pero solamente incluye aquellos aminoácidos que se hallan fuera de las CDR. A modo de un ejemplo específico de un dominio variable de la cadena pesada y de las CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al., la región del marco 1 corresponde al dominio de la

región variable que abarca los aminoácidos 1-30, la región del marco 2 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 36-49, la región del marco 3 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 66-94 y la región del marco 4 corresponde al dominio de la región variable, desde el aminoácido 103 hasta el final de la región variable. Las regiones del marco de la cadena liviana están separadas de manera similar de las CDR de la región variable de la cadena liviana. Por otro lado, de acuerdo con la definición de las CDR de Chotia et al o de McCallum et al., los límites de las regiones del marco son los extremos de las CDR respectivas que se describieron con anterioridad. En formas de realización preferidas, las CDR están definidas según Kabat.

En los anticuerpos naturales, las seis CDR que están presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que se encuentran en posiciones específicas para conformar el sitio de unión al antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios variables de la cadena liviana y de la cadena pesada presentan menos variabilidad intermolecular a nivel de su secuencia de aminoácidos y se denominan regiones de marco. Las regiones del marco adoptan mayormente una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que se conectan con la estructura de la lámina β , y en algunos casos forman parte de ella. Por consiguiente, estas regiones del marco pueden formar un andamiaje donde pueden localizarse las seis CDR en la orientación correcta, mediante interacciones no covalentes entre las cadenas. El sitio de unión al antígeno que se forma cuando las CDR se colocan en la posición óptima define una superficie que es complementaria de un epítopo en el

antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítopo del antígeno inmunorreactivo. Un especialista en el arte podrá identificar fácilmente la posición de las CDR.

“Región constante”: Según se usa en la presente, el término “región constante” se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo fuera de los dominios variables o de las regiones variables. Las cadenas livianas de inmunoglobulina tienen un solo dominio de “región constante”, típicamente denominado “dominio CL o CL1”. Este dominio se encuentra C-terminal con respecto al dominio VL. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina difieren en su región constante dependiendo de la clase de inmunoglobulina (γ , μ , α , δ , ϵ). Las cadenas pesadas, γ , α y δ , tienen una región constante que consiste en tres dominios de inmunoglobulina (denominados CH1, CH2 y CH3) con una región de bisagra flexible que separa los dominios CH1 y CH2. Las cadenas pesadas, μ y ϵ , tienen una región constante que consiste en cuatro dominios (CH1-CH4). Los dominios constantes de la cadena pesada se encuentran en una posición C-terminal con respecto al dominio VH.

La numeración de los aminoácidos en las cadenas pesada y liviana de una inmunoglobulina va del extremo N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración en Y al extremo C-terminal en la parte inferior de cada cadena. Se utilizan diferentes esquemas de numeración para definir los dominios constantes de las cadenas pesada y liviana de una inmunoglobulina. De acuerdo con el esquema de numeración EU, los dominios constantes de la cadena pesada de una molécula de IgG se identifican de la siguiente manera: CH1: residuos de aminoácidos 118-215; CH2: residuos de aminoácidos 231-340; CH3: residuos de aminoácidos 341-446. De acuerdo con el esquema de

numeración Kabat, los dominios constantes de la cadena pesada de una molécula de IgG se identifican de la siguiente manera: CH1: residuos de aminoácidos 114-223; CH2: residuos de aminoácidos 244-360; CH3: residuos de aminoácidos 361-477. La “región de bisagra” incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno N-terminales se muevan de manera independiente. Las regiones de bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: los dominios de bisagra superior, medio e inferior (Roux K.H. *et al.*, *J. Immunol.* 161: 4083 1998). Los anticuerpos de la invención que comprenden una región de bisagra “completamente humana” pueden contener una de las secuencias de la región de bisagra que se muestran en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de bisagra humanas

IgG	Bisagra superior	Bisagra media	Bisagra inferior
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID N°: 37)	CPPCP (SEQ ID N°: 38)	APELLGGP (SEQ ID N°: 39)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID N°: 40)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID N°: 41)	APELLGGP (SEQ ID N°: 42)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID N°: 43)	CPSCP (SEQ ID N°: 44)	APEFLGGP (SEQ ID N°: 45)
IgG2	ERK (SEQ ID N°: 46)	CCVECPPPCP (SEQ ID N°: 47)	APPVAGP (SEQ ID N°: 48)

“Fragmento”: El término “fragmento”, según se usa en el contexto de los anticuerpos de la invención, se refiere a una parte o una porción de un anticuerpo o de una cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. El término “fragmento de unión al antígeno” hace referencia a un fragmento de un polipéptido de una inmunoglobulina o de un anticuerpo que se une a un

antígeno o que compite con un anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que deriva) por la unión al antígeno (es decir, la unión específica al complejo de GARP-TGF- β). Según se usa en la presente, el término “fragmento” de un molécula de anticuerpo incluye fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos, por ejemplo, un dominio variable de la cadena liviana (VL) de un anticuerpo, un dominio variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple (scFv), un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un anticuerpo de un brazo (monovalente), *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies* o cualquier molécula de unión al antígeno formado mediante combinación, ensamblaje o conjugación de dichos fragmentos de unión al antígeno. El término “fragmento de unión al antígeno”, según se usa en la presente, además abarca fragmentos de anticuerpo seleccionados del grupo que consiste en *unibodies*, anticuerpos de dominio y *nanobodies*. Los fragmentos se pueden obtener, por ejemplo, mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo o con medios recombinantes.

“Sustitución de aminoácidos conservadora”: Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es aquella en la que se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En el arte se han definido familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina,

metionina, triptofano), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por consiguiente, se puede reemplazar un residuo de un aminoácido no esencial en un polipéptido por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otra forma de realización, se puede reemplazar una cadena de aminoácidos de manera conservadora por una cadena estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadenas laterales.

“Quimérico”: Una proteína “quimérica” comprende una primera secuencia de aminoácidos ligada a una segunda secuencia de aminoácidos con la cual no está unida normalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos normales pueden existir en proteínas separadas que se reúnen en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero ubicados en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Se puede crear una proteína quimérica mediante, por ejemplo, síntesis química o mediante creación y traducción de un polinucleótido en el cual las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada. Los ejemplos de anticuerpos quiméricos de la invención incluyen proteínas de fusión que comprenden dominios VH y VL derivados de camélidos, o variantes humanizadas de los mismos, fusionados a los dominios constantes de un anticuerpo humano, por ejemplo una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

“Valencia”: Según se usa en la presente, el término “valencia” se refiere a la cantidad de sitios de unión al blanco potenciales en un polipéptido. En cada sitio de unión al blanco, se produce una unión específica con una molécula blanco o con un sitio específico en la molécula blanco. Cuando un

polipéptido comprende más de un sitio de unión al blanco, cada sitio de unión al blanco puede unirse específicamente a moléculas idénticas o diferentes (por ejemplo, puede unirse a distintos ligandos, a distintos antígenos o a distintos epitopes de un mismo antígeno).

“Especificidad”: El término “especificidad” se refiere a la capacidad de unirse (por ejemplo, reaccionar inmunológicamente con) un blanco dado, por ejemplo, un complejo de GARP-TGF- β 1. Un polipéptido puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unirán específicamente con un blanco o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unirán específicamente al mismo blanco o a blancos diferentes.

“Sintético”: Según se usa en la presente, el término “sintético” con respecto a polipéptidos incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que no es natural. Por ejemplo, los polipéptidos no naturales que son formas modificadas de polipéptidos naturales (por ejemplo, que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o supresión) o que comprenden una primera secuencia de aminoácidos (que puede ser natural o no) que está unida en una secuencia de aminoácidos lineal a una segunda secuencia de aminoácidos (que puede ser natural o no) a la cual no se une normalmente en la naturaleza.

“Modificado”: Según se usa en la presente, el término “modificado” incluye la manipulación de moléculas de ácidos nucleicos o de polipéptidos utilizando medios sintéticos (por ejemplo, mediante técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, mediante acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas). Preferiblemente, los

anticuerpos de la invención están modificados, incluyendo por ejemplo, anticuerpos humanizados y/o quiméricos, y anticuerpos que han sido modificados para mejorar una o más propiedades, tal como la unión al antígeno, estabilidad/vida media o función efectora.

“Sustituciones humanizantes”: Según se usa en la presente, el término “sustituciones humanizantes” se refiere a sustituciones de aminoácidos en las cuales el residuo de aminoácido presente en una posición particular en el dominio VH o VL de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 derivado de camélidos) se reemplaza por un residuo de aminoácido que se encuentra en una posición equivalente en un dominio VH o VL humano de referencia. El dominio VH o VL humano de referencia puede ser un dominio VH o VL codificado por la línea germinal humana. Las sustituciones humanizantes se pueden realizar en las regiones de marco y/o las CDR de los anticuerpos, definidas en la presente.

“Variantes humanizantes”: Según se usa en la presente, el término “variante humanizada” se refiere a una variante de anticuerpo que contiene una o más “sustituciones humanizantes” en comparación con un anticuerpo de referencia, en donde una porción del anticuerpo de referencia (por ejemplo, el dominio VH y/o el dominio VL o partes de los mismos que contengan por lo menos una CDR) tiene un aminoácido derivado de una especie no humana, y las “sustituciones humanizantes” se encuentran en la secuencia de aminoácidos derivada de una especie no humana.

“Variantes adaptadas a la línea germinal”: El término “variante adaptada a la línea germinal” se usa en la presente específicamente con referencia a “variantes humanizantes” en las cuales las “sustituciones humanizantes” dan

como resultado el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos presentes en un o más posiciones particulares en el dominio VH o VL de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 derivado de camélidos) por un residuo de aminoácido que se encuentra en una posición equivalente en un dominio VH o VL humano de referencia codificado por la línea germinal humana. Es un hecho típico que para cualquier “variante adaptada a la línea germinal” dada, el reemplazo de residuos de aminoácidos sustituidos en la variante adaptada a la línea germinal se toman de manera exclusiva, o predominante, de un solo dominio VH o VL codificado por la línea germinal humana. Los términos “variante humanizada” y “variante adaptada a la línea germinal” a menudo se usan indistintamente en la presente. La introducción de una o más “sustituciones humanizantes” en un dominio VH o VL derivado de camélidos (por ejemplo, derivado de llama) da como resultado la producción de una “variante humanizada” del dominio VH o VL derivado de camélido (llama). Si los residuos de aminoácidos sustituidos derivan de manera predominante o exclusiva de una sola secuencia de un dominio VH o VL codificada por la línea germinal humana, entonces el resultado puede ser una “variante adaptada a la línea germinal humana” del dominio VH o VL derivado de camélido (llama).

“Variantes de afinidad”: Según se usa en la presente, el término “variante de afinidad” se refiere a una variante de anticuerpo que presenta uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos en comparación con un anticuerpo de referencia, en donde la variante de afinidad presenta una afinidad alterada por el antígeno blanco en comparación con el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, las variantes de afinidad presentarán una afinidad cambiada por GARP-TGF- β , en comparación con el anticuerpo anti-GARP-

TGF- β de referencia. Preferiblemente, la variante de afinidad presentará una afinidad mejorada por el antígeno blanco, en comparación con el anticuerpo de referencia. Las variantes de afinidad típicamente presentan uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos de las CDR, en comparación con el anticuerpo de referencia. Dichas sustituciones pueden dar como resultado el reemplazo del aminoácido original presente en una posición dada en las CDR por un residuo de aminoácido diferente, que puede ser un residuo de aminoácido natural o un residuo de aminoácido no natural. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras o no conservadoras.

B. Anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1

La presente invención se relaciona con anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen específicamente al complejo de GARP y TGF- β 1, en particular, el complejo de la GARP humana y del TGF- β 1 humano. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se pueden definir con respecto a las características estructurales y funcionales que se describen en la presente.

Cabe destacar que los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención son mejores en comparación con los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 que se describieron con anterioridad por el hecho que presentan una estabilidad mejorada. En particular, la estabilidad de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 que se describen en la presente está mejorada en comparación con los anticuerpos que tienen las secuencias de CDR de la cadena pesada y la cadena liviana de los anticuerpos de referencia anti-GARP-TGF- β 1, LHG-10 y LHG-10.6, descritos en WO2015/015003 y WO2016/125017. Esta mejora de la estabilidad se logra sin una disminución significativa de la afinidad de unión de

los anticuerpos por el complejo de GARP-TGF- β 1 en comparación con los anticuerpos de referencia, LHG10 y LHG10.6.

Los anticuerpos de la presente invención difieren de los anticuerpos de referencia anti-GARP-TGF- β 1, LHG-10 y LHG-10.6, que se describieron con anterioridad, en particular con respecto a las secuencias de CDR2 y las secuencias de CDR3 de la cadena pesada. Más específicamente, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1, LHG-10 y LHG-10.6, tienen la siguiente secuencia de la CDR2 de la cadena pesada: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 5); y la siguiente secuencia de la CDR3 de la cadena pesada: NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 6), en tanto los anticuerpos de la presente invención comprenden la siguiente secuencia de la CDR2 de la cadena pesada: RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12); y la siguiente secuencia de la CDR3 de la cadena pesada: YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13). Como se describe y ejemplifica en la presente, se encontró que las sustituciones de aminoácidos G55A y N95Y en las secuencias de CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, respectivamente, mejoran la estabilidad del anticuerpo porque reducen la desamidación, isomerización y oxidación, al mismo tiempo que tienen una afinidad de unión por el complejo de GARP-TGF- β 1 que es aproximadamente equivalente a la de los anticuerpos de referencia.

En un primer aspecto, la presente invención provee anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a un complejo de GARP y TGF- β 1, y comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) en donde:

el VH CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAKFQG (SEQ ID N°: 12) y

el VH CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4).

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden adicionalmente un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde:

el VL CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1, en donde los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden por lo menos un dominio variable de la cadena pesada (VH) y por lo menos un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde:

el VH CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAKFQG (SEQ ID N°: 12),

el VH CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

el VL CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10), y

el VL CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1, en donde los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden por lo menos un dominio variable de la cadena pesada (VH) y por lo menos un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde:

el VH CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12),

el VH CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

el VL CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En determinadas formas de realización, los anticuerpos y fragmentos de

unión al antígeno son recombinantes. En determinadas formas de realización, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno son monoclonales.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en su sentido más amplio y abarca, pero en un sentido no taxativo, anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), siempre que tengan la especificidad inmunológica apropiada por el complejo de GARP-TGF- β 1. El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un solo sitio antigénico. Aún más, a diferencia de las preparaciones convencionales (policlonales) de anticuerpos que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante o epitope del antígeno.

La presente invención también abarca "fragmentos de unión al antígeno" de los anticuerpos, y dichos fragmentos se definen en otra parte en la presente. Los fragmentos de anticuerpo típicamente comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general el dominio de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fab' biespecíficos y Fv, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena simple, un fragmento de cadena variable simple (scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos

de anticuerpo (véase Holliger y Hudson, *Nature Biotechnol.*, 23: 1126-36 (2005)).

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención pueden presentar una gran homología con los de origen humano. El nivel de homología con la secuencia humana se puede evaluar a lo largo de la longitud del dominio variable de la cadena pesada (VH) y/o a lo largo de la longitud del dominio variable de la cadena liviana (VL). En el contexto de la presente invención, se puede considerar que un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena liviana (VL) tiene una gran homología humana si los dominios VH y los dominios VL, tomados juntos, presentan por lo menos 90%, por lo menos 92%, por lo menos 94% o por lo menos 96% de identidad de secuencias de aminoácidos con las secuencias VH y VL más coincidentes con la línea germinal humana. En una forma de realización, el dominio VH del anticuerpo con una gran homología humana puede presentar una identidad de secuencias de aminoácidos u homología de secuencias de aminoácidos de por lo menos 90%, por lo menos 92%, por lo menos 94% o por lo menos 96% con uno o más dominios VH humanos en todas las regiones de marco FR1, FR2, FR3 y FR4. En una forma de realización, el dominio VH del anticuerpo con una gran homología humana puede contener una o más faltas de coincidencia (por ejemplo, 1 a 10) de secuencias de aminoácidos en todas las regiones de marco FR1, FR2, FR3 y FR4, en comparación con la secuencia VH humana más coincidente.

En otra forma de realización, el dominio VL del anticuerpo con una gran homología humana puede presentar una identidad de secuencia u homología

de secuencia de por lo menos 90%, por lo menos 92%, por lo menos 94% o por lo menos 96% con uno o más dominios VL humanos en todas las regiones de marco FR1, FR2, FR3 y FR4. En una forma de realización, el dominio VL del anticuerpo con una gran homología humana puede contener una o más faltas de coincidencia (por ejemplo, 1 a 10) de secuencias de aminoácidos en todas las regiones de marco FR1, FR2, FR3 y FR4, en comparación con la secuencia VL humana más coincidente.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente que tienen una gran homología humana pueden incluir anticuerpos que comprenden dominios VH y VL de los anticuerpos no humanos nativos que presentan un % de identidad de secuencia suficientemente alto con secuencias de la línea germinal humana. En determinadas formas de realización, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención son humanizados, o variantes adaptadas a la línea germinal de anticuerpos no humanos, por ejemplo anticuerpos que comprenden dominios VH y VL de anticuerpos convencionales de camélidos modificados para ser humanizados, o variantes adaptadas a la línea germinal de los anticuerpos originales.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y opcionalmente un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID N°: 14. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena pesada (VH) que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena liviana (VL) que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de la cadena pesada (VH) que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana, donde el dominio variable de la cadena pesada

comprende una secuencia de VH con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 14 y/o el dominio variable de la cadena liviana comprende un VL con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 15.

En el caso de las formas de realización en donde los dominios de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno están definidos por un porcentaje de identidad de secuencia particular con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden retener secuencias de CDR idénticas a las secuencias de la secuencia de referencia de manera tal que la variación solamente está presente en las regiones de marco. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que comprenden dominios variables de la cadena pesada y/o dominios variables de la cadena liviana definidos por tener un porcentaje de identidad particular con las SEQ ID N°: 14 y 15, respectivamente, tendrán las siguientes secuencias de CDR:

un VH CDR3 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

un VH CDR2 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12),

un VH CDR1 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

un VL CDR3 que comprende o que consiste en la secuencia de

aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

un VL CDR2 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10), y

un VL CDR1 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En formas de realización no taxativas, los anticuerpos de la presente invención pueden comprender dominios CH1 y/o dominios CL (de la cadena pesada y la cadena liviana, respectivamente), cuyas secuencias de aminoácidos son completa o sustancialmente humanas. Cuando el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención es un anticuerpo pretendido para uso terapéutico en humanos, resulta típico que toda la región constante del anticuerpo, o por lo menos una parte de la misma, tenga una secuencia de aminoácidos completa o sustancialmente humana. Por ello, uno o más o cualquier combinación del dominio CH1, la región de bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CL (y el dominio CH4 si estuviera presente) puede ser completa o sustancialmente humano con respecto a su secuencia de aminoácidos.

Ventajosamente, el dominio CH1, la región de bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CL (y el dominio CH4 si estuviera presente) pueden tener todos una secuencia de aminoácidos completa o sustancialmente humana. En el contexto de la región constante de un anticuerpo humanizado o quimérico, o un fragmento de anticuerpo, el término "sustancialmente humano" se refiere a una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 90% o por lo menos 92% o por lo menos 95% o por lo menos 97% o por lo menos 99% con una región constante humana. El término "secuencia de aminoácidos

humana” se refiere en este contexto a una secuencia de aminoácidos que está codificada por un gen de inmunoglobulina humana, que incluye genes de la línea germinal, reordenadas y mutadas somáticamente. La invención también contempla polipéptidos que comprenden dominios constantes de una secuencia “humana” que ha sido alterada mediante una o más adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia humana, excepto por aquellas formas de realización donde se requiere expresamente la presencia de una región de bisagra “completamente humana”.

La presencia de una región de bisagra “completamente humana” en los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención puede ser beneficiosa tanto para minimizar la inmunogenicidad como para optimizar la estabilidad del anticuerpo.

Según se describe en otra parte en la presente, se contempla efectuar una o más sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada y/o liviana, en particular en la región Fc. Las sustituciones de aminoácidos pueden dar como resultado el reemplazo del aminoácido sustituido por un aminoácido natural diferente o por un aminoácido no natural o modificado. También se permiten otras modificaciones estructurales tales como, por ejemplo, cambios en el patrón de glicosilación (por ejemplo, mediante adición o supresión de sitios de glicosilación N- u O- ligados).

Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 pueden estar modificados en la región Fc para aumentar la afinidad de unión por el receptor neonatal FcRn. La mayor afinidad de unión se puede medir a pH ácido (por ejemplo, entre aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 6,0). La mayor afinidad de

unión también se puede medir a pH neutro (por ejemplo, entre aproximadamente pH 6,9 y aproximadamente pH 7,4). Una “afinidad de unión aumentada” se refiere a una afinidad de unión aumentada al FcRn con relación a la región Fc no modificada. Típicamente, la región Fc no modificada tendrá la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En dichas formas de realización, la afinidad de unión aumentada al FcRn de la molécula de anticuerpo que comprende la región Fc modificada se medirá con relación a la afinidad de unión de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo salvaje por el FcRn.

En determinadas formas de realización, se puede sustituir uno o más residuos de aminoácidos en la región Fc con un aminoácido diferente para así aumentar la unión al FcRn. Se han descrito varias sustituciones en Fc que aumentan la unión al FcRn y de esa manera mejora la farmacocinética del anticuerpo. Dichas sustituciones se describen, por ejemplo, en Zalevsky et al., (2010) *Nat. Biotechnol.* 28(2): 157-9; Hinton et al., (2006) *J Immunol.*, 176: 346-356; Yeung et al., (2009) *J Immunol.*, 182: 7663-7671; Presta LG (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20: 460-470; y Vaccaro et al., (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(10): 1283-88, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 comprenden un dominio Fc IgG humano modificado que comprende o que consiste en las sustituciones de aminoácidos H433K y N434F, en donde la numeración del dominio Fc es acorde con la numeración EU. En una forma de realización adicional, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 que se describen en la presente comprenden un dominio Fc IgG modificado humano que comprende o que consiste en las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T,

T256E, H433K y N434F, en donde la numeración del dominio Fc es acorde con la numeración EU.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 comprenden un dominio Fc IgG modificado humano que consiste en hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 12, hasta 15, hasta 20 sustituciones con relación a la correspondiente secuencia de IgG de tipo salvaje.

Dependiendo del uso pretendido del anticuerpo, puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a sus propiedades de unión a los receptores de Fc, por ejemplo para modular la función efectora. Por ejemplo, se pueden introducir uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación intercatenaria de enlaces disulfuro en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede presentar una mayor capacidad de internalización y/o un aumento en la muerte de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J., *Immunol.*, 148:2918-2922 (1992). La invención también contempla inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo que se describe en la presente conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Las regiones Fc también se pueden modificar para extender la vida media, como describieron Chan y Carter, *Nature Reviews: Immunology*, volumen 10, páginas 301-316, 2010, incorporada en la presente a modo de referencia.

En aún otra forma de realización, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante modificación de uno o más aminoácidos.

En formas de realización particulares, la región Fc se puede modificar de manera tal que no haya una función efectora. Un anticuerpo anti-GARP-TGF-β1 que no tiene una función efectora Fc puede ser de particular utilidad como un agente bloqueante de receptores. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región Fc derivada de isotipos de IgG naturales que tiene una función efectora reducida, por ejemplo la IgG4. Las regiones Fc derivadas de la IgG4 se pueden modificar adicionalmente para aumentar la utilidad terapéutica, por ejemplo mediante la introducción de modificaciones que minimicen el intercambio de brazos entre moléculas de la IgG4 *in vivo*. Las regiones Fc derivadas de la IgG4 se pueden modificar para que incluyan la sustitución S228P.

En aún otra forma de realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo no glucosilado (o aglicosilado) (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno blanco. Dichas modificaciones del hidrato de carbono se pueden obtener, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación en el marco de la región variable, para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede

incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

También se prevén variantes de anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 con un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que comprenda cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo total o parcialmente desfucosilado (como el descrito por Natsume et al., *Drug Design Development and Therapy*, volumen 3, páginas 7-16, 2009) o un anticuerpo con una mayor cantidad de estructuras de GlcNac bisectadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados aumentan la actividad ADCC de los anticuerpos, produciendo típicamente un aumento de ADCC de 10 veces con relación a un anticuerpo equivalente que comprende un dominio Fc humano “nativo”. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono se pueden efectuar, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glucosilación alterada (como describieron Yamane-Ohnuki y Satoh, *mAbs* 1: 3, 230-236, 2009). Los ejemplos de anticuerpos no fucosilados con una función ADCC aumentada son aquellos que se producen usando la tecnología Potelligent® de BioWa Inc.

Los anticuerpos que se pretenden aplicar para uso terapéutico en humanos típicamente serán del tipo de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, a menudo del tipo IgG, en cuyo caso pueden pertenecer a cualquiera de las cuatro subclases IgG1, IgG2a y b, IgG3 o IgG4. En cada una de estas subclases es posible efectuar una o más sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos en la porción Fc, o efectuar otras modificaciones estructurales, por ejemplo para aumentar o reducir las funcionalidades dependientes de Fc.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente al GARP-TGF- β 1 comprenden por lo menos una cadena

pesada de inmunoglobulina de longitud completa y/o por lo menos una cadena liviana lambda o kappa de longitud completa, en donde dicha cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y dicha cadena liviana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente al GARP-TGF- β 1 comprenden por lo menos una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa y/o por lo menos una cadena liviana lambda o kappa de longitud completa, en donde dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y dicha cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente al GARP-TGF- β 1 comprenden por lo menos una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa y/o por lo menos una cadena liviana lambda o kappa de longitud completa, en donde dicha cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y dicha cadena liviana consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17.

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena pesada con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 16, y/o una cadena liviana con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 17.

En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena pesada con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 16. En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena liviana con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 17. En determinadas formas de realización, en la presente se proveen anticuerpos monoclonales que comprende una cadena pesada con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 16, y una cadena liviana con por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se muestra como la SEQ ID N°: 17.

En el caso de las formas de realización en donde las cadenas de los anticuerpos están definidas por un porcentaje de identidad de secuencia particular con una secuencia de referencia, la cadena pesada y/o la cadena liviana puede retener secuencias de CDR idénticas a aquellas de la secuencia de referencia, de manera tal que la variación solamente estará presente fuera de las regiones CDR. En particular, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que comprenden cadenas pesadas y/o cadenas livianas definidas por tener un porcentaje de identidad particular con las SEQ ID N°: 16 y 17, respectivamente, pueden presentar las siguientes secuencias de CDR:

un VH CDR3 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

un VH CDR2 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12),

un VH CDR1 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

un VL CDR3 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11) y

una secuencia de VL CDR2 que comprende o que consiste en la SEQ ID N°: 10 [GASRLKT] y

un VL CDR1 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

Unión al GARP-TGF- β 1

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a un complejo de GARP y TGF- β 1, en particular un complejo de la GARP humana y del TGF- β 1 humano. Según se explica en otra parte en la presente, la proteína GARP es una proteína transmembrana que es expresada sobre la superficie de células T reguladoras y que actúa como el receptor para la forma latente del TGF- β . La Figura 1 incluye una representación esquemática del complejo que se forma entre la GARP y el TGF- β latente en la superficie celular de células T reguladoras.

El complejo de GARP-TGF- β 1 al cual se unen los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención es el complejo de GARP-TGF- β 1 nativo que se forma en la superficie celular entre GARP y TGF- β 1.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se caracterizan por unirse al complejo de GARP-TGF- β 1 pero no se unen a GARP en ausencia del TGF- β 1 o TGF- β latente. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno solamente se unen a GARP en presencia del TGF- β 1. En particular, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno solamente se unen a GARP en presencia del TGF- β 1 latente. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno pueden bloquear o inhibir la liberación del TGF- β activo de las células Treg.

Dado que el antígeno blanco de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención es un complejo que comprende dos proteínas separadas, el epítopo al cual se unirán los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno es un epítopo conformacional, versus un epítopo lineal. El epítopo conformacional comprende por lo menos un residuo de GARP y por lo menos un residuo del TGF- β 1 latente. En formas de realización preferidas, el epítopo conformacional comprende por lo menos un residuo de GARP, por lo menos un residuo del péptido asociado a latencia (LAP) del TGF- β 1 latente y por lo menos un residuo del TGF- β maduro¹.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se pueden unir a un epítopo de un complejo formado por la GARP humana y el TGF- β 1 humano, en donde dicho epítopo comprende por lo menos un residuo de GARP seleccionado entre Y137, S138, G139, T162 y R163 (con referencia a la SEQ ID N°: 33), y por lo menos un residuo de TGF- β 1. En formas de realización preferidas, el epítopo comprende por lo menos los residuos Y137, S138, G139, T162 y R163 de la proteína GARP (con referencia a la SEQ ID N°: 33).

El epítopo puede comprender por lo menos un residuo del polipéptido TGF- β 1 (SEQ ID N°: 34) en donde, opcionalmente, dicho por lo menos un residuo es K338. El epítopo puede comprender por lo menos un residuo del péptido asociado a latencia (LAP) de TGF- β 1 y por lo menos un residuo del TGF- β maduro1. El epítopo puede comprender R58 de LAP y K338 del TGF- β maduro1 (con referencia a la SEQ ID N°: 34).

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen a un complejo de GARP y TGF- β 1. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se pueden unir adicionalmente a un complejo de la GARP humana y del TGF- β 2 humano y/o un complejo de la GARP humana y del TGF- β 3 humano.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención se unen al complejo de GARP y TGF- β 1 con gran afinidad. Según se usa en la presente, el término “afinidad” o “afinidad de unión” se basa en el significado conocido en el arte en el contexto de unión de anticuerpos, y refleja la fuerza y/o estabilidad de unión entre un antígeno y un sitio de unión sobre un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

La afinidad de unión de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo por su respectivo antígeno se puede determinar experimentalmente usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, los instrumentos SPR tal como Biacore™ mide la afinidad basada en la inmovilización de una proteína o antígeno blanco sobre un chip biosensor mientras se pasa el anticuerpo o fragmento de anticuerpo sobre el blanco inmovilizado en condiciones de flujo específicas. En estos experimentos se

obtienen mediciones de k_{on} y k_{off} , que luego se pueden traducir en valores K_D , en donde K_D es la constante del equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo o un fragmento del mismo. Cuanto menor es el valor de K_D , más fuerte es la interacción de unión entre un anticuerpo y su antígeno blanco.

Como se indicó antes, la afinidad de un anticuerpo se puede determinar mediante Biacore™ o SPR, por ejemplo usando el protocolo que se describe en otra parte en la presente. La afinidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para el complejo de GARP-TGF- β 1, medida mediante Biacore™ o SPR, se puede determinar usando un complejo de GARP-TGF- β 1 expresado de manera recombinante, como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 2.

Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden presentar una velocidad de disociación (k_{off}) para el complejo de GARP-TGF- β 1 menor que $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menor que $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menor que $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menor que $1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ cuando se evalúan como un Fab. El anticuerpos anti-GARP-TGF- β o fragmentos de unión al antígeno del mismo de la invención puede presentar una velocidad de disociación (k_{off}) para el complejo de GARP-TGF- β 1 en el rango entre $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ y $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, preferiblemente en el rango entre $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ y $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, más preferiblemente en el rango entre $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención pueden presentar un valor K_D menor que $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menor que $2 \times 10^{-9} \text{ M}$. En formas de realización preferidas, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención presentan un valor de K_D menor que $1,7 \times 10^{-9} \text{ M}$.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente que se unen al complejo de GARP y

TGF- β 1 pueden reaccionar de manera cruzada con una o más especies homólogas de GARP y TGF- β , por ejemplo los homólogos de GARP y TGF- β de primates no humanos.

En determinadas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención no reaccionan de manera cruzada con el complejo de GARP y TGF- β de origen murino. Como alternativa, o además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se pueden unir al complejo de GARP-TGF- β de origen de primates no humanos, en particular el complejo de GARP-TGF- β de cinomolgo. La reactividad cruzada con otras especies homólogas puede ser particularmente ventajosa en el desarrollo y la evaluación de anticuerpos terapéuticos. Por ejemplo, las pruebas de toxicología preclínica de los anticuerpos terapéuticos con frecuencia se llevan a cabo en especies de primates que incluyen, pero en un sentido no taxativo, monos cinomolgos. Por ende, la reactividad cruzada con estas especies homólogas puede ser particularmente ventajosa para el desarrollo de anticuerpos como candidatos clínicos.

Estabilidad mejorada

Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención son mejores en comparación con los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 que se describieron con anterioridad por el hecho que presentan una estabilidad mejorada. En particular, la estabilidad de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 está mejorada en comparación con los anticuerpos que tienen las secuencias de CDR de la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo de referencia anti-GARP-TGF- β 1, LHG-10.6, descrito en WO2015/015003 y WO2016/125017.

El anticuerpo anti-GARP-TGF- β LHG10.6 comprende la siguiente

combinación de secuencias de CDR del dominio variable de la cadena pesada y del dominio variable de la cadena liviana:

una CDR3 de la cadena pesada que consiste en NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 6),

una CDR2 de la cadena pesada que consiste en RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 5),

una CDR1 de la cadena pesada que consiste en SYYID (SEQ ID N°: 4),

una CDR3 de la cadena liviana que consiste en QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

una CDR2 de la cadena liviana que consiste en GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

una CDR1 de la cadena liviana que consiste en QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

Según se informa en otra parte en la presente, se ha encontrado que los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 que comprenden las secuencias de CDR de la cadena pesada y la cadena liviana de LHG10.6 carecen de estabilidad. En particular, se encontró que las variantes de anticuerpo monoclonal adaptadas a la línea germinal de LHG10.6 (denominadas mAb 39B6 IgG4 y 39B6 IgG1 en la presente) muestran una tendencia hacia una menor actividad de unión al blanco cuando se guarda a 37 °C en PBS y en PBS/Tween (véase, por ejemplo, la Figura 2). Esta inestabilidad se atribuyó, por lo menos en parte, a la isomerización y desamidación en la posición N95 de HCDR3, es decir, el primer residuo de la CDR3 de la cadena pesada.

Los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención difieren con respecto a sus secuencias de CDR, en

particular sus secuencias de CDR de la cadena pesada, de manera tal que mejora su estabilidad. En particular, dicha una secuencia de CDR2 de la cadena pesada (HCDR2 o VH CDR2) se modifica para que incluya una sustitución G55A, de manera tal que la secuencia HCDR2 de los anticuerpos de la invención comprende la HCDR2 representada por RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12). Además, la secuencia de la CDR3 de la cadena pesada (HCDR3 o VH CDR3) se modifica para que incluya una sustitución N95Y, de manera tal que la secuencia de HCDR3 de los anticuerpos de la invención comprende la HCDR3 representada por YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13). Los anticuerpos de la presente invención no experimentan desamidación o isomerización. Además, se ha encontrado sorprendentemente que los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la presente invención son relativamente resistentes a la oxidación. La resistencia a la desamidación, isomerización y oxidación se correlaciona con la estabilidad mejorada de los anticuerpos de la invención, en particular una estabilidad mejorada medida a una temperatura de 37 °C.

Además, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención son sorprendentemente ventajosos porque las modificaciones a las secuencias de CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, en comparación con el anticuerpo de referencia LHG10.6, no disminuyen significativamente la actividad de unión al blanco. Como se ejemplifica en la presente, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la presente invención son relativamente estables a 37 °C y no presentan una reducción significativa en la afinidad de unión por el complejo de GARP-TGF- β 1 en comparación con el anticuerpo de referencia LHG10.6 o una variante adaptada a la línea germinal del mismo

(39B6). Según se describe en otra parte, en formas de realización preferidas, los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención tienen un valor de K_D menor que $1,7 \times 10^{-9}$ M.

Según se informa en la presente, no todas las sustituciones en la posición N95 de HCDR3 que elimina el residuo Asn (N) permiten mejorar la estabilidad del anticuerpo al tiempo que también retienen la afinidad de unión por el complejo de GARP-TGF- β 1. Se encontró que una variante de anticuerpo monoclonal adaptada a la línea germinal que tiene una sustitución N95V (denominada 39B6-AVE en la presente) era resistente a la desamidación e isomerización, pero experimentaba una oxidación significativa tras el almacenamiento durante 28 días a 37 °C. También se encontró que la actividad de unión de esta variante de anticuerpo N95V disminuye significativamente sobre un período de 56 días de almacenamiento a 37 °C. Los inventores también encontraron que las sustituciones voluminosas adyacentes a la posición 96 en la cadena pesada (es decir, el segundo residuo de HCDR3) no permitieron mejorar la estabilidad y retener la actividad de unión al antígeno de gran afinidad. Según se ejemplifica en la presente, los inventores evaluaron dos variantes de anticuerpo monoclonal adaptadas a la línea germinal que incluyen las sustituciones E96K y E96R en el dominio HCDR3. La variante E96K (denominada 39B6-ANK en la presente) no experimentó oxidación, pero sí desamidación e isomerización sobre un período de 28 días a 37 °C y experimentó una disminución significativa en la actividad de unión sobre un período de 56 días. La variante E96R (denominada 39B6-ANR en la presente) experimentó una oxidación y desamidación significativa sobre un período de 28 días a 37 °C y una disminución de la actividad de unión sobre un período de 56

días.

En formas de realización preferidas de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden por lo menos un dominio variable de la cadena pesada (VH) y por lo menos un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde

el VH CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12),

el VH CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

el VL CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En algunas formas de realización preferidas de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden por lo menos un dominio variable de la cadena pesada (VH) y por lo menos un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde

el VH CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12),

el VH CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

el VL CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

En algunas formas de realización preferidas de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden por lo menos un dominio variable de la cadena pesada (VH) y por lo menos un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde

el VH CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID N°: 13),

el VH CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID N°: 12),

el VH CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos SYYID (SEQ ID N°: 4),

el VL CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos QQYASVPVT (SEQ ID N°: 11),

el VL CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos GASRLKT (SEQ ID N°: 10) y

el VL CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSISSYLA (SEQ ID N°: 9).

Estos anticuerpos preferiblemente tienen un valor de K_D menor que $1,7 \times 10^{-9}$ M.

En formas de realización particularmente preferidas de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y opcionalmente un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En formas de realización particularmente preferidas de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En formas de realización particularmente preferidas de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

En formas de realización preferidas adicionales de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que

tienen una estabilidad mejorada comprenden una cadena pesada que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y opcionalmente una cadena liviana que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17.

En formas de realización preferidas adicionales de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y opcionalmente una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17.

En formas de realización preferidas adicionales de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de GARP-TGF- β 1 y que tienen una estabilidad mejorada comprenden una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y opcionalmente una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-GARP-TGF- β

La invención también provee moléculas de polinucleótidos que comprenden una o más secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de la invención; vectores de expresión que contienen dichas secuencias de nucleótidos de la invención ligadas operativamente a secuencias reguladoras que permiten expresar los anticuerpos o fragmentos de los mismos en una célula huésped o en un sistema de expresión libre de células; y células huésped o sistemas de expresión libres de células que contienen a dichos

vectores de expresión.

En determinadas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena liviana de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención son codificados por una primera y segunda secuencia de polinucleótidos, en donde dicha primera y segunda secuencia de polinucleótidos comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°: 18 y 19, respectivamente. En determinadas formas de realización, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención pueden comprender variantes de secuencias que codifican los dominios VH o VL funcionales de un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1. Las variantes de las secuencias que codifican los dominios VH pueden presentar por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia cuando se alinean de manera óptima con la SEQ ID N°: 18, y las variantes de las secuencias que codifican los dominios VL pueden presentar por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia cuando se alinean de manera óptima con la SEQ ID N°: 19.

En determinadas formas de realización, la cadena pesada y/o la cadena liviana de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención son codificados por una primera y segunda secuencia de polinucleótidos, en donde dicha primera y segunda secuencia de polinucleótidos comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°: 20 y 21, respectivamente. En determinadas formas de realización, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención pueden comprender variantes de las secuencias que codifican las

cadenas pesadas o las cadenas livianas de un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1. Las variantes de las secuencias que codifican las cadenas pesadas pueden presentar por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia cuando se alinean de manera óptima con la SEQ ID N°: 20, y las variantes de las secuencias que codifican las cadenas livianas pueden presentar por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia cuando se alinean de manera óptima con la SEQ ID N°: 21.

En este contexto, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos se puede determinar mediante comparación de estas dos secuencias alineada de manera óptima y en donde la secuencia de polinucleótidos a comparar puede comprender adiciones o supresiones con respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando la cantidad de posiciones idénticas en las cuales el residuo de nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo esta cantidad de posiciones idénticas por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 con el fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Por ejemplo, es posible usar el programa BLAST, las "secuencias BLAST 2" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.*, 174: 247-250) disponible en ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2, con los parámetros predeterminados (en particular, los parámetros de "penalidad por apertura de hueco": 5, y "penalidad por extensión de hueco": 2; siendo la matriz elegida, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), donde el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar es calculado

directamente por el programa.

Las moléculas de polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN recombinante. Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" o "molécula de polinucleótido", se usan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier molécula de ADN o ARN, ya sea de hebra simple o doble y, si es de hebra simple, la molécula de su secuencia complementaria. Al describir las moléculas de ácidos nucleicos, en la presente se puede describir la secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico particular de acuerdo con la convención normal de proveer la secuencia en la dirección 5' a 3'. En algunas formas de realización de la invención, los ácidos nucleicos o polinucleótidos están "aislados." Este término, cuando se aplica a una molécula de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de las secuencias que son inmediatamente contiguas en el genoma natural del organismo del cual se originó. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un vector plasmídico o viral, o integrada en el ADN genómico de una célula procariota o eucariota o un organismo huésped no humano. Cuando se aplica a ARN, el término "polinucleótido aislado" se refiere primariamente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada definida precedentemente. Como alternativa, el término puede hacer referencia a una molécula de ARN que ha sido purificada/separada de otros ácidos nucleicos con los cuales estaría asociado en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un polinucleótido aislado (ya sea ADN o ARN) también puede representar una molécula producida directamente con medios biológicos o sintéticos y que es separado

de los demás componentes presentes durante su producción.

Para la producción recombinante de un anticuerpo de acuerdo con la invención, se puede preparar un polinucleótido recombinante que lo codifica (usando técnicas estándar de biología molecular) y luego se puede insertar en un vector replicable para su expresión en la célula huésped o el sistema de expresión libre de células de elección. Las células huésped adecuadas pueden ser células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores, específicamente células de mamífero. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero que son de utilidad comprenden la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivos en suspensión, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino /-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de mieloma de ratón SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) o NS0 (colecciones de cultivos HPA N° 85110503); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2), así como la línea celular PERC-6 de

DSM. Los vectores de expresión adecuados para usar en cada una de estas células huésped también son conocidos en general en el arte.

Cabe mencionar que el término "célula huésped" generalmente se refiere a una línea de células cultivadas. Los seres humanos completos en quienes se ha introducido un vector de expresión que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la invención están excluidos explícitamente de la definición de una "célula huésped".

Producción de anticuerpos

En un aspecto adicional, la invención también provee un método para producir los anticuerpos de la invención, que comprende cultivar una célula huésped (o un sistema de expresión libre de células) que contiene uno o más polinucleótidos (por ejemplo, un vector de expresión) que codifican el anticuerpo en condiciones que permitirán la expresión del anticuerpo y recuperar el anticuerpo expresado. Este proceso de expresión recombinante se puede usar para una producción a gran escala de los anticuerpos, inclusive de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de acuerdo con la invención, incluyendo anticuerpos monoclonales pretendidos para uso terapéutico en humanos. Los vectores, líneas celulares y procesos de producción adecuados para una elaboración a gran escala de los anticuerpos recombinantes adecuados para el uso terapéutico *in vivo* están disponibles en general en el arte y son bien conocidos por el especialista.

Composiciones farmacéuticas

El alcance de la invención incluye composiciones farmacéuticas que contienen uno o una combinación de anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, formulados con

uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 (por ejemplo, dos o más, diferentes). Las técnicas para formular anticuerpos monoclonales para uso terapéutico humano son bien conocidas en el arte y se han revisado, por ejemplo, en Wang *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, volumen 96, páginas 1-26, 2007, cuyo contenido se incorpora por completo en la presente.

En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas se formulan para su administración a un sujeto por cualquier ruta de administración adecuada incluyendo, pero en un sentido no taxativo, una administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, epidural, nasal, oral, rectal, tópica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual) y transdérmica.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones incluyen, pero en un sentido no taxativo, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias amortiguadoras, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato de disodio, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio), polietilenglicol, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Utilidad terapéutica de los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se pueden usar en métodos de tratamiento, en donde a un sujeto que lo necesita se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En determinadas formas de realización, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se pueden usar en métodos de tratamiento, en donde a un sujeto humano que lo necesita se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En la presente se proveen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen al complejo de GARP y TGF- β 1 humano, para su uso como medicamentos.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención se unen al complejo de GARP-TGF- β sobre células T reguladoras y pueden bloquear o inhibir la producción o liberación del TGF- β activo. Por ello, en un aspecto adicional de la invención, en la presente se proveen métodos para tratar a sujetos que padecen o sospechados de tener trastornos relacionados con TGF- β . Dichos métodos comprenden administrarle a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 de la invención.

Los ejemplos de trastornos relacionados con TGF- β incluyen, pero en un sentido no taxativo, enfermedades inflamatorias, infección crónica, cáncer, fibrosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedad cerebrovascular (por ejemplo accidente cerebrovascular isquémico) y enfermedades neurodegenerativas. En determinadas formas de realización, el trastorno relacionado con TGF- β es una infección crónica. En determinadas formas de

realización, el trastorno relacionado con TGF- β es cáncer.

Para usarlos en la administración a un sujeto, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas. Las composiciones se pueden administrar por vía oral, parenteral, como un rocío por inhalación, por una ruta tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. El término “administración” según se usa en la presente incluye, en un sentido no taxativo, una inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesión, intratumoral e intracraneal o técnicas de infusión.

Las formas inyectables estériles de las composiciones pueden comprender una suspensión acuosa u oleaginoso. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos en el arte, usando agentes de dispersión, humectantes y de suspensión apropiados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico aceptable para uso parenteral. Entre los vehículos y los solventes aceptables que se pueden emplear se pueden mencionar agua, solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como solventes o medios de suspensión. Para tal fin se puede emplear cualquier aceite fijo inocuo incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tal como el ácido oleico y sus derivados glicérido, son de utilidad en la preparación de inyectables, como los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tal como aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietilados. Estas soluciones o suspensiones

oleosas también pueden contener un diluyente o un dispersante alcohólico de cadena larga, tales como carboximetilcelulosa, o agentes dispersantes similares, que comúnmente se usan en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros agentes tensioactivos de uso común, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad, que son usados comúnmente en la fabricación de formas sólidas o líquidas aceptables para el uso farmacéutico, o de otras formas de dosificación, también pueden usarse para los propósitos de formulación.

Los programas y las dosificaciones para la administración del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo en las composiciones farmacéuticas se pueden determinar de acuerdo con métodos conocidos para estos tipos de productos, por ejemplo usando las instrucciones del proveedor. Por ejemplo, el anticuerpo presente en una composición farmacéutica de esta invención se puede proveer a una concentración de 10 mg/ml en viales descartables de 100 mg (10 ml) o de 500 mg (50 ml). El producto se formula para una administración intravenosa (IV) en 9,0 mg/ml de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de citrato de sodio dihidratado, polisorbato 80 0,7 mg/ml y agua para inyectables estéril. El pH se ajusta en 6,5.

Para el uso clínico, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se puede administrar a un sujeto en una o más dosis. Para las rutas de administración parenterales, una dosis única del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En una forma de realización, una dosis única del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede

comprender, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En una forma de realización, una dosis única del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. Para una dosificación repetida, las dosis individuales se pueden administrar por la misma ruta o por rutas de administración diferentes. Además, para dosificaciones repetidas, las dosis individuales pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, la primera dosis o dosis de carga puede ser mayor que la subsiguiente. Además, en el caso de dosificaciones repetidas las dosis individuales se pueden administrar según un programa fijo o según un programa ajustable o variable basado, por ejemplo, en la condición clínica o respuesta clínica del sujeto. Además, en el caso de dosificaciones repetidas, las dosis individuales típicamente se pueden administrar una vez por día, una vez día por medio, una vez cada 3, 4, 5, 6 ó 7 días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres o cuatro semanas o una vez cada dos meses. La invención también contempla otros programas.

Se podrá apreciar que estas dosis y programas se ofrecen a modo de ejemplo y que el programa y régimen óptimos se podrán determinar teniendo en cuenta factores tales como el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno particular a administrar, la enfermedad o trastorno a tratar, el tamaño, la edad y el estado del sujeto a tratar, la ruta de administración, otras terapias que se administran al sujeto y la afinidad y tolerabilidad del anticuerpo particular. Dichas consideraciones sobre factores y dosificación se pueden determinar en uno o más ensayos clínicos.

La presente invención también provee métodos para reforzar el sistema

inmunológico en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención. La presente invención también provee métodos para inhibir la función inmunosupresora de las Treg humanas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

La presente invención también provee métodos para el tratamiento de cáncer usando los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 y fragmentos de unión al antígeno de la invención. Dichos métodos pueden comprender reducir la inmunosupresión en el entorno tumoral en un sujeto que lo necesita.

En el caso de las formas de realización en donde los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son para usar en métodos de tratamiento de cáncer, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden administrar en combinación con uno o más tratamientos adicionales para el cáncer, por ejemplo uno o más agentes inmunoterapéuticos.

En las formas de realización donde los anticuerpos anti-GARP-TGF- β 1 se administran en combinación con un agente inmunoterapéutico, dicho agente inmunoterapéutico puede ser una vacuna contra tumores. Como alternativa, el agente inmunoterapéutico puede ser un anticuerpo inmunoestimulante.

Sin considerar una teoría particular, los anticuerpos de la invención probablemente mejoren la eficacia del agente inmunoterapéutico mediante una prevención o alivio de toda inmunosupresión. En determinadas formas de realización, la combinación con un agente inmunoterapéutico puede presentar

un efecto sinérgico.

Se pueden tratar diversos cánceres de acuerdo con los métodos que se describen en la presente que incluyen, pero en un sentido no taxativo, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, glioma, carcinoma de mama, tumor carcinoide, cáncer cervical, carcinoma de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de los conductos biliares extrahepáticos, tumor de Ewing, tumor de células germinales extracraneal, cáncer oftalmológico, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hipofaringe, carcinoma de células de los islotes, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de labio y de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, mesotelioma, carcinoma de células de Merkel, cáncer de cabeza y cuello escamoso metastásico, mieloma, neoplasia, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de los senos y nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, cáncer de la glándula pituitaria, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, rabdomiosarcoma, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel, sarcoma de Kaposi, linfoma de células T, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer de testículo, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva o tumor de Wilms.

Los antígenos tumorales adecuados para usar como vacunas contra tumores conocidos en el arte incluyen, por ejemplo: (a) antígenos de cáncer de testículo tales como NY-ESO-1, SSX2, SCP1, así como los polipéptidos de la

familia RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que se pueden usar, por ejemplo, para tratar melanoma, tumores de pulmón, de cabeza y cuello, CPNM, de mama, gastrointestinales y de vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con varios tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado, por ejemplo, con melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CD 4 (asociado, por ejemplo, con melanoma), MUM 1 (asociado, por ejemplo, con melanoma), caspasa-8 (asociado, por ejemplo, con cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado, por ejemplo, con cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociada, por ejemplo, con melanoma), TCR (asociado, por ejemplo, con linfoma no Hodgkin de células T), BCR-abl (asociado, por ejemplo, con leucemia mielógena crónica), triosafosfato isomerasa, IA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociada, por ejemplo, con cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociada, por ejemplo, con la enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada, por ejemplo, con leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociada, por ejemplo, con varias leucemias), anhidrasa carbónica (asociada, por ejemplo, con cáncer renal), aldolasa A (asociada, por ejemplo, con cáncer de pulmón), PRAME (asociada, por ejemplo, con melanoma), HER-2/neu (asociada, por ejemplo, con cáncer de mama, de colon, de pulmón y de ovario), alfafetoproteína (asociada, por ejemplo, con hepatoma), SA (asociada, por ejemplo, con cáncer colorrectal), gastrina (asociada, por ejemplo, con cáncer de páncreas y gástrico), proteína catalítica de telomerasas, MUC-1 (asociado, por ejemplo, con cáncer de mama y de ovario), G-250 (asociado, por ejemplo, con carcinoma de células renales)

y antígeno carcinoembrionario (asociado, por ejemplo, con cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tal como cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación melanoma-melanocitos tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa-1/TRP1 y proteína relacionada con la tirosinasa-2/TRP2 (asociado, por ejemplo, con melanoma), (e) antígenos asociados a la próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados, por ejemplo, con cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados, por ejemplo, con mieloma y linfomas de células B) y (g) otros antígenos tumorales, tales como antígenos que contienen polipéptidos y sacáridos, que incluyen (i) glucoproteínas tales como sialilo Tn y sialilo Le^x (asociadas, por ejemplo, con cáncer de mama y colorrectal), así como con varias mucinas; glicoproteínas que se pueden acoplar a una proteína transportadora (por ejemplo, MUC-1 que se puede acoplar a LH); (ii) lipopolipéptidos (por ejemplo, MUC-1 unido a una unidad lipídica); (iii) polisacáridos (por ejemplo, el hexasacárido sintético Globo H), que se puede acoplar a proteínas transportadoras (por ejemplo, a KLH), (iv) gangliósidos tales como GM2, GM12, GD2, GD3 (asociados, por ejemplo, con cáncer de cerebro, de pulmón, melanoma), que también puede estar acoplado a proteínas transportadoras (por ejemplo, KLH). Otros antígenos tumorales incluyen pi 5, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH- IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del papilomavirus humano (HPV), inclusive E6 y E7, antígenos del virus de hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de células T humanas, TSP-180, pl85erbB2, pl80erbB-3, c-met, mn-

23H I, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p 16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO- 1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y semejantes.

Los anticuerpos inmunoestimulantes adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo: anticuerpos anti-CTLA-4, anti-PD1, anti-PDL1 y anti-KIR.

En determinadas formas de realización, los métodos para tratar cáncer que se describen en la presente, comprenden administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención antes, de manera concurrente y/o después de la administración de otro agente anticáncer o tratamiento del cáncer, tal como un tratamiento por quimioterapia.

La presente invención también incluye métodos para prevenir enfermedades infecciosas mediante la administración de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención para de esa manera mejorar la eficacia de las estrategias de vacunación. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden incluir prevenir enfermedades infecciosas tales como VIH, malaria o Ébola mediante una administración combinada de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente junto con vacunas particulares para estas enfermedades.

Kits

En un aspecto adicional, la presente invención provee un kit que comprende por lo menos un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 o fragmento de unión al antígeno de la invención.

El término “kit” se refiere a cualquier producto (por ejemplo, un envase o un recipiente) que comprende por lo menos un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención, para la unión específica al complejo de GARP-TGF- β 1. El kit se puede promover, distribuir o comercializar como una unidad para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Además, cualquiera o todos los reactivos del kit se pueden suministrar en recipientes que los protegerán contra el entorno exterior, tal como en recipientes sellados. Los kits también pueden comprender un prospecto donde se describe el kit y los métodos para su uso.

EJEMPLOS

La invención se comprenderá además con referencia a los siguientes ejemplos no taxativos.

Ejemplo 1: Adaptación a la línea germinal del anticuerpo LHG-10.6

La producción y caracterización del anticuerpo “LHG-10” se describe en las Solicitudes de Patente Internacional WO2015/015003 y WO2016/125017, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente. El anticuerpo LHG-10 se generó mediante inmunización de llamas con células HEK293E que sobreexpresan el complejo de GARP-TGF- β 1 humano y se identificó mediante selección y examen con selección de Fabs del GARP-TGF- β 1. Se usó un enfoque de entremezclado de cadenas livianas (que se describe por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional WO2014/033252) para mejorar la afinidad del anticuerpo monoclonal LHG-10, y se identificó una variante “LHG-10.6” (también denominada 17H5 en la presente) que presentaba características de unión mejoradas. En la Tabla 3 se muestran las secuencias VH y VL del LHG-10 y la variante de entremezclado Vk LHG-10.6.

Tabla 3

		SEQ ID N°
dominio VH de LHG-10 y LHG10.6	EVQLVQPGAELRNSGASVKVSCASGYRFT SYYID WVRQAPGQGLEWMG RIDPEDGGTKYAQKFQG RVTFTADTSTSTAYVELSSLRSEDNAVYYCAR NEWETVVVGDLMEYEY WGQGTQVTVSS	1
dominio VL de LHG-10	DIQMTQSPSSLSASLGDRVITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYDSLPT FGQGTKVELK	2
dominio VL de LHG10.6	DIQMTQSPSSLSASLGDRVITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPNIIY GASRLKT GVPSRFGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYASVPVT FGQGTKVELK	3

Se encontró que el anticuerpo 17H5 tiene un 88,5% de identidad con la secuencia de línea germinal humana más comparable (X92343|IGHV1-46*01) en todo el dominio VH y un 86,2% de identidad con la secuencia de línea germinal humana más comparable (X59315|IGKV1-39*01) en todo el dominio VL. Este anticuerpo fue sometido a adaptación a la línea germinal de acuerdo con un método de 3 pasos:

1. Ensamblaje de una bibliotecas de genes usando oligonucleótidos superpuestos para generar mediante síntesis los genes que codifican la cadena variable liviana (VL) y la cadena variable pesada (VH) por medio de PCR.
2. Clonación de esta biblioteca de genes en un vector (pCB13) que contiene los genes que codifican la cadena constante pesada (CH1) y la cadena constante liviana kappa (Ck) humanas (construcción de la biblioteca).
3. Selección de los Fab funcionales usando expresión en fagos y selección por afinidad.

1. Construcción de bibliotecas

La secuencia VH de 17H5 se comparó con la secuencia de línea germinal humana más comparable y se identificaron los residuos del marco que se desviaban de la línea germinal humana. Se dejó que estos residuos del marco muten al residuo presente en la región V humana, en tanto también se conservó el residuo original en la biblioteca. Los residuos 12 VH que se habían dejado mutar por sus contrapartes humanas se muestran en la siguiente tabla. Además de estas mutaciones de adaptación a la línea germinal, se dejó que mutara un sitio de isomerización en la CDR2 (D54;D55) y un sitio de oxidación en la CDR3 (M100f). En la siguiente tabla también se muestran estos sitios.

Tabla 4: Residuos de interés buscados en el dominio VH 17H5

Posición	aa de camélido	aa mutado	Probabilidad	Clones
1	E	Q	0,5	2
7	P	S	0,5	2
11	L	V	0,5	2
12	R	K	0,5	2
13	N	K	0,5	2
14	S	P	0,5	2
28	R	T	0,5	2
54 (HCDR2)	D	E	0,5	2
55 (HCDR2)	G	A	0,5	2
69	F	M	0,5	2
71	A	R	0,5	2
78	A	V	0,5	2
80	V	M	0,5	2
100f (HCDR3)	M	L/T	0,33	3
108	Q	L	0,5	2

Para la Vk de 17H5, una comparación entre la secuencia de línea germinal humana más comparable y las secuencias del marco condujo a la identificación de 11 residuos de interés. En la siguiente tabla se muestran estos sitios.

Tabla 5: Residuos de interés buscados en el dominio VL 17H5

Posición	aa de camélido	aa mutado	Probabilidad	Clones
11	L	V	0,5	2
42	Q	K	0,5	2
45	N	K	0,5	2
46	I	L	0,5	2
70	S	D	0,5	2
77	G	S	0,5	2
79	E	Q	0,5	2
80	A	P	0,5	2
83	A	F	0,5	2
84	G	A	0,5	2
106	L	I	0,5	2

En la Tabla 6 se muestran los tamaños teóricos de la biblioteca 17H5 adaptada a la línea germinal.

Tabla 6

	17H5
tamaño de la biblioteca VH	5×10^4
tamaño de la biblioteca VL	2×10^3
tamaño de la biblioteca final	1×10^8

2. Construcción de la biblioteca de genes

Las bibliotecas adaptadas a la línea germinal se crearon mediante ensamblaje de genes. Se generaron genes sintéticos de VH y VL (dos conjuntos) sobre la base de este diseño mediante ensamblaje basado en PCR (Stemmer *et al.*, *Gene* (1995) 164: 49 - 530). Se ensamblaron oligonucleótidos superpuestos con mutaciones específicas en determinadas posiciones mediante PCR. Los nucleótidos fueron degenerados para codificar el aminoácido humano y de llama. Esto se realizó para prevenir una pérdida de unión completa en el caso que los residuos de llama fueran críticos para la estabilidad, el plegamiento o una unión de gran afinidad.

Los genes sintéticos de las bibliotecas V_k y VH 17H5 se clonaron

primero en el pCB13-CK1, un vector de fagémido con los dominios Ck y CH1 humanos, respectivamente. Después de construir estas subbibliotecas VkCk y VHCH1, se obtuvieron las bibliotecas finales mediante ligación del inserto de la cadena pesada en la biblioteca de cadenas livianas. Se condujo una PCR de colonias para determinar el porcentaje de insertos y los clones fueron enviados para su secuenciación a fin de asegurar que todas las mutaciones deseadas estuvieran presentes en la biblioteca. Las características de las diferentes bibliotecas se describen en la siguiente tabla.

Tabla 7: Características de las bibliotecas 17H5 adaptadas a la línea germinal

	17H5
tamaño de la biblioteca VH	1E5
tamaño de la biblioteca VL	1E3
tamaño de la biblioteca final	1E8
% de insertos	85%

Se encontró que la adaptación a la línea germinal de las bibliotecas era de buena calidad y que se podían usar para las selecciones.

3. *Selección de Fabs con gran identidad humana*

Se usó expresión en fagos para seleccionar los Fabs de gran afinidad por el complejo de GARP-TGF- β 1 humano, como ya se había descrito en WO2015/015003, cuyo contenido se incorpora por completo en la presente. Brevemente, se recubrió una placa de microtitulación O/N a 4 °C con el complejo de GARP-TGF- β 1 y al día siguiente se incubaron los fagos que expresan Fab durante 2 horas en pocillos recubiertos con diferentes concentraciones del complejo. Las placas se lavaron y el fago específico se eluyó con tripsina y se usó para infectar células TG1. Los detalles de las condiciones de selección se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Detalles de las rondas de selección para la biblioteca adaptada a la línea germinal de 17H5

Ronda	Entrada de fagos (μl)	huGARP-TGF-β1 [ng/pocillo]	Tiempo de lavado	Antígeno de lavado
1	10	1000-100-10	-	-
2	1	1000-100-10	-	-
3	1	1000-100-10	2 horas	20 x huGT
4	1	1000-100-10	24 horas	20 x huGT
5	1	1000-100-10	72 horas	20 x huGT
6	1	1000-100-10	1 semana	100 x huGT

Después de la primera ronda de selección, solo se observó enriquecimiento sobre un recubrimiento de una proteína irrelevante a 10 μg/ml. En la ronda 2, el enriquecimiento era 10 veces mayor, en tanto la cantidad de fago de entrada era 10 veces menor. A partir de la ronda 3, se aumentó la severidad incrementando la duración del lavado y agregando un exceso del blanco en solución. Se agregó un gran exceso del blanco soluble en solución para impedir la unión del fago disociado. Aún después de la 6ª ronda, con un lavado para lograr la disociación de 1 semana y un exceso 100X del blanco soluble, todavía se observaba enriquecimiento.

4. *Examen y selección de Fabs con gran identidad humana*

Se repicaron placas maestras de las rondas de selección 2, 3, 4, 5 y 6 (48 clones por cada ronda). Se prepararon extractos periplasmáticos y se determinaron las velocidades de disociación mediante SPR (usando Biacore). Se secuenció el ADN de todos los clones y se dedujeron las secuencias de aminoácidos a partir de los mismos. Los clones con una identidad por la región V Ig de la línea germinal humana por encima del 92% se resumen en la Tabla 9. Las velocidades de disociación de estos clones se midieron como extractos periplasmáticos sobre SPR (usando Biacore), y se compararon con la velocidad

de disociación de Fab 17H5.

Tabla 9: Afinidad de unión de clones con más de 92% de identidad humana total

Fab	Velocidad de disociación (10^{-4} s^{-1})	% de identidad de VH	% de identidad de VK	% de identidad global	Sitio de isomerización D54;G55 (HCDR2)	Oxidación, riesgo M100f (HCDR3)
17H5	2,01	88,5	86,2	87,4	wt (D54;G55)	wt (M100f)
*39A12	6,06	95,4	96,2	95,8	E54;G55	T100f
*39A5	1,9	94,2	96,2	95,2	Wt salvaje [tipo]	wt
39H6	4,4	93,1	96,2	94,7	wt	wt
40H3	2,47	94,2	95,0	94,6	wt	wt
39A10	1,77	94,2	95,0	94,6	wt	wt
*39B6	1,05	95,4	93,7	94,6	wt	wt
39E6	8,61	96,5	92,5	94,5	wt	wt
40G4	2,07	93,1	95,0	94,1	wt	wt
38C3	2,32	95,4	92,5	94,0	wt	wt
39G3	6,62	95,4	92,5	94,0	E54;G55	T100f
39G9	9,47	95,4	92,5	94,0	E54;G55	T100f
38F3	2,03	91,9	95,0	93,5	D54;A55	wt
*38F2	4,08	94,2	92,5	93,4	D54;A55	T100f
*39B10	2,36	95,4	91,2	93,3	E54;G55	wt
39C6	7,89	95,4	91,2	93,3	E54;G55	T100f
39G6	7,79	94,2	91,2	92,7	wt	L100f
38C5	1,69	90,8	93,7	92,3	E54;G55	wt
38B2	2,86	93,1	91,2	92,2	wt	T100f

* 5 Fabs que fueron reformateados como IgG1 completa

Los 5 clones que muestran una identidad humana global de >93% y una velocidad de disociación comparable a la del Fab 17H5 parental se reclonaron como anticuerpos IgG1 humanas completas. Las secuencias de CDR, VH y VL

de estos anticuerpos se muestran en las Tablas 10, 11 y 12.

Tabla 10: Secuencias VH CDR de los Abs anti-GARP-TGF- β 1

	CDR1	SEQ ID N°	CDR2	SEQ ID N°	CDR3	SEQ ID N°
39B6	SYIID	4	RIDPEDGG TKYAQKF QG	5	NEWETVV VGDLME YEY	6
39A12	SYIID	4	RIDPEEGG TKYAQKF QG	7	NEWETVV VGDLTYEY EY	32
39A5	SYIID	4	RIDPEDGG TKYAQKF QG	5	NEWETVV VGDLME YEY	6
38F2	SYIID	4	RIDPEDAG TKYAQKF QG	8	NEWETVV VGDLTYEY EY	32
39B10	SYIID	4	RIDPEEGG TKYAQKF QG	5	NEWETVV VGDLME YEY	6

Tabla 11: Secuencias VL CDR de los Abs anti-GARP-TGF- β 1

	CDR1	SEQ ID N°	CDR2	SEQ ID N°	CDR3	SEQ ID N°
39B6	QASQSISS YLA	9	GASRLKT	10	QQYASVP VT	11
39A12	QASQSISS YLA	9	GASRLKT	10	QQYASVP VT	11
39A5	QASQSISS YLA	9	GASRLKT	10	QQYASVP VT	11
38F2	QASQSISS YLA	9	GASRLKT	10	QQYASVP VT	11
39B10	QASQSISS YLA	9	GASRLKT	10	QQYASVP VT	11

Tabla 12: Secuencias del dominio variable de los Abs anti-GARP-TGF- β 1

Clon	VH	SEQ ID N°	VL	SEQ ID N°
39B6	QVQLVQPGAEVR KPGASVKVSCA SGYRFT SYIIDWVRQAPG QGLEWMGRIDPE DGGTKYAQKFQG RVTMTADTSTSTV YVELSSLRSEDTA VYYCAR NEWETVVVGDL MEYEY WGQGTLLTVSS	22	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKILY GASRLKTGVPSRFS SGSGSGTSFTLTIS SLEPEDAATYYC QQYASVPVTFGQ GTKVEIK	23
39A12	EVQLVQPGAEVK	24	DIQMTQSPSSLSASVG	25

	KPGASVKVSCA SGYRFT SYYIDWVRQAPG QGLEWMGRIDPE EGGTKYAQKFQG RVTFTADTSTSTV YVELSSLRSED TA VYYCAR NEWETVVVGDLT YEY WGQGT LTVSS		DRVTITCQASQSISSYL AWYQQKPGQAPKILYIG ASRLKTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDF ATYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	
39A5	QVQLVQPGAELR NPGASVKVSCA SGYRFT SYYIDWVRQAPG QGLEWMGRIDPE DGGTKYAQKFQG RVTFTTRDTSTSTV YVELSSLRSED TA VYYCAR NEWETVVVGDLM YEY WGQGT LTVSS	26	DIQMTQSPSSLSASLGD RVTITCQASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIYG ASRLKTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDA ATYYCQQYASVPVT FGQGTKVEIK	27
38F2	QVQLVQPGAELK KPGASVKVSCA SGYRFT SYYIDWVRQAPG QGLEWMGRIDPE DAGTKYAQKFQG RVTFTADTSTSTV YVELSSLRSED TA VYYCAR NEWETVVVGDLT YEY WGQGT LTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCQASQSISSYL AWYQQKPGKAPNLLIY GASRLKTEVPSRFSGS GSGTDFTLISGLEPEDA GTYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	29
39B10	EVQLVQSGAELKK PGASVKVSCAS GYRFTSYYID WVRQAPGQGLE WMG RIDPEEGGTKYAQ KFQG RVTMTADTSTSTA YVELSSLRSED TA VYYCAR NEWETVVVGDLM YEY WGQGT LTVSS	30	DIQMTQSPSSLSASLGD RVTITCQASQSISSYLA WYQQKPGQAPNIIYG ASRLKTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISGLEAEDF ATYYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	31

5. *Caracterización in vitro de los mAbs con una gran identidad de residuos del marco humano*

Los cinco clones adaptados a la línea germinal reformateados a la IgG1 humana se produjeron mediante transfección transitoria en células HEK 293E. Todos los anticuerpos fueron evaluados por su unión al complejo de GARP-TGF- β 1 humano mediante SPR y mostraron una afinidad de unión similar por el clon parental no adaptado a la línea germinal (KD 2-5 veces menor que 17H5). El cambio del residuo M100f en la CDR3 por una treonina disminuyó la $K_D \approx 5$ veces. Las propiedades de unión y características de los Abs 17H5 adaptados a la línea germinal se indican en la Tabla 13.

Tabla 13: Propiedades de unión y características de los Abs 17H5 adaptados a la línea germinal

mAb	KD (M)	diferencia	sitio de isomerización D54;G55	oxidación, riesgo, M100f	% de identidad de VH	% de identidad de VK	% de identidad global
17H5	1,00E-10	1,0	wt (DG)	wt (M)	88,5	86,2	87,3
39B6	1,67E-10	1,7	wt (DG)	wt (M)	95,4	93,7	94,5
39B10	2,62E-10	2,6	EG	wt (M)	95,4	91,2	93,3
39A5	2,98E-10	3,0	wt (DG)	wt (M)	94,2	96,2	95,2
38F2	4,80E-10	4,8	DA	T	94,2	92,5	93,3
39A12_T	5,05E-10	5,1	EG	T	95,4	96,2	95,8

6. *Estabilidad del mAb 39B6 adaptado a la línea germinal*

Se seleccionó el clon 39B6 como clon principal adaptado a la línea germinal en base a sus características de unión. Este anticuerpo se produjo en dos formatos deficientes en función efectora, hIgG1^{N297Q} y hIgG4^{S228P}, y se

condujeron pruebas de estabilidad. Antes de la prueba de estabilidad, se evaluó la afinidad de los anticuerpos 39B6 deficientes en función efectora para el GARP-TGF- β 1 mediante BiacoreT200 usando un chip CM5 recubierto con el complejo de GARP-TGF- β 1 a 750 RU (Tabla 14) o recubierto con los anticuerpos a 1000 RU (Tabla 15).

Tabla 14

mAb	Formato	K_D (M)	Diferencia
LHG10.6	IgG1-N297Q	8,19E-10	1
39B6	IgG1-N297Q	8,63E-11	0.1
39B6	IgG4-S228P	3,13E-10	0.4

Tabla 15

mAb	Formato	K_D (M)	Diferencia
LHG10.6	IgG1-N297Q	5,34E-10	1
39B6	IgG1-N297Q	1,23E-09	2.3
39B6	IgG4-S228P	1,02E-09	1.9

La tolerancia térmica de los anticuerpos 39B6 se evaluó usando la siguiente configuración.

- Preparación de la muestra de mAb: Se introdujo 1 ml de los mAbs (39B6-IgG1 y 39B6-IgG4), solución madre recién preparada (5 mg/ml), en viales de vidrio con tapa a rosca de vidrio de 2 ml y se guardaron a 5 °C y 37 °C. Se verificó inmediatamente la ausencia de partículas en los viales.
- Control negativo de PBS: Se prepararon alícuotas de 1 ml de PBS de Dulbecco filtrado en viales de vidrio de 2 ml como control negativo de PBST. Se verificó inmediatamente la ausencia de partículas en los viales.
- Control negativo de PBSTw: Se prepararon alícuotas de 1 ml de PBS de Dulbecco filtrado que contiene 0,02% de Tween80 (Sigma) en viales de vidrio de 2 ml como control negativo de PBSTw. Se verificó inmediatamente la ausencia de partículas en los viales.

- **Control de gran agregación:** Se prepararon alícuotas de 1 ml de un anticuerpo de los inventores con una agregación visible abundante en viales de vidrio de 2 ml.
- **Muestra de referencia:** Para cada anticuerpo, se prepararon alícuotas de 60 µl de mAb en tubos para PCR estériles, de 500 µl, se marcaron y se guardaron a -20 °C.

La estabilidad de los anticuerpos guardados a diferentes temperaturas y en diferentes condiciones (PBS versus PBSTw) se monitoreó por un tiempo de 56 días. El efecto del almacenamiento sobre la actividad de unión al blanco medida mediante SPR (Biacore™) se muestra en la Figura 2. Como se puede observar a partir de los resultados presentados, el anticuerpo 39B6 (en ambos formatos deficientes en función efectora) mostró una tendencia hacia una menor actividad de unión al blanco en ambos PBS y PBS/Tween cuando se guardaba a 37 °C. Por el contrario, las muestras guardadas a 5 °C no mostraron una pérdida significativa de actividad de unión al blanco por ese período de tiempo.

Ejemplo 2: Desarrollo de anticuerpos anti-GARP-TGF-β1 con estabilidad mejorada

2.1 Producción de variantes 39B6

Se encontró que la disminución en la actividad de unión al blanco indicada antes para el anticuerpo 39B6 estaba ligada a una desamidación en las posiciones 95-96 de VH CDR3. Entonces, se procedió a mejorar la estabilidad de 39B6.

Primero, este clon fue sometido a una modificación de la cadena VH en las región CDR2 para introducir una sustitución G55A (39B6-A). Las regiones

VH y VL de 39B6-A se clonaron nuevamente en el esqueleto de la IgG4^{S228P} humana, es decir el formato de anticuerpo humano deficiente en función efectora.

En un intento por mejorar la estabilidad del anticuerpo IgG4^{S228P} 39B6-A, se generaron cinco variantes con mutaciones en las posiciones 95 ó 96 de la CDR3 del dominio VH. Estas variantes se muestran más abajo. Todas las variantes se produjeron con el formato de IgG4^{S228P} deficiente en función efectora.

Tabla 16: Variantes de 39B6-A

Variante	Posición 95	Posición 96
39B6-AVE	V	E*
39B6-AYE	Y	E*
39B6-ANK	N*	K
39B6-ANR	N*	R
39B6-AEE	E	E*

*residuo ya presente en 39B6-A

Los anticuerpos se filtraron y se concentraron a 5 mg/ml y se guardaron en PBS de Dulbecco con 0,02% de Tween80 (Sigma). El Tween80 era necesario para estabilizar las formulaciones de anticuerpo.

Se evaluó la afinidad de todos los anticuerpos (incluyendo 39B6-A) para el GARP-TGF- β 1 mediante BiacoreT200 usando un chip CM5 recubierto con el complejo de GARP-TGF- β 1 a 150 RU (Tabla 17) o recubierto con los anticuerpos a 200 RU (Tabla 18)

Tabla 17

mAb	K_D (M)	Diferencia
39B6-A	9,91E-10	1,0
39B6-AVE	8,94E-10	0,9
39B6-AYE	7,63E-10	0,8
39B6-AEE	5,79E-09	5,8
39B6-ANK	8,80E-10	0,9

39B6-ANR	8,84E-10	0,9
LHG10.6	5,17E-10	0,5

Tabla 18

mAb	K _D (M)	Diferencia
39B6-A	1,33E-09	1,0
39B6-AVE	1,29E-09	1,0
39B6-AYE	1,62E-09	1,2
39B6-AEE	1,02E-07	76,7
39B6-ANK	2,02E-09	1,5
39B6-ANR	1,94E-09	1,5

Se analizó la potencia para bloquear la liberación del TGF- β activo por las Treg humanas en todas las variantes mediante determinación del nivel de fosforilación de SMAD2 de Treg humanas estimuladas con CD3/CD28 en presencia de los mAbs. Según se muestra en la Figura 3, los anticuerpos 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR tenían una potencia similar en el ensayo de fosforilación de SMAD2 en comparación con el 39B6-A original. Las variantes 39B6-AEE y 39B6-AVE mostraron una clara pérdida de potencia.

Se obtuvieron resultados similares usando el ensayo GAGA-luc en el cual se transfectaron transitoriamente células 293T-hGARP con un plásmido informante en el cual la luciferasa de luciérnaga se encuentra bajo el control de un promotor que responde a SMAD (GAGA-luc). Los anticuerpos 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR tenían una potencia similar el ensayo con luciferasa en comparación con el 39B6-A original. Las variantes 39B6-AEE y 39B6-AVE mostraron una pérdida clara de potencia (véase la Figura 4).

2.2 Estudios de estabilidad

Con la excepción de 39B6-AEE, las variantes fueron evaluadas por su estabilidad utilizando diferentes enfoques como se describe a continuación.

En cada uno de los diferentes estudios de estabilidad, los anticuerpos se evaluaron usando una o más de las siguientes técnicas:

- Inspección visual
- HPLC de exclusión por tamaño
- SDS-PAGE (reductora y no reductora)
- Afinidad de unión al blanco sobre SPR
- Concentración de proteínas

Los protocolos para estas técnicas se describen a continuación.

Protocolo para la inspección visual

Las muestras eran ciegas y se calificaron por la presencia de partículas visibles mediante inspección visual de los viales por tres analistas. Se dejó que las muestras alcanzaran la temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la inspección. Se utilizó el siguiente sistema de calificación en la evaluación:

A: muestra transparente, sin partículas visibles

B: muy pocas partículas

C: presencia moderada de partículas

D: se observan abundantes partículas

f: fibras

Protocolo para la cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

Preparación del sistema, la columna y la muestra

La columna utilizada durante todo el estudio fue una columna Xbridge Protein BEH SEC 200A (3,5 μ m, 7,8*30 mm, Waters) que se guarda rutinariamente en 20% de EtOH. Se acopló una columna con guarda columna Xbridge Protein BEH 200A a la columna analítica (3,5 μ m, 7,8*3 mm; Waters). Antes de cada uso, la columna se equilibró con PBS de Dulbecco con por lo menos 5 CV, y antes de retirarla del sistema se limpió con 5 CV de agua de grado LC. Todos los solventes se filtraron y desgasearon antes del uso.

El sistema cromatográfico utilizado era un Agilent 1260 Infinity, equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático, desgasificador en línea y un detector DAD. La columna no se mantuvo en un compartimento con termostato y las muestras se analizaron a temperatura ambiente. El detector se ajustó a longitudes de onda de 280 y 214 nm simultáneamente (longitud de onda de referencia a 360 nm con un valor de corte de 100 nm). El monitoreo de agregación se realiza en el canal de 214 nm. La adquisición de datos se realizó con el software Chemstation (Agilent).

El análisis de las muestras se realizó transfiriendo 25 µl de todas las muestras originales directamente desde la concentración de 5 mg/ml en condiciones asépticas. Se centrifugaron a 2000 rcf durante 1 minuto y se transfirieron cuidadosamente 20 µl a viales de vidrio con tapa a rosca, de color ámbar. El volumen de inyección para cada condición era de 5 µl (25 µg), a una velocidad de flujo de 0,7 ml de PBS/min durante 25 min. Cada inyección fue acompañada por un lavado de la aguja con agua de grado LC y el lavado del sello se realizó al final de cada muestra.

Cada secuencia de puntos de tiempo se inició con inyecciones de PBS 2x (blanco; 5 µl de volumen de inyección), seguido por 2 µl de inyección de la mezcla de proteína estándar BEH 200 (Waters) y una muestra de mAb de agregación conocida. Cada doce muestras analizadas, se aplicó una inyección de blanco. Cada secuencia analítica se terminó como se inició pero en el orden inverso (mAb control de agregación conocida, mezcla de proteínas estándar BEH y blanco 2x).

Método usado para la determinación del % de agregación y el % de área de monómeros

Se usó el siguiente protocolo:

- Integrar todos los cromatogramas con el método ARGX 115 (parámetros técnicos básicos: modo de rozamiento tangencial estándar, sensibilidad de pendiente de 2,0, rechazo de altura 1,7, rechazo de área 1,0, ancho de pico: 0,02)
- Verificar si todos los picos se integraron de una manera que coincide con los análisis previos obtenidos
- Exportar los resultados de integración a un archivo PDF y Excel
- Calcular el % de agregación total como el resumen de áreas de todos los picos que eluyen antes del pico de monómeros dividido por el área total de la inyección y multiplicar por 100
- Calcular también el % de área de monómeros dividiendo el área de monómeros por el área total y multiplicar por 100. Este % de área de monómeros refleja si hay agregados insolubles presentes en la muestra
- Mantener registros detallados para monitorear el rendimiento, eficacia y resolución de la columna analítica (es decir, simetría de pico, área de monómero, área total, reproducibilidad de tiempos de retención, etc.)

Protocolo para SDS-PAGE

Preparación de las muestras

El análisis de las muestras se realizó transfiriendo 25 µl de todas las muestras originales a razón de 5 mg/ml en 100 µl de PBS/0,02% de Tween80 (abreviado como PBSTw en todo este estudio) en condiciones asépticas para generar una concentración intermedia de 1 mg/ml para SDS PAGE (reductora y no reductora), afinidad de unión en SPR y evaluación de la concentración de proteínas. Se usaron geles de 4-20% de Tris-glicina, premoldeados, sin

manchas, Mini-Protean, para el análisis por SDS-PAGE de las muestras (Biorad). Se preparó un lote de colorante de carga concentrado 4x, con o sin agente reductor DTT, y se dividió en alícuotas a -20 °C. Habitualmente, se tomaron 5 µl de la dilución intermedia a 1 mg/ml y luego, se agregaron 5 µl de colorante de carga concentrado 4x (+/- DDT) junto con 10 µl de mQ. La cantidad final para cada condición era de 5 µg. Las muestras se llevaron a ebullición durante 10 minutos a 95 ° C y luego se cargaron (20 µl) sobre los geles premoldeados. La electroforesis se realizó durante 35 minutos en un sistema amortiguador de Tris-glicina a voltaje constante de 200 V. A continuación, tinción con azul (Gentauro) durante 1 hora. Todos los geles se tiñeron con agua mQ durante por lo menos 1 h.

Determinación del % Ab de longitud completa

La intensidad de las diferentes bandas se determinó con el sistema Odyssey v3.0 Li-Cor escaneando los geles de proteínas con detección de un canal (700 nm) con los siguientes ajustes: compensación de foco de 0,5 mm y calidad "alta". El brillo y el contraste de cada análisis se definieron en el 50% con un parámetro lineal manual de 5.

El método utilizado comprendía:

- Escanear el gel y verificar si todas las bandas sobre el gel estén rodeadas por rectángulos estrechos
- Seleccionar "Exportar" en los ajustes para obtener la intensidad básica de todas las bandas en formato Excel
- Calcular el % de intensidad básica de cada banda presente en una calle como la intensidad básica de la banda dividida por la intensidad básica total de la calle y multiplicar por 100

- En el caso de condiciones no reductoras, el % Ab de longitud completa se define como el % de intensidad básica de la banda que corresponde a la banda de ~100 kD

- En el caso de condiciones reductoras, el % de Ab longitud completa se define como el resumen del % intensidad básica de las bandas que corresponden a las bandas de ~25-35 kD y ~55 kD

Protocolo para la medición de la actividad de unión al blanco con Biacore 3000

Preparación de las muestras

Se realizó una dilución adicional de 1/250 a partir de la concentración intermedia de todas las muestras de 1 mg/ml como se describió antes para el análisis con SPR para dar una concentración final de 4 µg/ml. Esta dilución de 1/250 se efectuó para todas las condiciones en dos pasos: a) 5 µl (1 mg/ml) + 120 µl de HBS-EP (solución amortiguadora de SPR) y b) una dilución adicional 10x (15 µl + 135 µl de HBS-EP). Para cada anticuerpo y cada punto de tiempo, se preparó una curva estándar separada, comenzando con una muestra congelada a -80 °C. Esto se analizó junto con las muestras de estabilidad para determinar la pendiente de cada curva después del ajuste general de los estándares. Estas pendientes se usaron para calcular el porcentaje de actividad de las muestras de estabilidad definiendo la muestra de referencia como el 100%.

Determinación del % de actividad sobre Biacore

Para determinar la actividad de unión al blanco en Biacore, se recubrió un chip CM5 con ~4000 RU del complejo de GARP-TGF-β humano. El flujo se definió en 30 µl/min con un modo de inyección “kinject” y dos inyecciones de

regeneración (NaCl 1 mM, glicina 2,5 mM, pH 1,5) con un intervalo de 5 min.

El método utilizado comprendía:

- Abrir las curvas en el programa BIAEVAL y seleccionar el valor '2-1' (1: blanco, 2: hGARP-TGF- β 1)
- Seleccionar una curva por vez para la superposición de trazados
- Eliminar la parte de regeneración de la curva
- Seleccionar el nivel basal justo antes de la inyección y transformar el eje Y por 'cero a la mediana de selección'
- Seleccionar 'Ajuste general', comenzando desde 120 seg después de la inyección y terminando a los 155 seg
- Graficar los estándares en Excel y determinar la pendiente de la curva para cada anticuerpo
- Estos valores se convierten en el porcentaje de actividad ajustando la referencia (muestra guardada a -20 °C) como el 100%

Protocolo para la concentración de proteínas

Para la determinación del contenido de proteínas de cada condición, se usó el sistema NanoDrop midiendo la absorbancia a 280 nm de cada muestra (2 μ l). En el sistema se empleó el blanco de PBS y la determinación de las proteínas se realizó midiendo por triplicado la absorbancia de cada muestra a 280 nm (dilución intermedia de 1 mg/ml). Todos los valores obtenidos a 280 nm se dividieron por el factor 1,51. Se realizó una medición con el blanco de PBS después de cada condición diferente. Todos los datos se informaron como el valor promedio de tres mediciones para cada condición.

2.2.1 Estudio de estabilidad a la temperatura

Se utilizó la siguiente configuración para monitorear la estabilidad de los

anticuerpos en condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas:

- Preparación de muestras de mAb: Se introdujo 1 ml de los mAbs (39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR), solución madre recién preparada (5 mg/ml), en viales de vidrio con tapa a rosca de vidrio de 2 ml y se guardaron a 5 °C y 37 °C. Se verificó inmediatamente la ausencia de partículas en los viales.
- Control negativo de PBSTw: Se prepararon alícuotas de 1 ml de PBS de Dulbecco filtrado que contiene 0,02% de Tween80 (Sigma) en viales de vidrio de 2 ml como control negativo de PBSTw. Se verificó inmediatamente la ausencia de partículas en los viales.
- Control de gran agregación: Se prepararon alícuotas de 1 ml de un anticuerpo de los inventores con una agregación visible abundante en viales de vidrio de 2 ml.
- Muestra de referencia: Para cada anticuerpo, se prepararon alícuotas de 60 µl de mAb en tubos para PCR estériles, de 500 µl, se marcaron y se guardaron a -20 °C.

Se tomaron muestras de los mAbs en diferentes puntos de tiempo según las condiciones de almacenamiento y se evaluaron mediante:

- Inspección visual
- SE-HPLC
- SDS-PAGE (reductora y no reductora)
- Afinidad de unión al blanco sobre SPR
- Concentración de proteínas

Inspección visual

Los resultados de la inspección visual se muestran en la siguiente Tabla

19. Todos los mAbs estaban en PBSTw, lo cual debería conferir un efecto estabilizante.

Tabla 19: Resultados de la inspección visual de muestras de los mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR sobre un período de 56 d en condiciones de almacenamiento de 5 °C y 37 °C

	0d	1d	7d	14d	28d	56d
Muestra	Condiciones de almacenamiento: 5 °C					
39B6-AVE	A-B-B	A-B-B	Af-B-B	Af-B-B	Af-B-A	B-Bf-Af
39B6-AYE	A-A-A	A-A-A	A-A-B	Af-A-B	Af-Af-B	Af-Bf-A
39B6-ANK	A-A-A	A-A-B	Af-B-B	Af-A-B	B-A-C	B-A-B
39B6-ANR	B-A-A	B-B-B	B-Bf-Bf	C-Bf-Bf	C-Bf-Cf	C-Bf-C
Control de gran agregación	C-C-C	C-C-C	C-D-D	D-D-D	D-D-D	D-D-D
PBSTw	Af-A-A	Af-A-A	A-B-B	Af-A-B	Af-A-A	Af-A-A
	Condiciones de almacenamiento: 37 °C					
39B6-AVE	A-A-A	A-B-B	Af-Bf-B	Af-Bf-B	Af-Bf-B	Af-Bf-Af
39B6-AYE	A-A-A	A-B-B	Af-A-B	Af-B-B	B-B-B	B-Af-Bf
39B6-ANK	A-A-A	A-A-B	A-B-B	B-A-B	C-B-B	D-Bf-Bf
39B6-ANR	B-A-A	B-A-B	Af-Af-Bf	Af-Af-Bf	B-Af-Bf	C-Af-Bf
Control de gran agregación	C-C-C	C-C-C	C-D-C	D-D-C	D-D-D	D-D-D
PBSTw	Af-B-B	Af-Bf-B	Af-Af-Bf	Af-Bf-B	Af-Bf-Bf	Af-A-Af

Para la condición de 5 °C, se obtuvieron los siguientes puntajes promedio para los mAbs después de 56 días:

39B6-AYE: 'muestra transparente, sin partículas visibles'

39B6-AVE y 39B6-ANK: 'muy pocas partículas'

39B6-ANR: 'presencia moderada de partículas'

La calificación para la solución amortiguadora PBSTw era 'muestra transparente, sin partículas visibles' a 5°C de modo que esto indica que las partículas observadas están relacionadas con proteínas.

Para la condición de almacenamiento a 37 °C, se obtuvieron los

siguientes puntajes promedio para los mAbs después de 56 días:

39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR: 'muy pocas partículas'

39B6-AVE: 'muestra transparente, sin partículas visibles'

La calificación para la solución amortiguadora PBSTw era 'muestra transparente, sin partículas visibles' a 37°C de modo que esto indica que las partículas observadas están relacionadas con proteínas.

Análisis mediante SE-HPLC

Se midieron la agregación y fragmentación de proteínas mediante SE-HPLC.

Los resultados de agregación de proteínas para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR, medida mediante SE-HPLC, se resumen en la siguiente Tabla 20 y se muestran en la Figura 5.

Tabla 20: % de formación de agregados monitoreado mediante SE-HPLC para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

39B6-AVE: Porcentaje de agregación (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,0	1,0
7	1,0	1,1	1,2
14	1,0	1,0	2,2
28	0,9	0,9	3,0
56	1,1	1,1	4,4
39B6-AYE: Porcentaje de agregación (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,2	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,0
14	1,0	1,0	1,1
28	0,9	0,9	1,4
56	1,1	1,0	0,5
39B6-ANK: Porcentaje de agregación (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C

0	1,0	1,0	1,0
28	0,9	0,9	1,1
56	0,9	0,9	0,7
	39B6-ANR: Porcentaje de agregación (%) tras el análisis por SE-HPLC		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,1	1,1
28	1,0	1,0	1,3
56	1,0	1,4	1,5

Cuando se guardaban a 5 °C, no se observaron cambios en el % de niveles de agregados para los mAbs 39B6-AYE, 39B6-AVE y 39B6-ANK sobre el período de 56 d. El % de niveles de agregados observados era bajo, entre 0,9% y 1,1%. Se observó un aumento menor de los niveles de agregados para el mAb 39B6-ANR de 1,1% a 1,4%.

A 37 °C, no se observaron cambios en el % de niveles de agregados para los mAbs 39B6-AYE y 39B6-ANK. Para 39B6-ANR se observó un aumento menor de 1,1% el día 0 a 1,5% el día 56. Para 39B6-AVE se observó un aumento del % de agregados de 1,0% el día 0 a 4,4% el día 56.

En la Tabla 21 y la Figura 6 se muestra la presencia de picos de fragmentos para los mAbs 39B6 AVE, 39B6 AYE, 39B6 ANK y 39B6 ANR, medidos por SE-HPLC. Dado que solo se observaron picos de fragmentación a 37 ° C después de 56 días, solo se muestran estos resultados.

Tabla 21: % de formación de fragmentos monitoreado mediante cromatografía de exclusión por tamaño para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR a los 56 días

	39B6-AVE: Porcentaje de fragmentación (%) tras el análisis por SE-HPLC		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	0,3
	39B6-AYE: Porcentaje de fragmentación (%) tras el análisis por SE-HPLC		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C

56	0	0	5,7
39B6-ANK: Porcentaje de fragmentación (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	0,2
39B6-ANR: Porcentaje de fragmentación (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	0,3

Para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-ANK y 39B6-ANR, el porcentaje de picos de fragmentos es de entre 0,2% y 0,3% después de 56 días, en tanto para el mAb 39B6-AYE el porcentaje de picos de fragmentos es de 5,7%.

Los resultados del % de picos de monómeros para todos los mAbs se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22: Área de monómeros (%) monitoreada mediante cromatografía de exclusión por tamaño para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

39B6-AVE: Porcentaje de área de monómeros (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	99,0	99,0	99,0
7	99,0	98,9	98,8
14	99,0	99,0	97,8
28	99,1	99,1	97,0
56	98,9	98,9	95,3
39B6-AYE: Porcentaje de área de monómeros (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	98,8	99,0	99,0
7	99,0	99,0	99,0
14	99,0	99,0	98,9
28	99,1	99,1	98,6
56	98,9	99,0	93,8
39B6-ANK: Porcentaje de área de monómeros (%) tras el análisis por SE-HPLC			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	99,0	99,0	99,0

28	99,1	99,0	98,9
56	99,1	99,1	99,1
	39B6-ANR: Porcentaje de área de monómeros (%) tras el análisis por SE-HPLC		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	99,0	98,9	98,9
28	99,0	99,0	98,7
56	99,0	98,6	98,2

SDS-PAGE

Los resultados de SDS-PAGE para el análisis de todos los anticuerpos se muestran en la Tabla 23 y la Figura 8.

Tabla 23: Porcentaje total Ab/cadena pesada de longitud completa estimado mediante análisis con SDS-PAGE y barrido con Odyssey para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

	% de 39B6-AVE de longitud completa					
	Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C
0	77,2	74,4		96,7	96,6	
7	76,0	78,0	79,8	97,9	98,0	97,8
14	80,3	81,9	79,8	98,4	97,5	97,1
28	82,8	81,9	74,5	96,2	96,1	85,6
56	79,2	80,7	70,7	95,1	94,8	78,6
	% de 39B6-AYE de longitud completa					
	Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C
0	74,2	74,6		96,4	97,2	
7	76,5	79,6	77,8	98,4	97,8	98,0
14	77,1	77,9	76,9	97,1	96,5	90,8
28	75,6	77,3	73,6	97,0	98,3	90,3
56	73,4	73,4	59,8	96,4	94,7	88,0
	% de 39B6-ANK de longitud completa					
	Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C
0	74,7	71,3		96,7	96,6	
28	70,8	70,7	74,2	97,0	96,9	89,5
56	79,3	78,5	73,6	96,8	96,7	88,1
	% de 39B6-ANR de longitud completa					
	Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras		
t (días)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C

0	76,2	76,5		97,1	96,9	
28	78,1	78,7	73,5	96,9	96,1	84,9
56	74,1	75,7	70,6	95,5	95,6	79,0

No se observó ninguna tendencia hacia la degradación para ninguno de los mAbs en la condición de temperatura de 5 °C, tanto para las condiciones reductoras como no reductoras.

A 37 °C, todos los mAbs mostraron una velocidad de degradación similar en la condición no reductora excepto por el mAb 39B6-AYE. Este mAb muestra una velocidad de degradación similar hasta los 28 días pero luego presenta una velocidad de degradación mayor entre el día 28 y el día 56 en comparación con los otros mAbs. En la condición reductora, todos los mAbs muestran una velocidad de degradación similar.

Afinidad de unión al blanco sobre Biacore

Las muestras fueron evaluadas por su actividad de unión al blanco sobre Biacore mediante medición de la pendiente en cada punto de tiempo. La muestra de referencia se definió como el 100% de actividad. Los resultados para todos los mAbs se resumen en la Tabla 24 y la Figura 9.

Tabla 24: Porcentaje de actividad sobre Biacore de los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

39B6-AVE: Actividad sobre Biacore (%)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	99,5%	99,5%
7	100,0%	111,7%	113,9%
14	100,0%	93,8%	90,2%
28	100,0%	99,0%	68,0%
56	100,0%	96,9%	31,3%
39B6-AYE: Actividad sobre Biacore (%)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	93,5%	93,5%
7	100,0%	103,1%	101,5%
14	100,0%	97,5%	97,5%
28	100,0%	96,7%	96,1%

56	100,0%	103,5%	104,2%
39B6-ANK: Actividad sobre Biacore (%)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	130,1%	130,1%
28	100,0%	101,1%	77,8%
56	100,0%	100,6%	62,4%
39B6-ANR: Actividad sobre Biacore (%)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	100,9%	100,9%
28	100,0%	129,1%	85,4%
56	100,0%	85,4%	46,3%

En el caso de las muestras de mAb almacenadas a 37 °C, solo el anticuerpo 39B6-AYE retuvo la actividad de unión al blanco durante el período completo de 56 días. Todos los demás anticuerpos mostraron una disminución significativa de la actividad de unión al blanco durante el período de 56 días cuando se guardaban a 37 °C.

Concentración de proteínas

Se midió la concentración de proteínas de todas las muestras para cada condición con NanoDrop.

En la Tabla 25 y la Figura 10 se muestra la concentración de proteínas medida para todos los mAbs.

Tabla 25: Concentración de proteínas (mg/ml) de los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

39B6-AVE: Concentración de proteínas (mg/ml)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,1	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,1
14	1,0	1,0	1,1
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,1
39B6-AYE: Concentración de proteínas (mg/ml)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,0
14	1,0	1,0	1,0

28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,0
39B6-ANK: Concentración de proteínas (mg/ml)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,1	1,1	1,1
28	1,0	1,0	1,1
56	1,1	1,1	1,1
39B6-ANR: Concentración de proteínas (mg/ml)			
t (días)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,0	1,0
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,0

Resumen y conclusión del estudio de estabilidad a la temperatura

El estudio de estabilidad a la temperatura reveló algunas diferencias significativas entre los cuatro mAbs evaluados: se observó una agregación del 4,4% por HPLC SE para el mAb 39B6 AVE después de 56 días a 37 ° C y una fragmentación del 5,7% para el mAb 39B6 AYE. Sin embargo, esta fragmentación para el mAb 39B6 AYE no afectó la actividad de unión al blanco a 37 °C con Biacore; después de 56 días, todavía era tan bueno como la muestra de referencia. Por otro lado, se observó claramente una menor actividad de unión al blanco para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-ANK y 39B6-ANR a 37 °C después de 56 días.

2.2.2: Estudio de estabilidad al congelamiento-descongelamiento

Se utilizó la siguiente configuración para monitorear la estabilidad de los anticuerpos en condiciones de congelamiento-descongelamiento. Se congeló una alícuota de 1 ml de los mAbs (a 5 mg/ml) durante por lo menos 6 horas a -20 °C y se descongeló durante 1 hora a RT. Este ciclo se repitió 9x (10 ciclos de congelamiento-descongelamiento en total). Las muestras se analizaron mediante inspección visual, SE HPLC, SDS PAGE, actividad de unión al blanco sobre Biacore y concentración de proteínas. Se utilizaron muestras de

referencia guardadas a -20 °C para todos los análisis en paralelo. Dado que los mAbs 39B6 ANR y 39B6 ANK tienen un posible sitio de desamidación, solo fueron analizados mediante inspección visual.

Inspección visual

Los resultados de la inspección visual en el estudio de estabilidad al congelamiento-descongelamiento se muestran en la Tabla 26. Todos los mAbs estaban en PBSTw, lo cual debería conferir un efecto estabilizante.

Tabla 26: Inspección visual de la estabilidad al congelamiento-descongelamiento de los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

	10x FT
Muestra	
39B6-AVE	B-B-B
39B6-AYE	B-Af-B
39B6-ANK	A-Bf-Bf
39B6-ANR	A-A-B
Control de gran agregación	C-D-D
PBSTw	B-Af-Bf

Se obtuvieron los siguientes puntajes promedio para los mAbs:

39B6-AVE, 39B6-AYE y 39B-ANK: 'muy pocas partículas' y

39B6-ANR: 'muestra transparente, sin partículas visibles'

La solución amortiguadora PBSTw fue calificada por dos personas como de 'muy pocas partículas' y por ello es posible que las partículas observadas en las muestras de 39B6-AVE, 39B6-AYE y 39B-ANK no estén relacionadas con proteínas. Se puede concluir que todos los mAb permanecen sin cambios después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Análisis mediante SE-HPLC

Se midieron la agregación y fragmentación de proteínas mediante SE-

HPLC.

En la Tabla 27 se resumen los resultados de agregación de proteínas obtenidos en el estudio estabilidad al congelamiento-descongelamiento para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE.

Tabla 27: % de formación de agregados monitoreado mediante cromatografía de exclusión por tamaño con la estabilidad al congelamiento-descongelamiento para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE

Muestra	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	1,0	1,0	1,0	0,9

No se observó ningún cambio en el porcentaje de niveles de agregados para ninguno de los mAb después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento en comparación con las muestras de referencia.

También se examinaron las áreas de picos monoméricos para todas las diferentes inyecciones. Los resultados del % de área de monómeros para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se resumen en la Tabla 28.

Tabla 28: % de área de monómeros monitoreado mediante cromatografía de exclusión por tamaño con la estabilidad al congelamiento-descongelamiento para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE.

Muestra	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	99,0	99,0	99,0	99,1

No se observó ningún cambio en el % de área de monómeros para ambos mAbs después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento en comparación con las muestras de referencia.

Análisis mediante SDS-PAGE

Se analizaron muestras de congelamiento-descongelamiento por su integridad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. Los resultados para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se muestran en la Tabla 29 y la Figura 11.

Tabla 29: Porcentaje total de Ab/cadena pesada de longitud completa estimado mediante análisis con SDS-PAGE y barrido con Odyssey en el estudio de estabilidad al congelamiento-descongelamiento para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE

% de 39B6-AVE de longitud completa				
Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras	
Muestra	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	78,1	79,3	95,9	96,1
% de 39B6-AYE de longitud completa				
Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras	
Muestra	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	78,8	78,7	96,3	97,0

No se observaron cambios para ambos mAbs después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Análisis de unión al blanco mediante Biacore

Las muestras fueron evaluadas por su actividad de unión al blanco sobre Biacore mediante medición de la pendiente después 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento. La muestra de referencia se definió como el 100% de actividad. Los resultados de ambos mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se muestran en la Figura 12.

Los resultados demuestran que después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento no se observa ningún cambio en la actividad de unión al blanco.

Análisis de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras de congelamiento-descongelamiento se midió con NanoDrop.

En la Tabla 30, se muestra la concentración de proteínas medida para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE después de 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Estos resultados también se muestran en la Figura 13 para ambos mAbs.

Tabla 30: Concentración de proteínas (mg/ml) en el estudio de estabilidad al congelamiento-descongelamiento para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE

Muestra	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	1,0	1,1	1,0	1,0

Conclusión

El estudio de estabilidad al congelamiento-descongelamiento no reveló ninguna diferencia significativa para los mAbs evaluados, 39B6-AVE y 39B6-AYE.

2.2.3: Estudio de estabilidad térmica

Para analizar las curvas de fusión, se calentaron los mAbs de acuerdo con el siguiente esquema. Una vez completado el ciclo térmico en el dispositivo de PCR, las muestras fueron evaluadas por su afinidad con Biacore.

Se utilizó el siguiente protocolo:

- 1) Se guardaron alícuotas de 1 ml de cada mAb en viales de vidrio a -20 °C al comienzo del estudio
- 2) Después de una semana de almacenamiento, se descongelaron una vez
- 3) Los mAbs se diluyeron hasta 1 mg/ml como era habitual y luego

se diluyeron adicionalmente hasta 100 µg/ml (dilución 10x: 200 µl + 1800 µl de PBSTw)

4) Los mAbs diluidos se separaron en alícuotas en una placa de PCR (50 µl/pocillo)

5) Se conservó suficiente muestra y también una muestra a 5 °C como referencia para ser analizados en paralelo

6) Permanecieron 1 h en el dispositivo de PCR, expuestas a las temperaturas indicadas a continuación

7) 2 h en el dispositivo de PCR a 25 °C

8) A 4 °C en el dispositivo de PCR

9) Preparar las muestras y las referencias para su análisis a 4 µg/ml (dilución 25x: 168 µl de solución amortiguadora para Biacore + 7 µl de muestra)

Se aplica el siguiente programa en un dispositivo de PCR con gradiente:

Temperatura de la tapa			 (°C/s)
80 °C			
Paso 1	54,6 – 71,4 °C	60 min	4 °C
Paso 2	25 °C	120 min	0,1 °C
Paso 3	4 °C	pausa	

Protocolo para el análisis con Biacore:

- Se usó el mismo chip CM5, recubierto con ~4000 RU del complejo de GARP-TGF-β humano
- Abrir las curvas en el programa BIAEvaluation y seleccionar el valor '2-1' (1: blanco, 2: hGARP-TGF-β1)
- Seleccionar una curva por vez para la superposición de trazados
- Eliminar la parte de regeneración de la curva

- Seleccionar el nivel basal justo antes de la inyección y transformar el eje Y por 'cero a la mediana de selección'
- Seleccionar 'Ajuste general', comenzando desde 120 seg después de la inyección y terminando a los 155 seg
- Para calcular la IC50: La pendiente para las referencias de 5 °C se nivela al 100%. Se puede calcular el porcentaje (eje Y) de las otras temperaturas (eje X).

Se midió la tolerancia térmica de los cuatro mAbs y los resultados se resumen en la Figura 14. La temperatura de fusión se calculó como la temperatura a la que el 50% del anticuerpo todavía es funcional. Las muestras de referencia que se mantuvieron a 5 °C se definieron como el 100% de actividad. Las temperaturas de fusión se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31: Temperaturas de fusión en el estudio de estabilidad térmica

mAb	Temperatura de fusión
39B6-AVE	67,0 °C
39B6-AYE	66,5 °C
39B6-ANK	69,1 °C
39B6-ANR	68,6 °C

Los mAbs 39B6-ANK y 39B6-ANR mostraron las temperaturas de fusión más altas: 69,13 °C y 68,55 °C, respectivamente. Los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE también tuvieron buenas temperaturas de fusión, 66,99 °C y 66,53 °C, respectivamente. Todas las temperaturas de fusión de todos los mAbs se pueden considerar altas.

Conclusión del estudio de estabilidad térmica

Los cuatro mAbs mostraron una buena tolerancia térmica. Las temperaturas de fusión eran comparables a la del mAb original 39B6-A en el

estudio de estabilidad anterior, 66,8 °C.

2.2.4: Estudio de estabilidad a la rotación

Para el estudio de estabilidad a la rotación, se utilizó la siguiente configuración. Se guardaron alícuotas de 1 ml de cada mAb en viales de vidrio a -20 °C al comienzo del estudio. Después de una semana de almacenamiento, se descongelaron las alícuotas una vez y se rotaron a 15 rpm a temperatura ambiente.

Las muestras fueron calificadas por la presencia de partículas en los puntos de tiempo indicados:

- Horas: 0, 3, 6, 24, 30, 48, 54, 72 y 96

Las muestras también fueron analizadas después de 96 horas mediante SE-HPLC, SDS-PAGE, actividad de unión al blanco con Biacore y concentración de proteínas. Se utilizaron muestras de referencia guardadas a -20 °C para todos los análisis en paralelo. Dado que los mAbs 39B6-ANR y 39B6-ANK aún tienen un posible sitio de desamidación, solo se evaluaron mediante inspección visual.

Inspección visual

Los resultados para la inspección visual en el estudio de estabilidad a la rotación se muestran en la Tabla 32. Todos los mAbs están en PBSTw, lo cual debería conferir un efecto estabilizante.

Tabla 32: Inspección visual en el estudio de estabilidad a la rotación para los mAbs 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK y 39B6-ANR

	0 h	3 h	6 h	24 h	30 h	48 h	54 h	72 h	96 h
Muestra									
39B6-AVE	Af-B-Bf	Af-B-Bf	Af-B-Bf	Af-Cf-Cf	Af-Bf-Cf	Af-B-Bf	B-B-Bf	B-B-Bf	B-B-Bf
39B6-AYE	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	B-Bf-Bf	B-Bf-Bf

39B6-ANK	Af-Bf-C	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	B-Bf-Cf	B-Bf-Cf	B-Bf-Cf
39B6-ANR	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf
Control de gran agregación	C-B-C	C-Df-D	C-Df-D	C-Df-Df	C-Df-Df	C-Df-Df	C-Df-Df	D-Df-Df	D-Df-Df
PBSTw	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A

Se encontró que todos los mAbs tenían una calificación promedio de "muy pocas partículas", por lo que permanecen relativamente inalterados después de 96 horas de rotación. La solución amortiguadora PBSTw no contenía ninguna partícula en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas. Esto indica que la calificación observada de 'muy pocas partículas' está relacionada con proteínas en las muestras de anticuerpo.

Análisis mediante SE-HPLC

Se midieron la agregación y fragmentación de proteínas mediante SE-HPLC. Los resultados de la agregación de proteínas para el estudio de estabilidad a la rotación para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33: % de formación de agregados monitoreado mediante cromatografía de exclusión por tamaño en el estudio de estabilidad a la rotación para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE.

Muestra	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	96 h	Ref	96 h
	1,1	1,0	1,0	1,0

No se observaron cambios en el % de niveles de agregados para los mAbs después del estrés por rotación en comparación con las muestras de referencia.

También se examinaron las áreas de picos monoméricos para todas las

diferentes inyecciones. Los resultados del % de área de monómeros para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34: % de área de monómeros monitoreado mediante cromatografía de exclusión por tamaño en el estudio de estabilidad a la rotación para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE.

Muestra	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	96 h	Ref	96 h
	98,9	99,0	99,0	99,0

No se observó ningún cambio en el % de área de monómeros para ninguno de los mAb después de 96 horas de rotación en comparación con las muestras de referencia.

Para ambos anticuerpos, no se observó ningún cambio en el perfil de SE-HPLC después de 96 horas de rotación en comparación con las muestras de referencia.

Análisis mediante SDS-PAGE

Se analizaron muestras de la rotación por su integridad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. Los resultados para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se resumen en la Tabla 35.

Tabla 35: Porcentaje total de Ab/cadena pesada de longitud completa estimado mediante análisis con SDS-PAGE y barrido con Odyssey en el estudio de estabilidad a la rotación para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE

% de 39B6-AVE de longitud completa				
Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras	
	Ref	96 horas	Ref	96 horas
Muestra	81,3	76,6	91,0	90,7
% de 39B6-AYE de longitud completa				
Condiciones no reductoras			Condiciones reductoras	
	Ref	96 horas	Ref	96 horas

	76,2	79,0	91,5	92,6
--	------	------	------	------

En la Figura 15 se muestra el gel del SDS-PAGE para ambos mAbs después de 96 horas de rotación.

No se observaron cambios para ninguno de los anticuerpos después de 96 horas de rotación.

Análisis de la unión al blanco con Biacore

Las muestras fueron evaluadas por su actividad de unión al blanco sobre Biacore mediante medición de la pendiente después 96 horas de rotación. La muestra de referencia se definió como el 100% de actividad. Los resultados de ambos mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE se muestran en la Figura 16.

Análisis de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras de rotación se midió con NanoDrop.

En la Tabla 36, se muestra la concentración de proteínas medida para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE después de 96 horas de rotación. Estos resultados también se muestran en la Figura 17 para ambos mAbs.

Tabla 36: Concentración de proteínas (mg/ml) en el estudio de estabilidad a la rotación para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE

Muestra	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	96 h	Ref	96 h
	1,0	1,1	1,0	1,1

No se observó pérdida de proteínas con ambos mAbs después de 96 horas de rotación.

Conclusión del estudio de estabilidad a la rotación

El estudio de estabilidad a la rotación no reveló ninguna diferencia entre los mAbs evaluados, 39B6-AVE y 39B6-AYE.

2.2.5: Análisis de la secuencia primaria mediante mapeo de péptidos

Las muestras del estudio de temperatura, congelamiento-descongelamiento y estabilidad a la rotación se analizaron utilizando la metodología de mapeo de péptidos trípticos RP-HPLC-UV-MS para identificar modificaciones (desamidación, isomerización y oxidación) a nivel de proteína (péptido).

Se modificó por desamidación la CDR3 de la cadena pesada en las posiciones 95-96 (aminoácidos NE) en los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE mediante mutación de la posición N95. Este sitio de desamidación todavía está presente en los mAbs 39B6-ANK y 39B6-ANR y se detectó una desamidación/isomerización significativa después de 28 días a 5 °C y 37 °C en el estudio de estabilidad a la temperatura y también en el estudio de estabilidad al congelamiento-descongelamiento y a la rotación. Se concluyó que no se podía prevenir la desamidación mediante la introducción de residuos voluminosos con carga positiva corriente abajo de N95.

En la posición 100f de la CDR3 de la cadena pesada hay una metionina que es esencial para una gran afinidad de unión. Los estudios de temperatura, congelamiento-descongelamiento y estabilidad a la rotación han demostrado que no hay oxidación de M100f en los mAbs 39B6-AYE y 39B6-ANK, mientras que aún se observa oxidación para los mAbs 39B6-AVE y 39B6-ANR. Esto demuestra que los aminoácidos en las posiciones 95 y 96 afectan la sensibilidad a la oxidación de la metionina corriente abajo. En la Tabla 37 se muestra una descripción general de los niveles de oxidación y desamidación de péptidos que abarcan la CDR3 de la cadena pesada, que fueron generados mediante digestión tríptica.

Tabla 37: Extensión de la oxidación y desamidación de péptidos en la CDR3 de la cadena pesada

	Oxidación (%)				Desamidación (%)			
	5 °C día 28	37 °C día 28	Rotación (96 h)	Congelamiento- descongelamiento (10x)	5 °C día 28	37 °C día 28	Rotación (96 h)	Congelamiento- descongelamiento (10x)
39B6-AVE	1,08	10,51	1,58	3,47	0	0	0	0
39B6-AYE	Por debajo del límite de cuantificación (LOQ)				0	0	0	0
39B6-ANK	Por debajo del límite de cuantificación (LOQ)				4,72	11,15	3,5	4,75
39B6-ANR	9,20	20,98	19,37	12,47	12,85	34,38	12,79	12,77

** Por debajo del límite de cuantificación (LOQ) = la intensidad de la forma oxidada es cercana al fondo*

La cantidad relativa de desamidación e isomerización de N95 y la actividad de unión relativa de las variantes guardadas a 37 °C se muestra en la Figura 18. En la figura también se muestra el 39B6-A original (39B6-ANE marcado). Dado que N95 ha sido mutada en los mAbs 39B6-AVE y 39B6-AYE, los niveles de desamidación e isomerización son cero y por ello no se incluyeron. La correlación entre la desamidación de N95 y una menor actividad de unión al blanco observada para los mAbs 39B6-ANK y 39B6-ANR sugiere que la desamidación en N95 afecta negativamente la unión del mAb a su blanco.

Conclusión

La variante 39B6-AYE del anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 es un anticuerpo anti-GARP-TGF- β 1 particularmente bueno para llevar al desarrollo clínico por las siguientes razones:

- Retiene una unión de gran afinidad por su blanco, el complejo de GARP-TGF- β 1;
- Presenta una buena potencia en el ensayo de fosforilación de SMAD2;
- No sufre desamidación o isomerización en la CDR3
- No sufre oxidación en la CDR3
- Presenta una gran homología humana (95%)
- Presenta una estabilidad mejorada en comparación con 39B6-A, medida mediante diferentes ensayos de estabilidad.

Las secuencias de CDR y del dominio variable de 39B6-AYE se muestran en las siguientes Tablas 38 y 39. En la Tabla 40 se muestran las secuencias de la cadena pesada y la cadena liviana de longitud completa. Las secuencias de polinucleótidos que codifican los dominios VH y VL y las cadenas pesada y liviana de longitud completa se muestran en la Tabla 41.

Tabla 38: Secuencias de CDR de VH y VL para 39B6-AYE

39B6-AYE			SEQ ID N°:
VH	CDR1	SYID	4
	CDR2	RIDPEDAGTKYAQKF QG	12
	CDR3	YEWETVVGDLMYE YEY	13
VL	CDR1	QASQSISSYLA	9
	CDR2	GASRLKT	10
	CDR3	QQYASVPVT	11

Tabla 39: Secuencias de los dominios VH y VL para 39B6-AYE

39B6-AYE		SEQ ID N°:
VH	QVQLVQPGAEVRKPGASVKVSCASGYRF TSYYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGT KYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRS EDTAVYYCARYEWETVVGDLMYEYEWG QGTLTVSS	14
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISS	15

	YLAWEYQQKPGQAPKILYIGASRLKTGVPSR FSGSGSGTSFTLTSSLEPEDAATYYCQQY ASVPVTFGQGTKVEIK	
--	--	--

Tabla 40: Secuencias de la cadena pesada y la cadena liviana para

39B6-AYE

39B6-AYE		SEQ ID N°:
Cadena pesada	QVQLVQPGAIEVRKPGASVKVSCKASGYRF TSYYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGT KYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRS EDTAVYYCARYEWETVVVGDLMEYEWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLG	16
Cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISS YLAWEYQQKPGQAPKILYIGASRLKTGVPSR FSGSGSGTSFTLTSSLEPEDAATYYCQQY ASVPVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	17

Tabla 41: Secuencias de polinucleótidos que codifican 39B6-AYE

		SEQ ID N°:
VH	CAAGTCCAACCTGTCCAACCGGGGGCGGA AGTGCGGAAGCCGGGGGCGAGCGTGAAA GTCTCGTGCAAGGCATCGGGATACCGATT CACATCATATTACATCGACTGGGTCAGGCA AGCGCCGGGGCAAGGGCTGGAATGGATG GGGCGGATCGACCCGGAGGATGCCGGGA CGAAATATGCGCAAAAATTCCAAGGGCGC GTCACGATGACGGCCGACACATCGACGAG CACGGTATACGTGGAGCTGAGCTCGCTGA GGAGCGAGGACACCGCGGTATACTACTGC	18

	GCGCGATACGAATGGGAGACCGTCGTCGT CGGGGACCTGATGTACGAATACGAATACT GGGGGCAAGGGACGCTTGTCACGGTCTC GAGC	
VL	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAG CCTGAGCGCCTCTGTGGGAGATAGAGTCA CCATCACATGCCAGGCTAGTCAGTCAATTT CTAGTTACCTGGCATGGTATCAGCAGAAG CCTGGCCAGGCACCTAAAATCCTGATCTA CGGAGCCAGTAGGCTGAAGACAGGGGTG CCATCTCGTTTCTCCGGCAGCGGATCTGG GACATCCTTTACTCTGACCATCTCATCCCT GGAGCCAGAAGACGCCGCTACATACTATT GTCAGCAGTATGCTTCCGTGCCCCGTCACA TTCGGTCAGGGCACTAAGGTGAGATCAA G	19
Cadena pesada	CAAGTCCAACTTGTCCTCAACCGGGGGCGGA AGTGCGGAAGCCGGGGGCGAGCGTGAAA GTCTCGTGCAAGGCATCGGGATAACCGATT CACATCATATTACATCGACTGGGTCAGGCA AGCGCCGGGGCAAGGGCTGGAATGGATG GGGCGGATCGACCCGGAGGATGCCGGGA CGAAATATGCGCAAAAATTCCAAGGGCGC GTCACGATGACGGCCGACACATCGACGAG CACGGTATACGTGGAGCTGAGCTCGCTGA GGAGCGAGGACACCGCGGTATACTACTGC GCGCGATACGAATGGGAGACCGTCGTCGT CGGGGACCTGATGTACGAATACGAATACT GGGGGCAAGGGACGCTTGTCACGGTCTC GAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACC TCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTGA CCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACC TCCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCT GCAATCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCT CCGTGGTGACAGTGCCCTCCTCCAGCCTG GGCACCAAGACCTACACCTGTAACTGGA CCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAATCTAAATACGGCCCTCCC TGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAATTTCT GGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCC CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCC CGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGG	20

	TGGACGTGTCCCAGGAAGATCCAGAGGTG CAGTTCAACTGGTATGTTGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG AGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGC ATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGG CCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA AAGGCTTCTACCCCTCCGACATTGCCGTG GAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGA ACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCT CGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCA GGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATAACC CAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC	
Cadena liviana	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAG CCTGAGCGCCTCTGTGGGAGATAGAGTCA CCATCACATGCCAGGCTAGTCAGTCAATTT CTAGTTACCTGGCATGGTATCAGCAGAAG CCTGGCCAGGCACCTAAAATCCTGATCTA CGGAGCCAGTAGGCTGAAGACAGGGGTG CCATCTCGGTTCTCCGGCAGCGGATCTGG GACATCCTTTACTCTGACCATCTCATCCCT GGAGCCAGAAGACGCCGCTACATACTATT GTCAGCAGTATGCTTCCGTGCCCCGTCACA TTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATCAA GCGTACGGTCGCGGCGCCTTCTGTGTTCA TTTTCCCCCATCTGATGAACAGCTGAAAT CTGGCACTGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTG AACAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGT CCAGTGGAAAGTGGACAATGCTCTGCAGA GTGGGAATTCCCAGGAATCTGTCACTGAG CAGGACTCTAAGGATAGCACATACTCCCT GTCCTCTACTCTGACACTGAGCAAGGCTG ATTACGAGAAACACAAAGTGTACGCCTGT GAAGTCACACATCAGGGGCTGTCTAGTCC TGTGACCAAATCCTTCAATAGGGGAGAGT GC	21

Ejemplo 3: Prueba por lotes de 39B6-AYE (ARGX-115)

Se evaluó la estabilidad del lote piloto de la sustancia farmacológica de ARGX-115 sobre un período de tres meses. Las muestras de prueba del lote piloto de la sustancia farmacológica se guardaron a una condición de almacenamiento de -70 °C, a una condición de almacenamiento acelerado de +5 °C y a una condición almacenamiento con estrés de +25 °C. La sustancia farmacológica piloto se presentó en la siguiente formulación: histidina/clorhidrato de histidina 10 mM, sacarosa 200 mM, arginina 40 mM, 0,03% de polisorbato 80 (p/v) a pH 6,0 y a una concentración de proteína de $20,0 \pm 2,0$ mg/ml.

Se confirmó que el lote piloto de la sustancia farmacológica ARGX-115 era estable durante tres meses cuando se guardaba a la condición de almacenamiento pretendida de -70 °C. También se determinó la actividad de unión por SPR como una medida de la estabilidad. La actividad de unión se expresó como un porcentaje de la actividad de unión de la muestra de referencia que se mantuvo a -70 °C

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 42.

Método	Muestra	Resultados
ARGX115 Biacore	T3M +5 °C	101%
	T3M -70 °C	106%
	T3M +25 °C	107%

Estos resultados confirman que ARGX-115 es estable sobre un período de almacenamiento prolongado.

Ejemplo 4: Caracterización de la unión de ARGX-115 al complejo de GARP-TGF- β

4.1: El TGF- β maduro es esencial para la unión de ARGX-115

En la naturaleza, el complejo de GARP-TGF- β (GARP formando un complejo con el TGF- β latente) se forma en el retículo endoplasmático con

interacciones covalentes de cisteína (puentes disulfuro) entre la proteína GARP y el TGF β latente. Luego, este complejo se expresa sobre la superficie celular. El complejo de GARP-TGF- β se puede formar, *in vitro*, entre la proteína GARP humana recombinante y el TGF- β latente humano recombinante (C33S)-marca 3xstrep. La forma mutante C33S del TGF- β latente no forma las interacciones covalentes con GARP (o cualquiera de las proteínas de unión al TGF- β latente (LTBP)) presente en el complejo nativo.

Para demostrar la unión de ARGX-115 al complejo formado *in vitro* de la proteína GARP recombinante y el TGF β latente recombinante (C33S), se recubrió una placa de ELISA con la proteína GARP recombinante (GARP humana 1 μ g/ml O/N a 4 °C), se bloqueó con el agente de bloqueo (caseína-PBS) y luego el TGF- β latente (5 μ g/ml 1 h RT) fue capturado por el GARP del recubrimiento. Se permitió que ARGX-115 y un anticuerpo de control de isotipo (1 μ g/ml, 1 h a temperatura ambiente) se unieran al complejo y se detectaron con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP. Según se muestra en la Figura 19, el ARGX-115 se unió al complejo GARP-TGF- β latente (C33S), en tanto el control de isotipo no se unió.

Se encontró que el ensayo también funcionaba al revés. La placa de ELISA se recubrió con ARGX-115 o con un anticuerpo de control de isotipo (1 μ g/ml ON a 4 °C) y se bloqueó con agente de bloqueo (caseína-PBS). La proteína GARP recombinante (5 μ g/ml) fue capturada por el anticuerpo ARGX-115 del recubrimiento, la placa se lavó y el TGF- β latente recombinante (C33S)-marca 3xstrep (5 μ g/ml) se capturó y detectó con estreptavidina-HRP. La actividad de HRP solo se detectó en presencia de ARGX-115 y no en los pocillos de la placa recubierta con el control de isotipo.

Para evaluar la unión de ARGX-115 a un complejo de GARP y el péptido asociado a latencia (LAP) del TGF- β , se formó un complejo entre la proteína GARP recombinante y el LAP recombinante. Se recubrió una placa de ELISA con la proteína GARP recombinante (1 μ g/ml O/N 4 °C), se bloqueó con agente de bloqueo (caseína-PBS) y el LAP fue capturado (5 μ g/ml) sobre la proteína GARP recombinante que recubre a la placa. La unión del se detectó con un anticuerpo anti-LAP-HRP. La unión del anticuerpo anti-LAP-HRP demuestra que el complejo GARP-LAP efectivamente se forma *in vitro*. Sin embargo, ARGX-115 no presentó ninguna unión al complejo de GARP-LAP. Además, cuando la placa ELISA se recubría con ARGX-115 (1 μ g/ml ON a 4 °C), se agregaba la proteína GARP recombinante (5 μ g/ml) seguido por el LAP (5 μ g/ml), no se midió la unión del anticuerpo anti-LAP-HRP. Estos resultados confirman el TGF- β maduro es necesario para la unión de ARGX-115 al complejo GARP-TGF- β .

4.2: Impacto de las mutaciones en el hTGF- β presente en el complejo con GARP sobre la actividad neutralizante de ARGX-115

Se transfectaron transitoriamente células 293T que expresan de manera estable la integrina α v β 6 (293Tcl.ITGB6) con una mezcla de 3 plásmidos (mezcla de plásmidos): (i) plásmido informante CAGA-luc; (ii) GARP humana (pEF-BOS-puro-hGARP); y (iii) el TGF- β WT humano o TGF- β mutante (pDisplay). La integrina α v β 6 es una de las dos integrinas de activación del TGF- β . Las células 293Tcl.ITGB6 se desprendieron y se cosecharon de los frascos de 75 cm² a semiconfluencia, se contaron y se diluyeron a 1E+06 células/ml, y se distribuyeron a razón de 1 ml por tubo Eppendorf. Se agregaron 250 μ l de mezcla de plásmidos a cada tubo para la transfección.

Directamente después de la transfección, las células transfectadas se distribuyeron en una placa óptica de 96 pocillos, a razón de 50 μ l ($4E+04$ células) por pocillo, que contenía diferentes mAbs de prueba (ARGX-115, LHG10.6, 1D11 y MHG-8 a razón de 100 μ l/ml). El anticuerpo 1D11 es un mAb contra la forma activo de las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- β . Los anticuerpos MHG-8 y LHG10.6 se describen en WO2015/015003 y WO2016/125017. La actividad luciferasa se midió después de la incubación durante 24 h a 37 °C. El valor obtenido con la transfección del TGF- β mutante se expresó como un porcentaje del valor obtenido para WT-TGF- β . Los resultados se muestran en la Figura 20. Tal como se puede observar en la figura, se redujo significativamente la actividad neutralizante de ARGX-115 medida contra el TGF- β mutante que incluye la sustitución R58A y el TGF- β mutante que incluye la sustitución K338E. Esto indica que estos dos residuos en el complejo de GARP-TGF- β son particularmente importantes para la actividad neutralizante de

ARGX-11

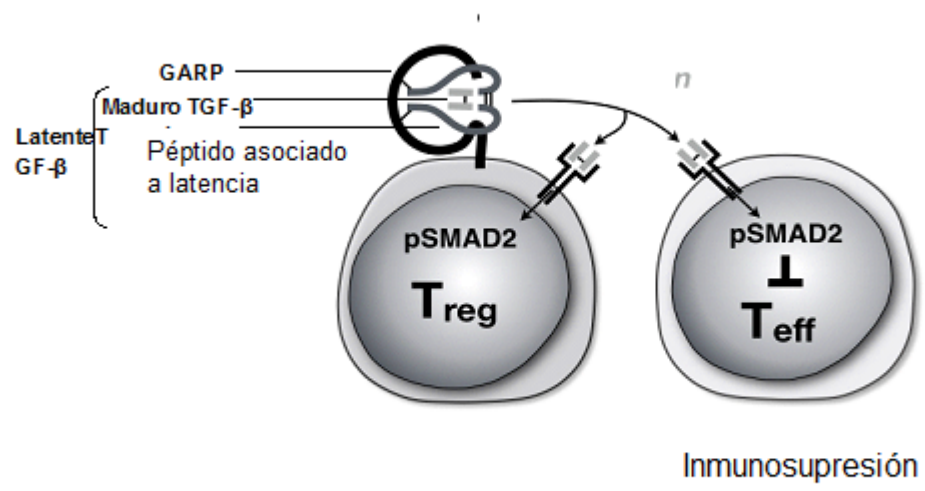


FIG 1

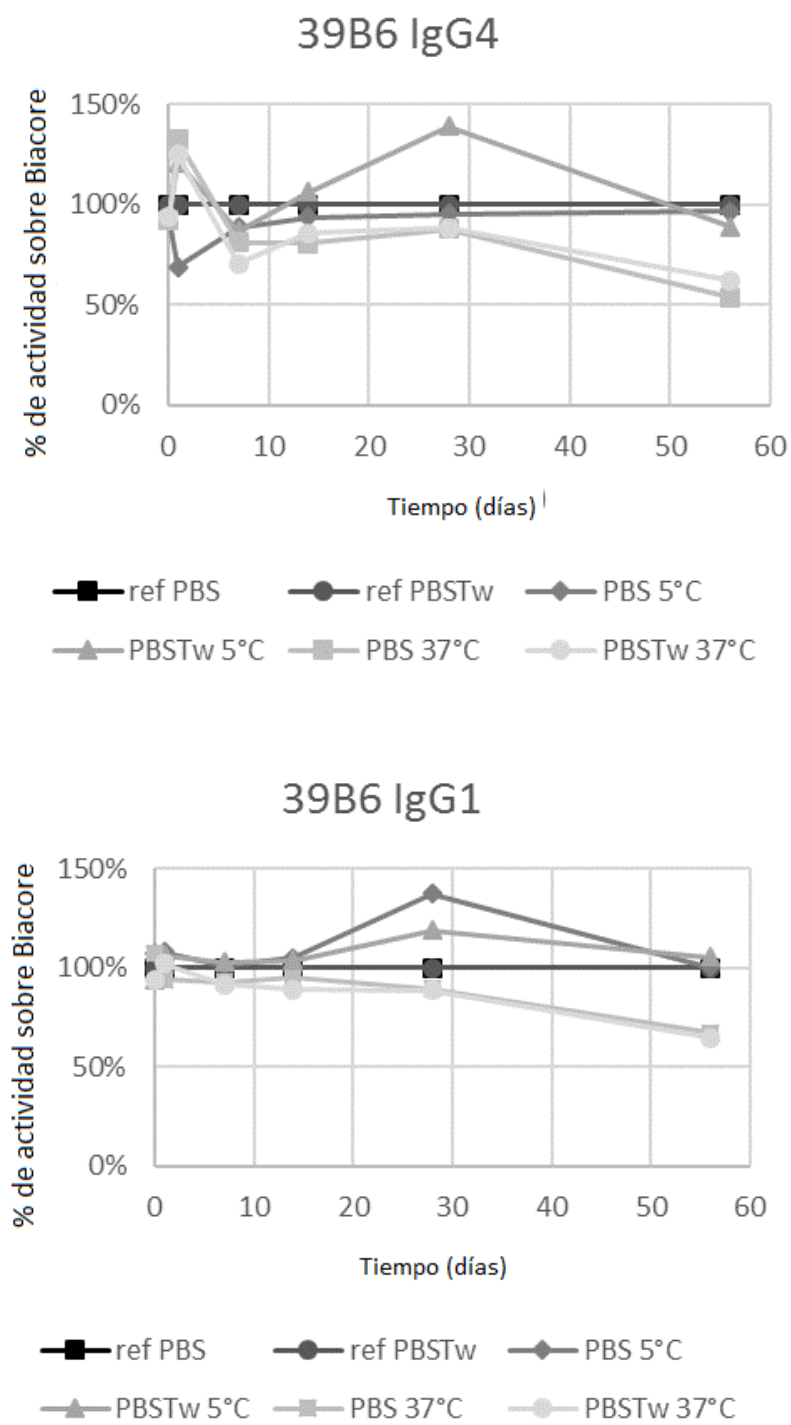


FIG 2

A

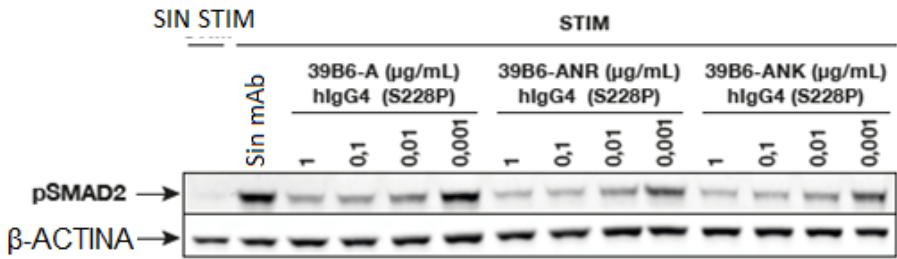
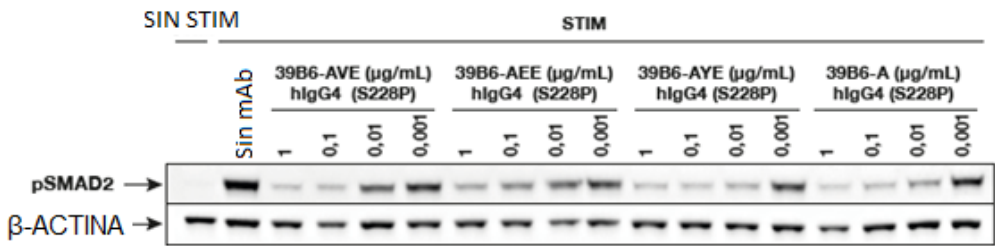


FIG 3

B

Resultados del ensayo P-SMADS

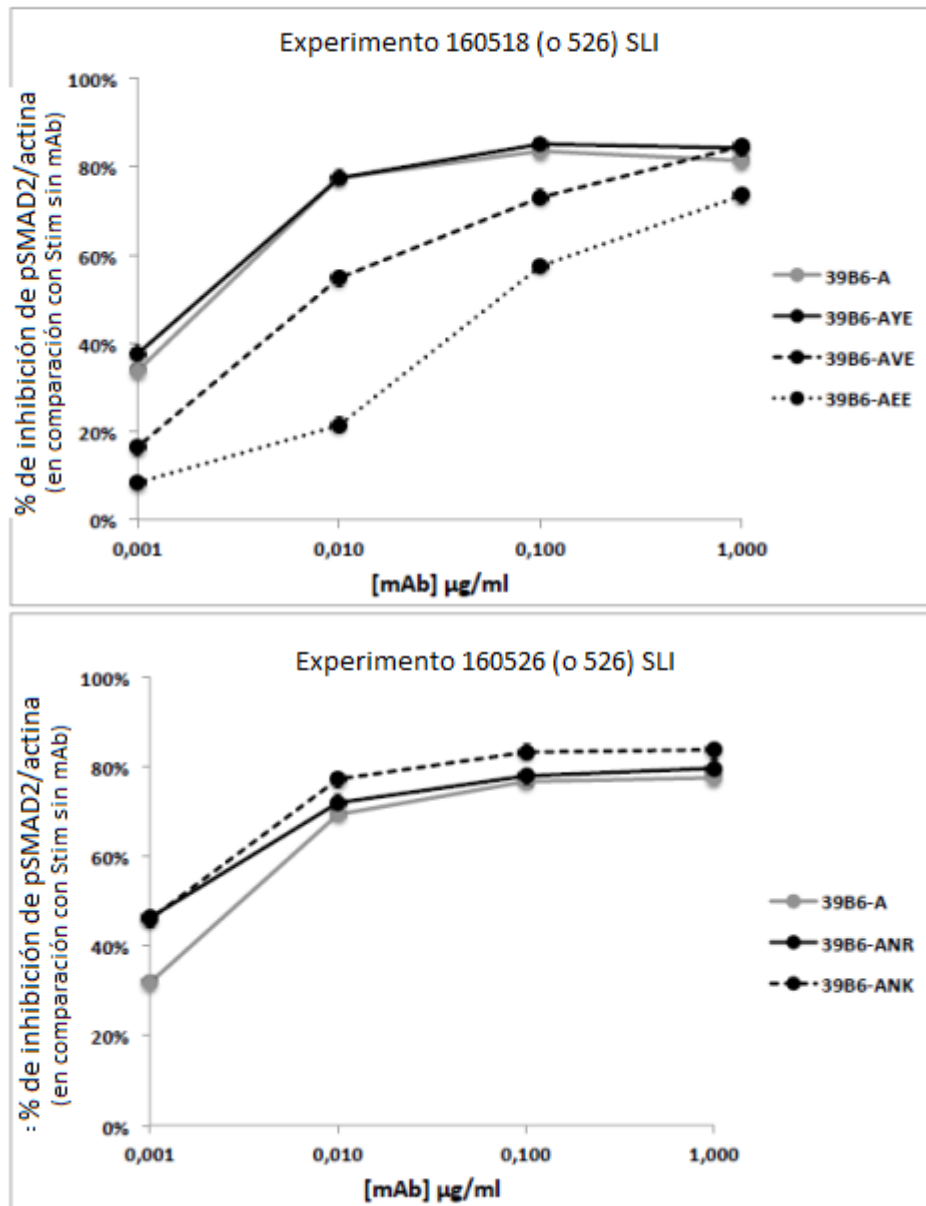


FIG 3 Continuación

= Resultados del ensayo GAGA-luc

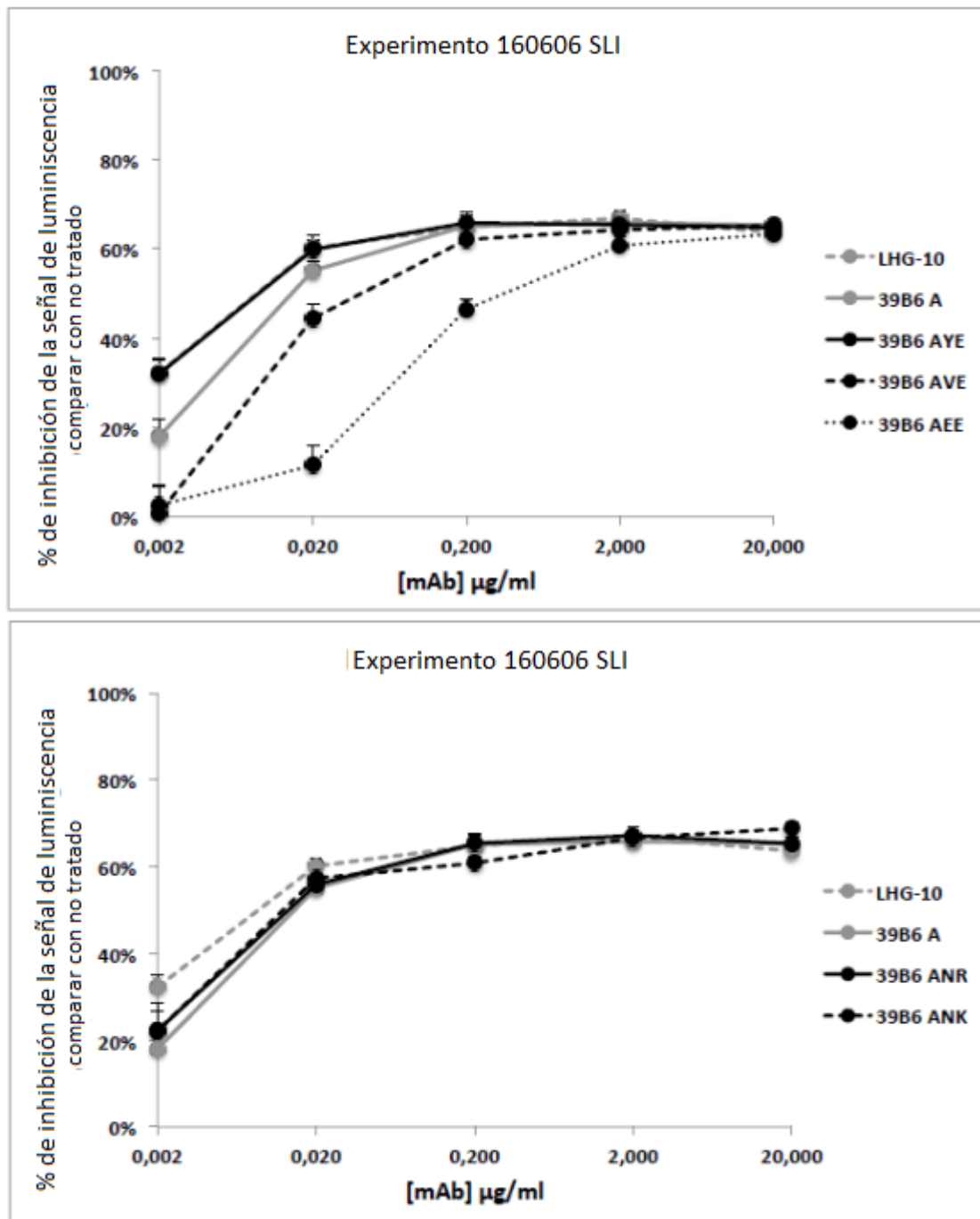


FIG4

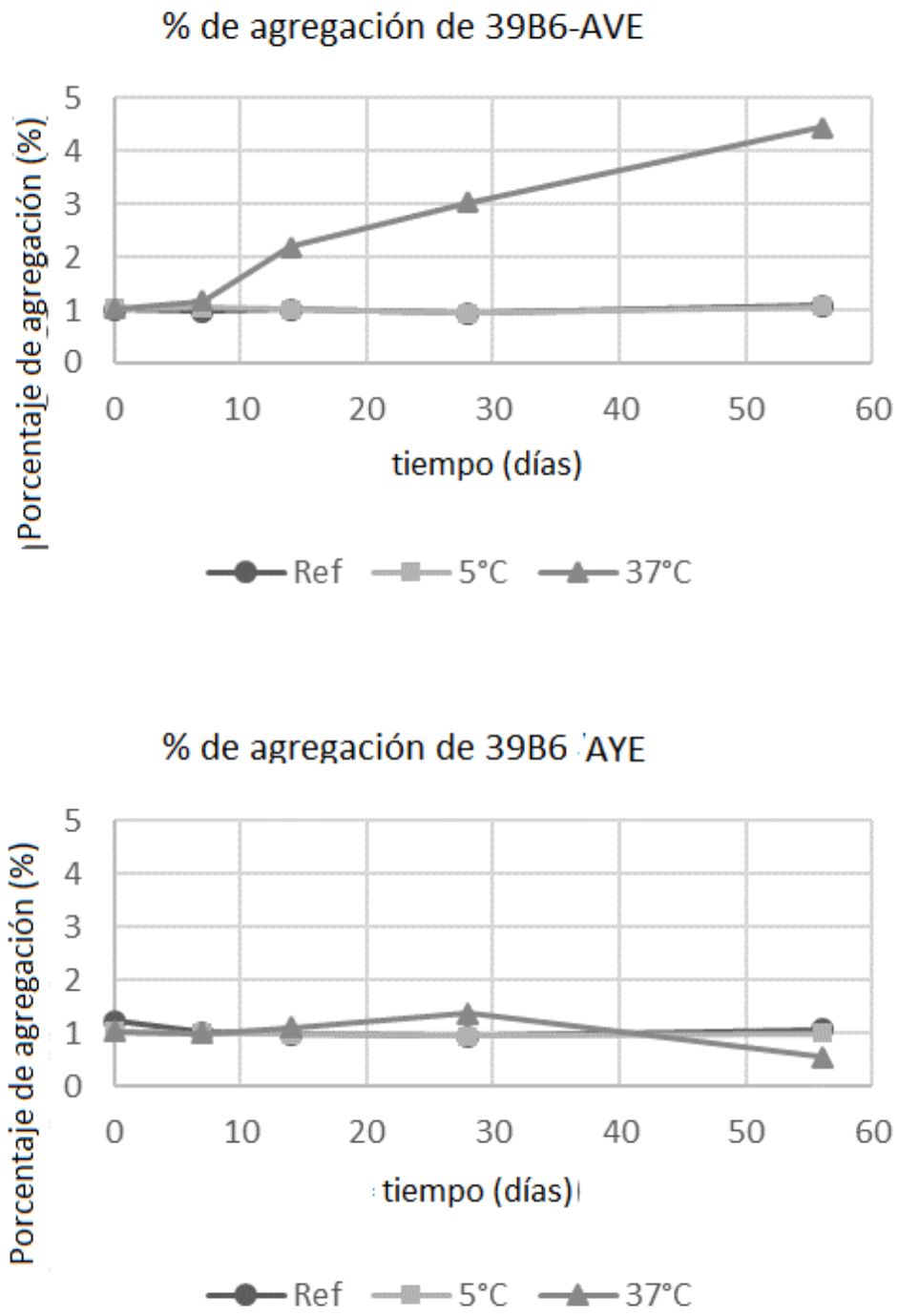


FIG 5

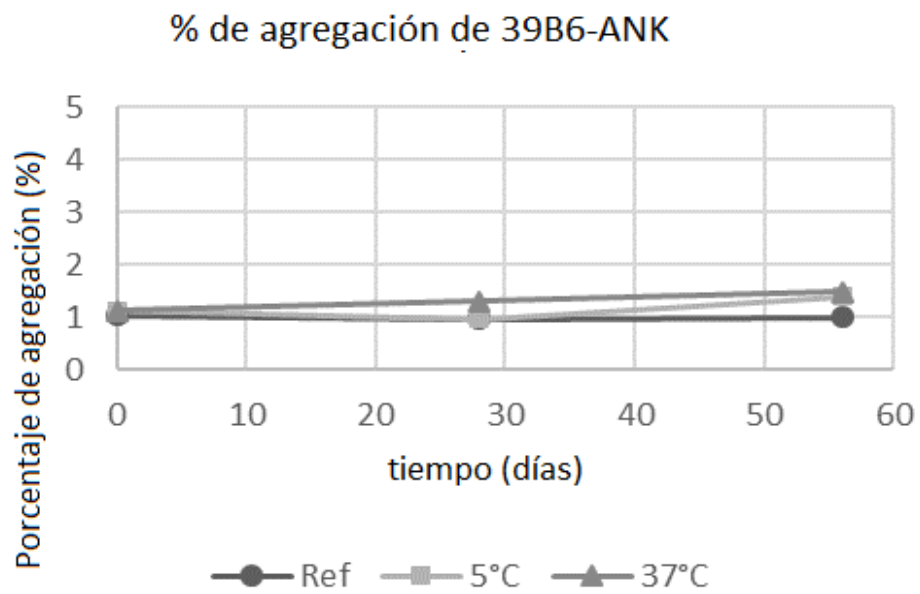
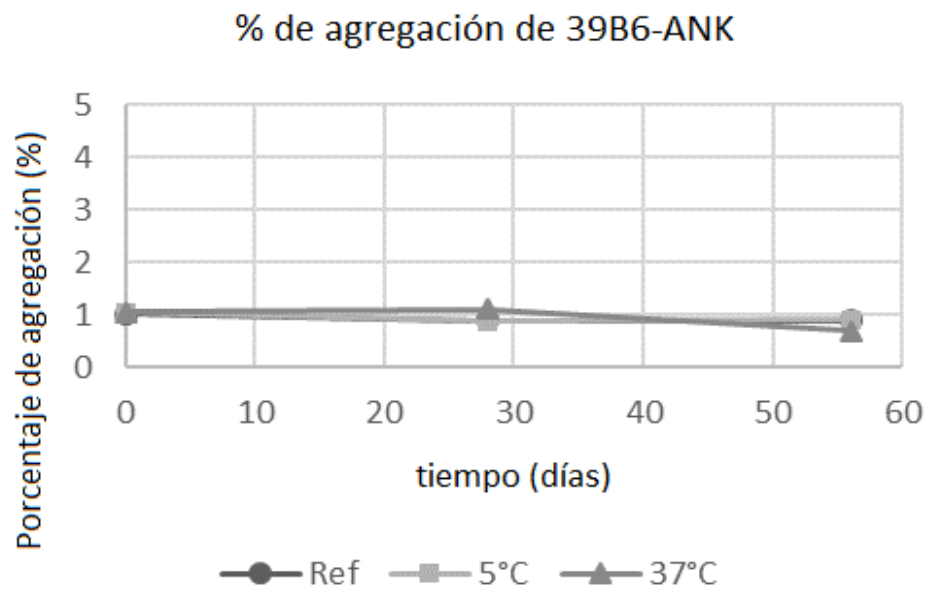


FIG 5 Continuación

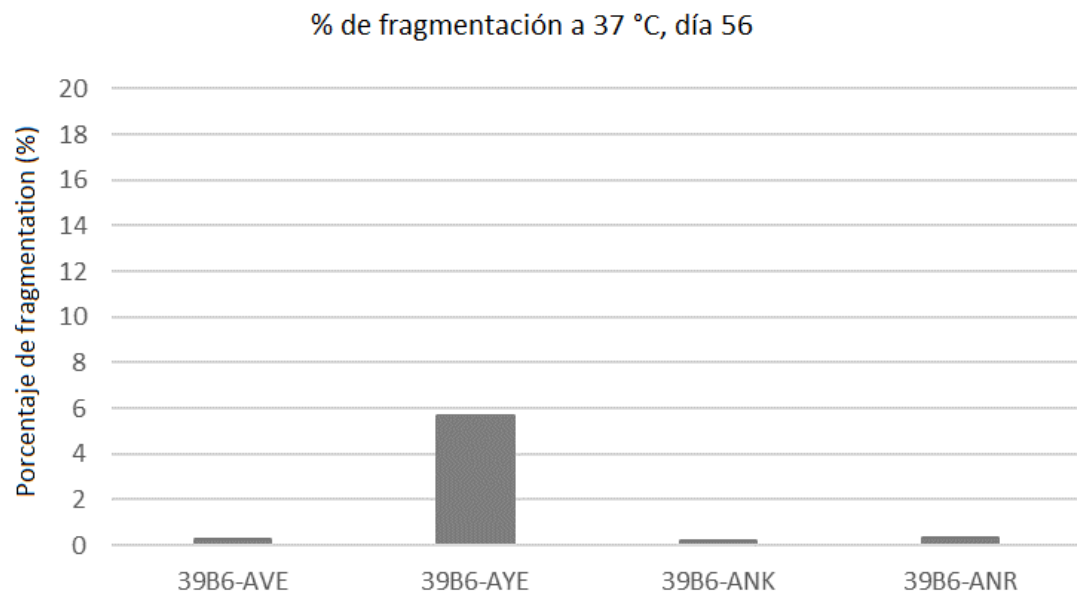


FIG 6

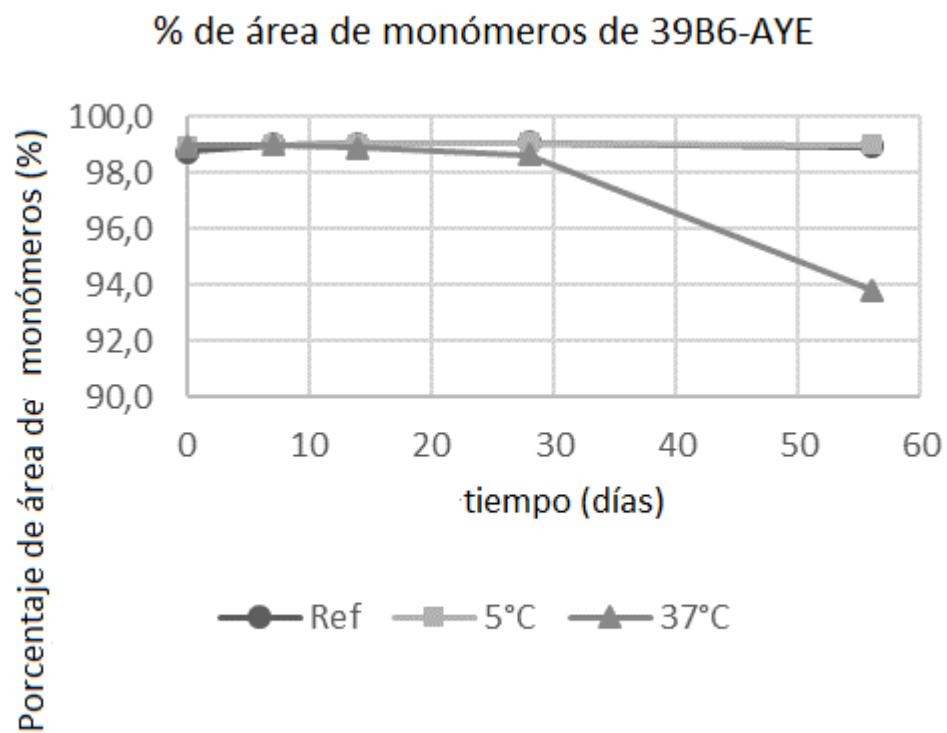
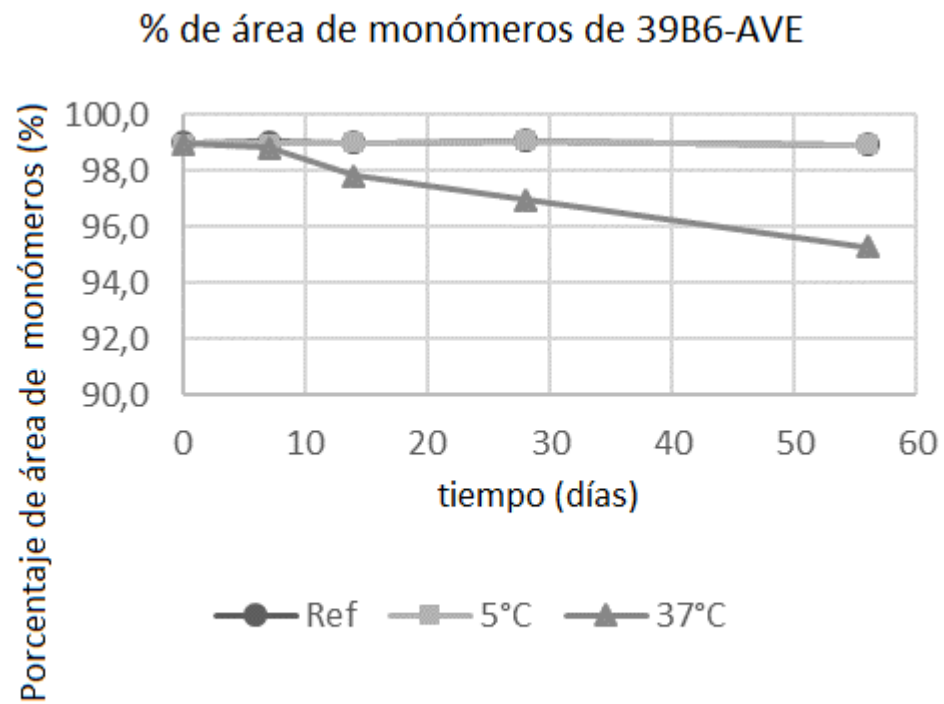


FIG 7

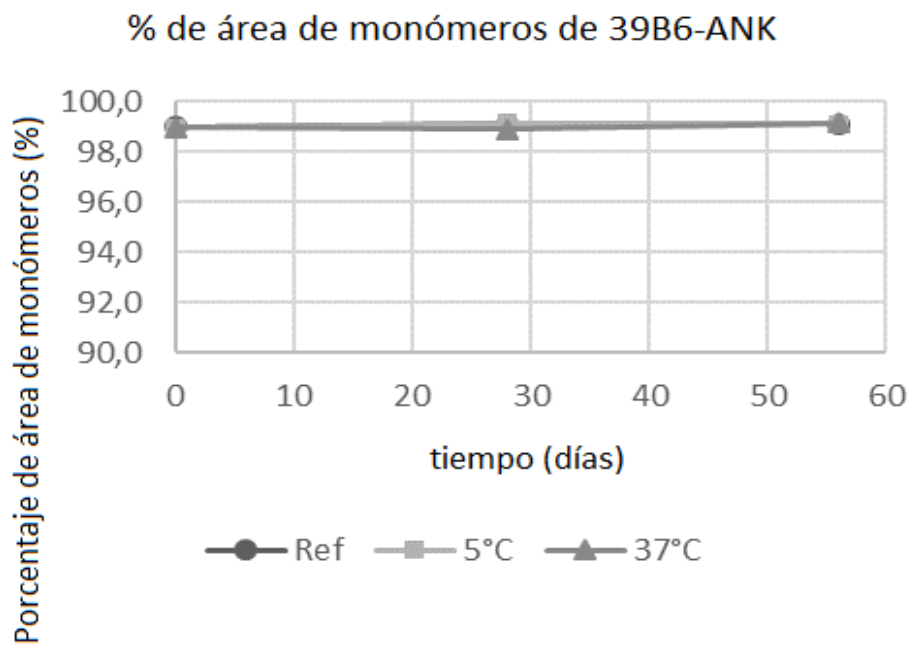
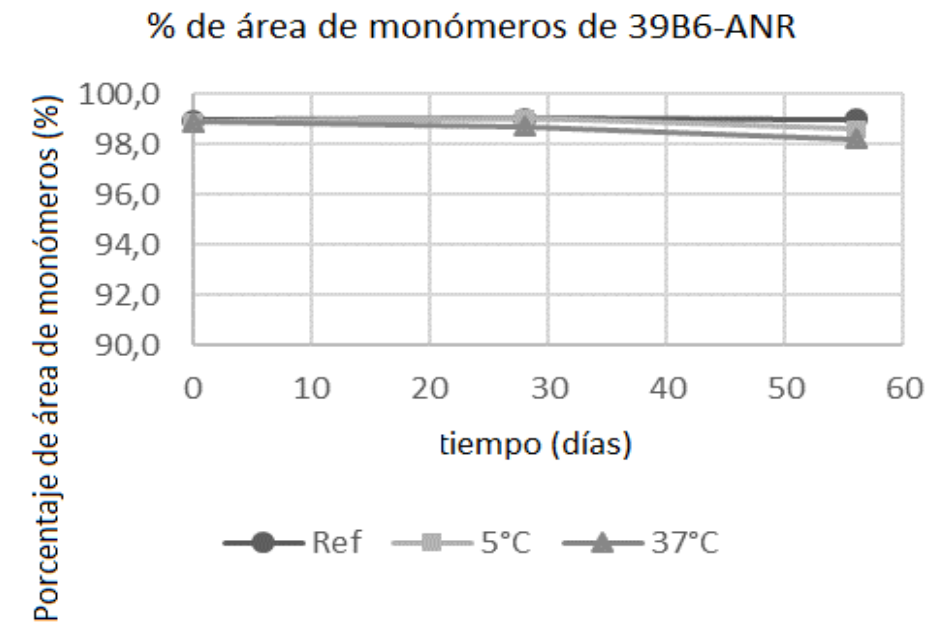
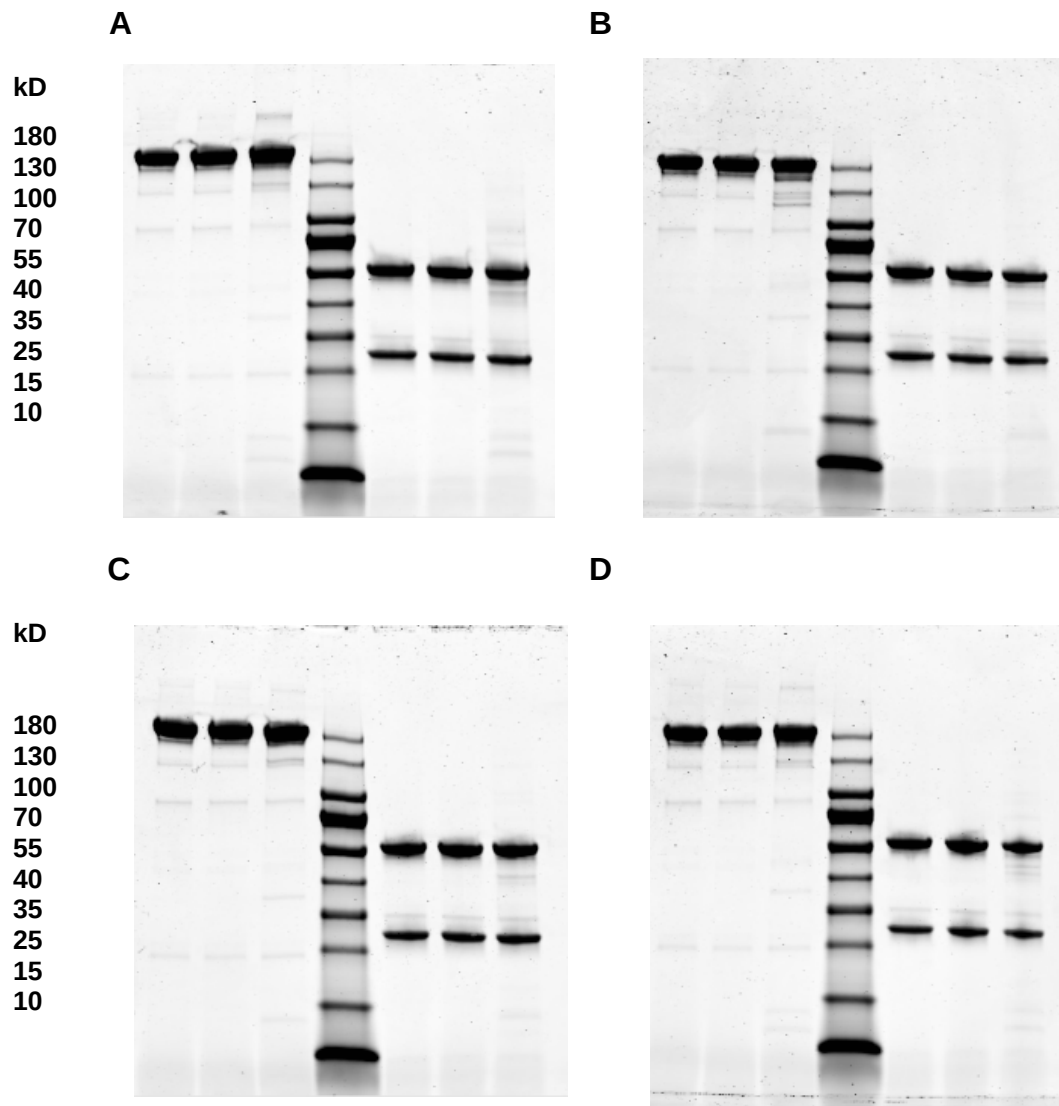


FIG 7 Continuación

Fig. 8



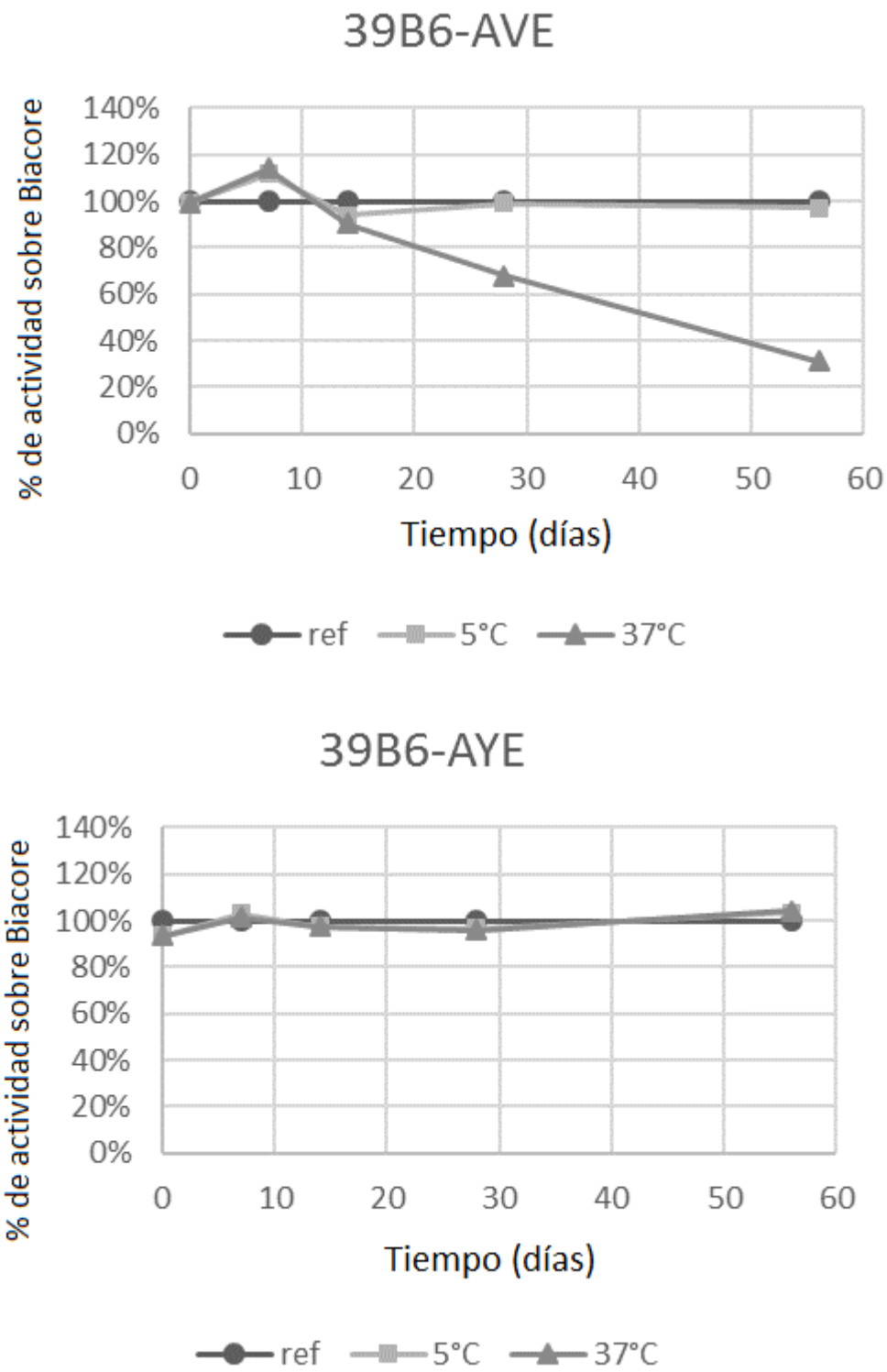
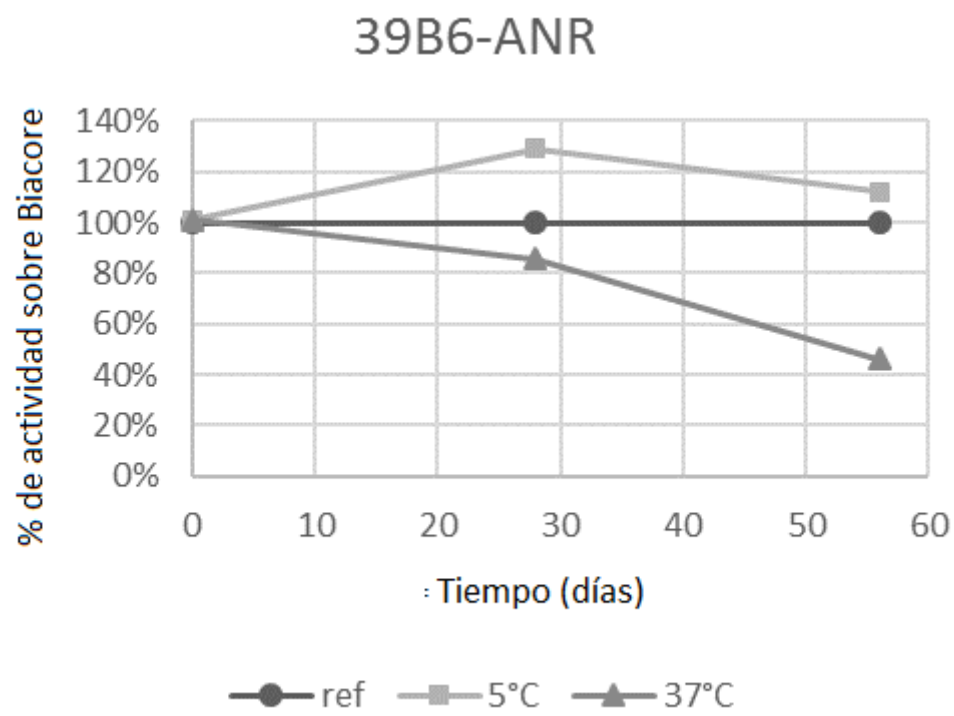
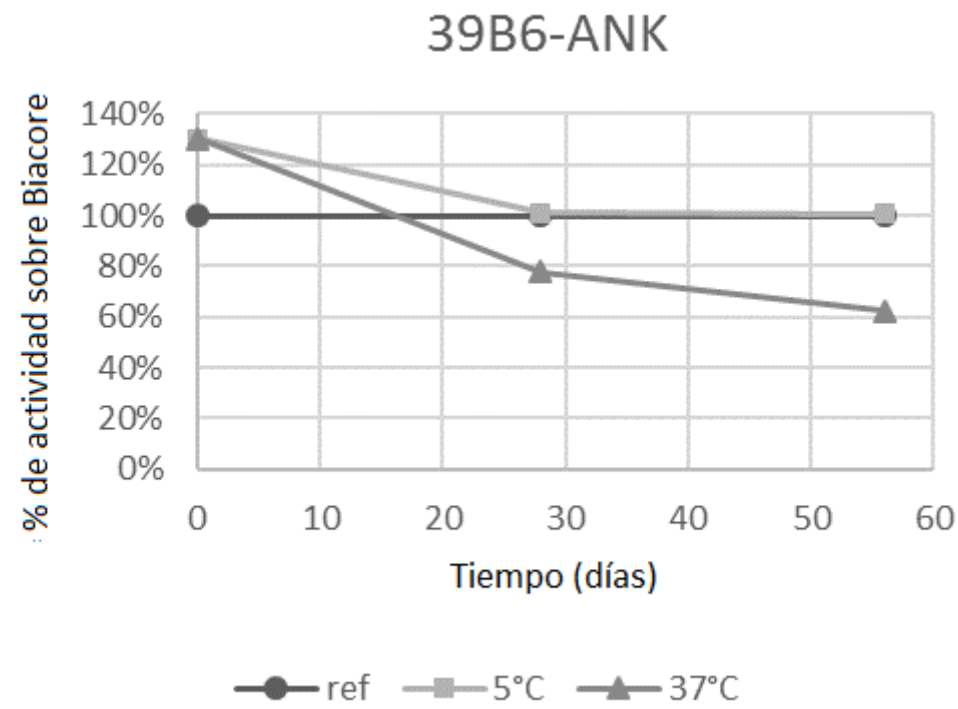


FIG. 9



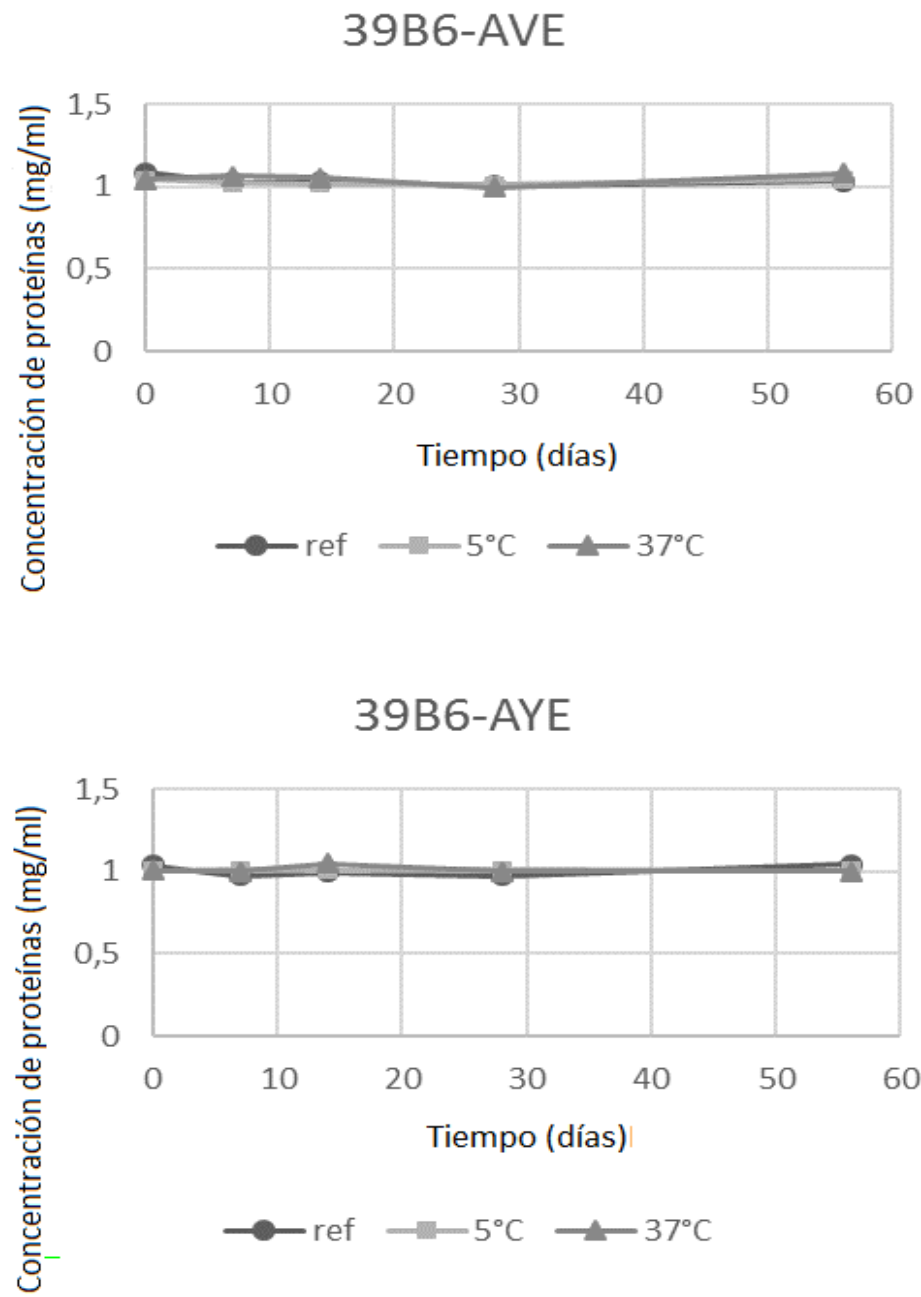
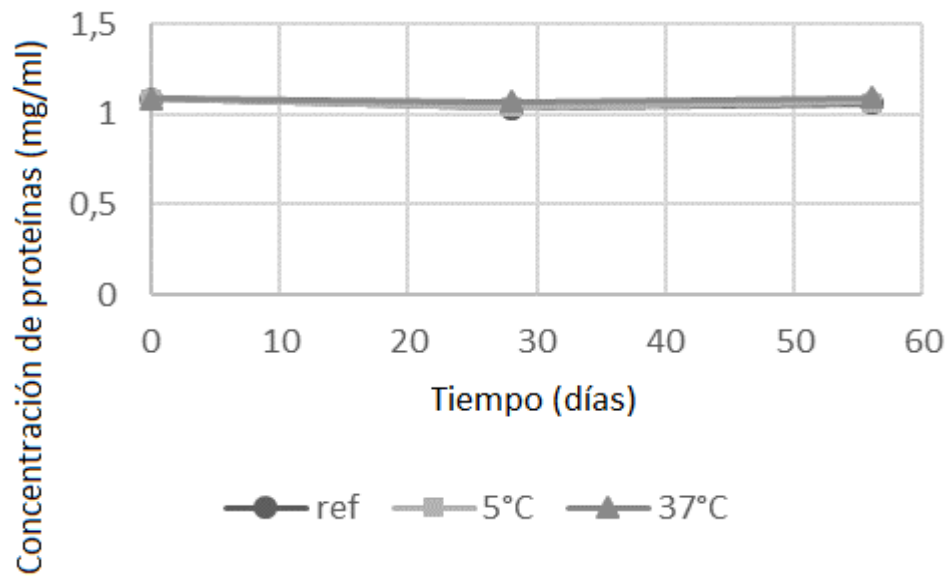


FIG 10

39B6-ANK



39B6-ANR

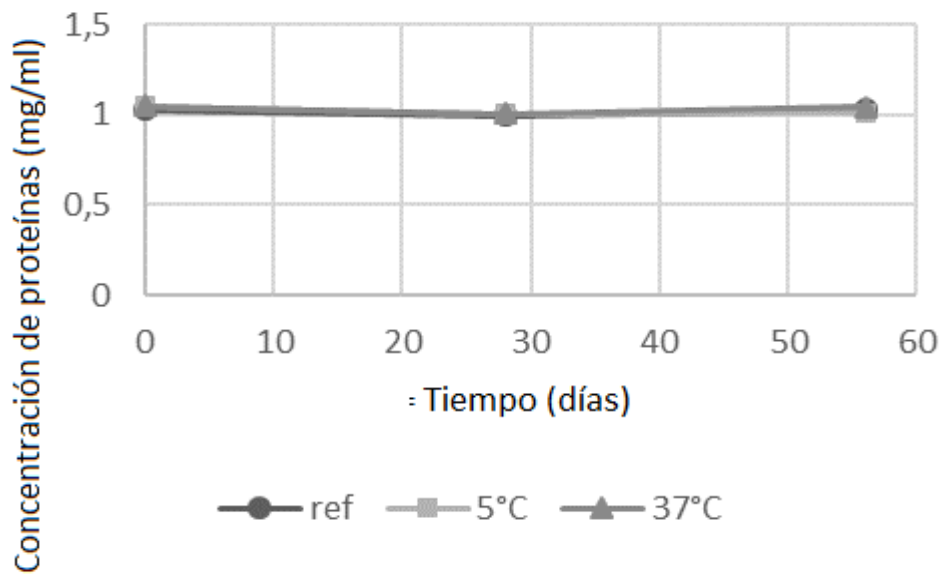
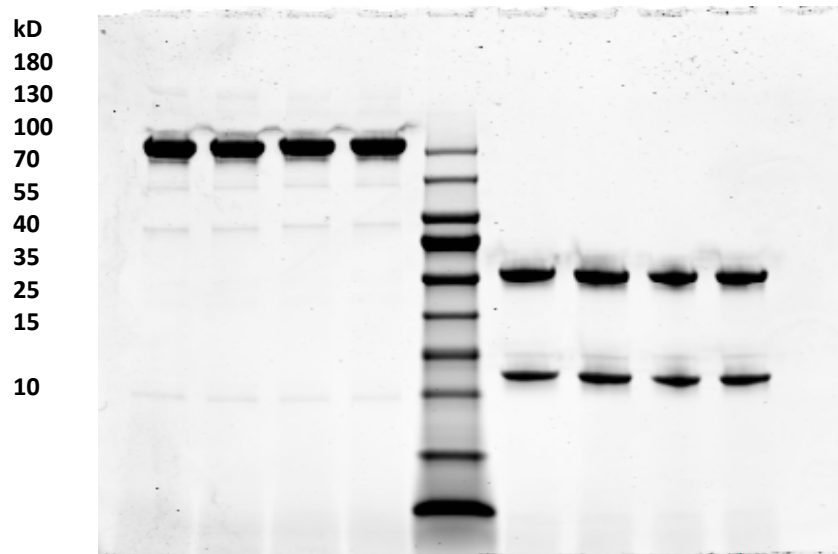


FIG 10 Continuación

Fig.11



10 ciclos de congelamiento-descongelamiento				
	Condiciones no reductoras		Condiciones reductoras	
	Ref	10x FT	Ref	10x FT
39B6-AVE	1	2	5	6
39B6-AYE	3	4	7	8

Fig.12

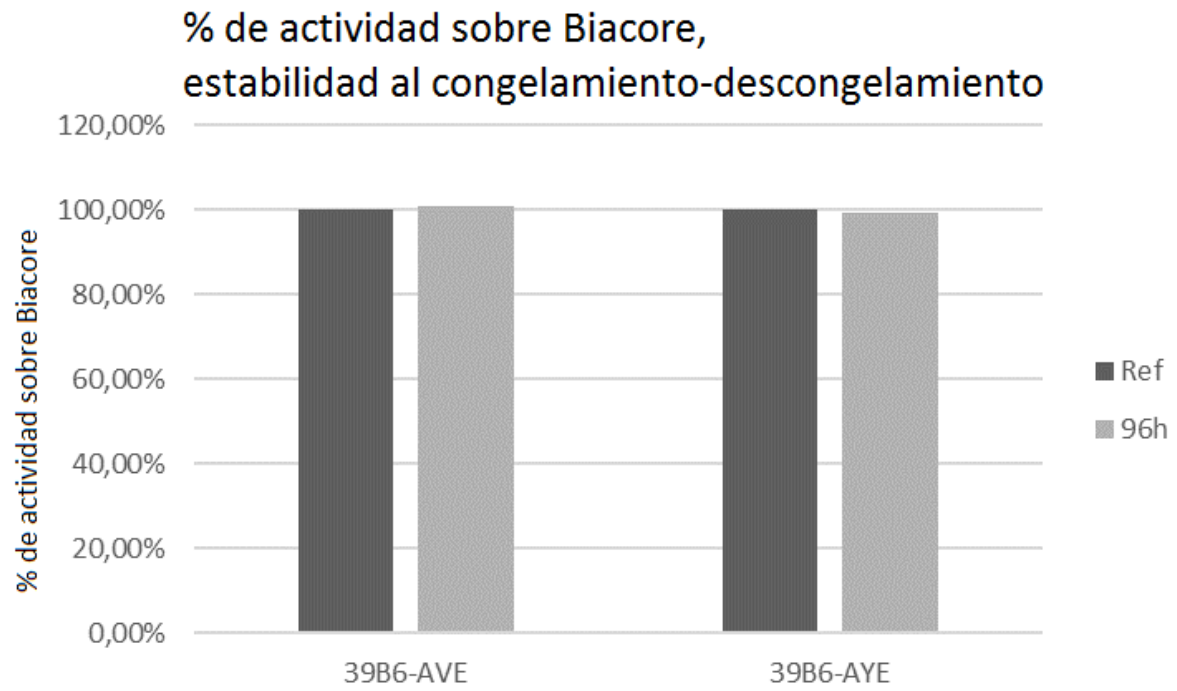


Fig. 13

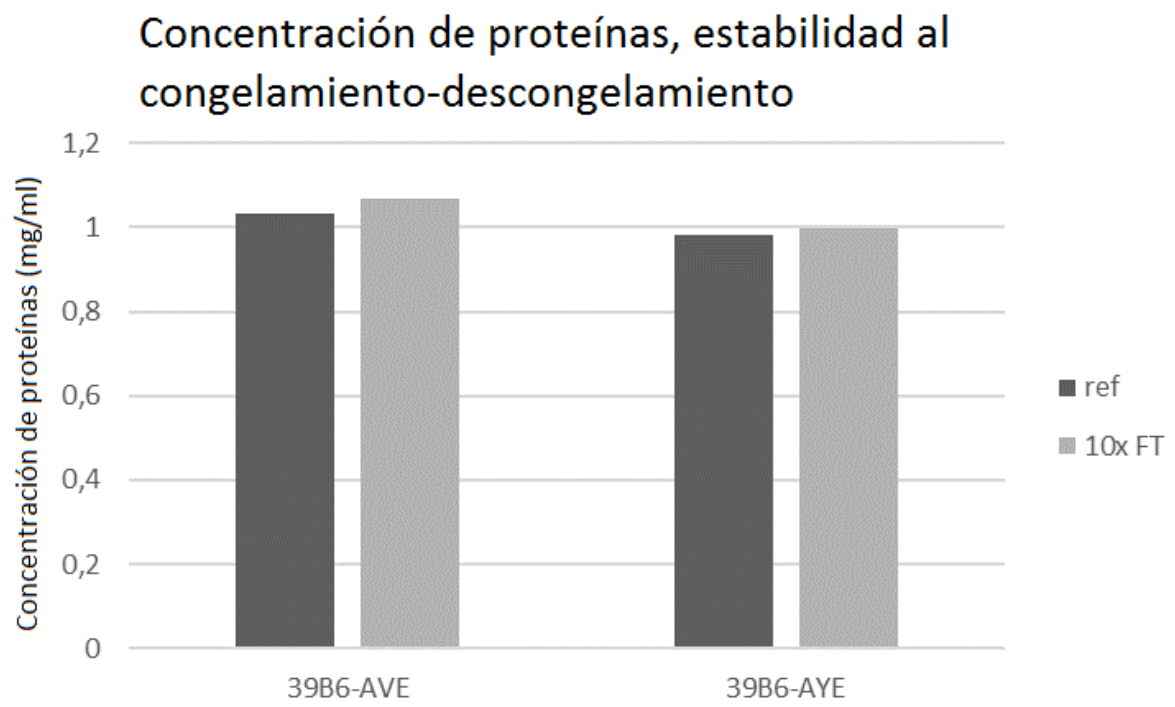


Fig. 14

Estudio de estabilidad térmica de variantes de 39B6

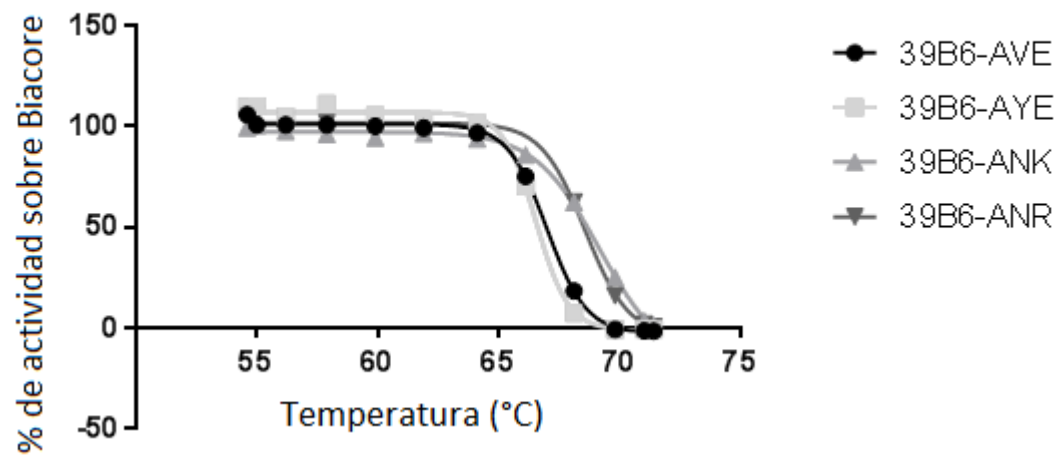
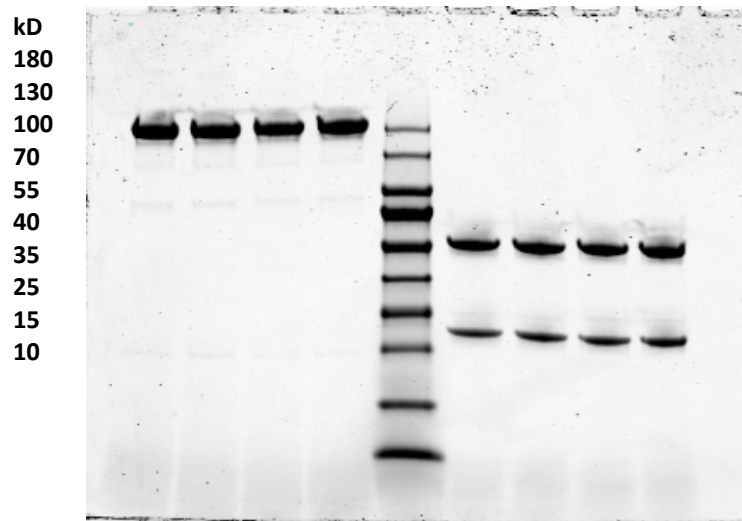


Fig. 15



	96 horas de rotación			
	Condiciones no reductoras		Condiciones reductoras	
	Ref	96h	Ref	96h
39B6-AVE	1	2	5	6
39B6-AYE	3	4	7	8

Fig. 16

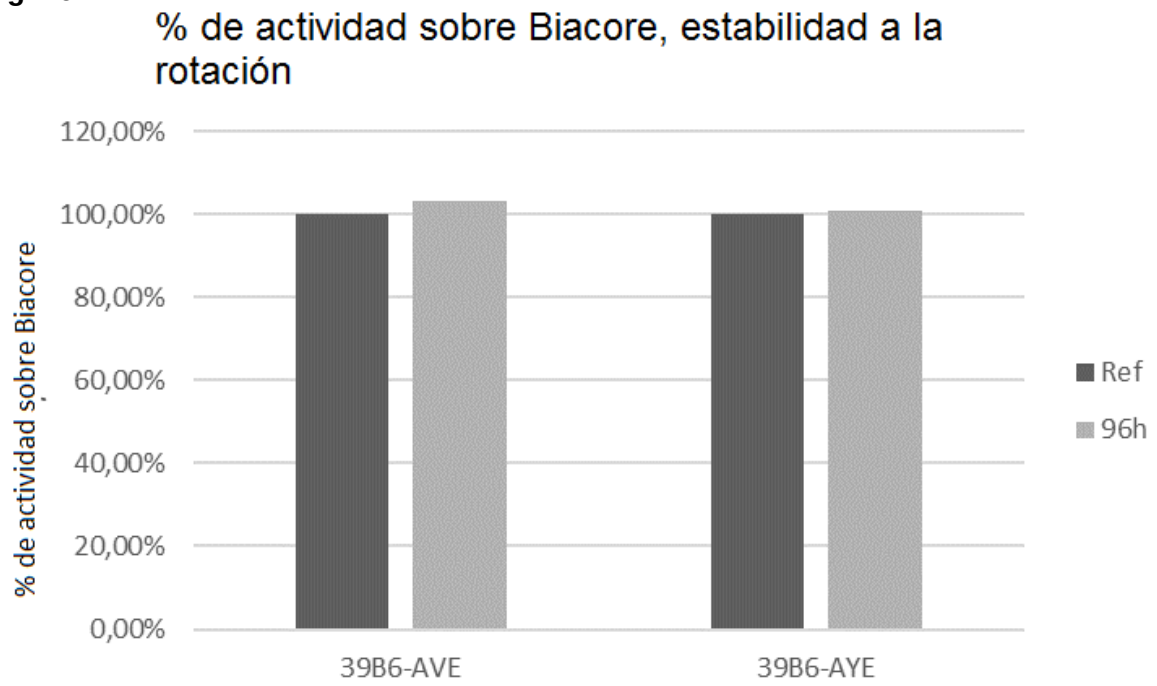


Fig. 17

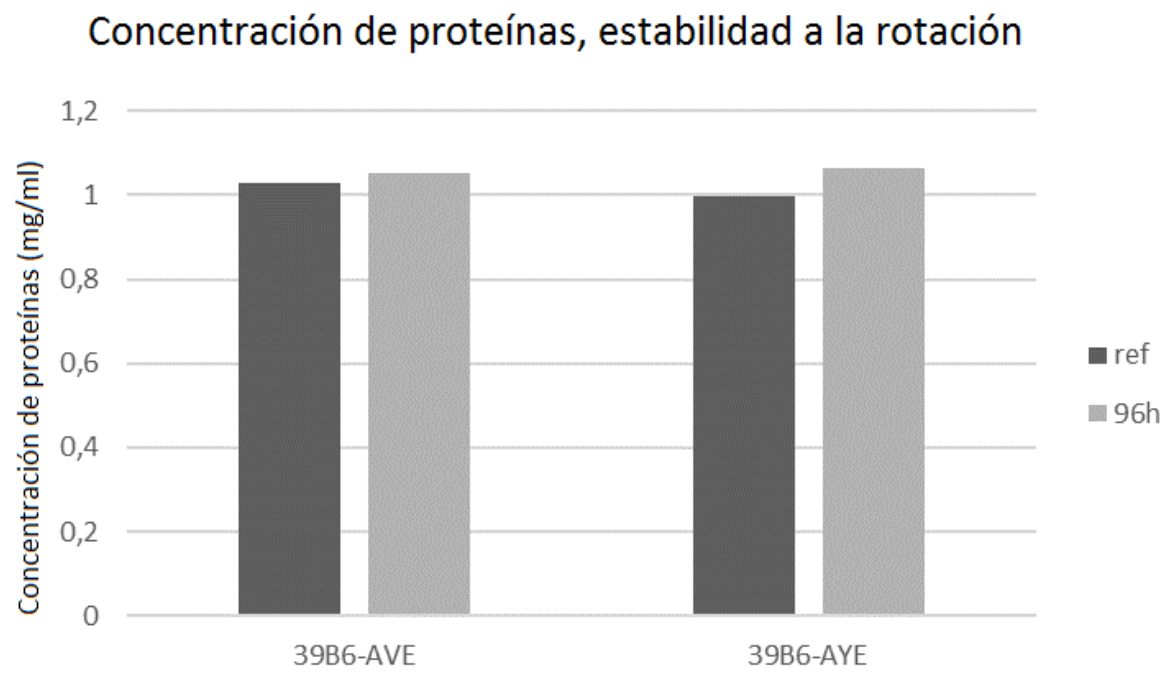


Fig. 18

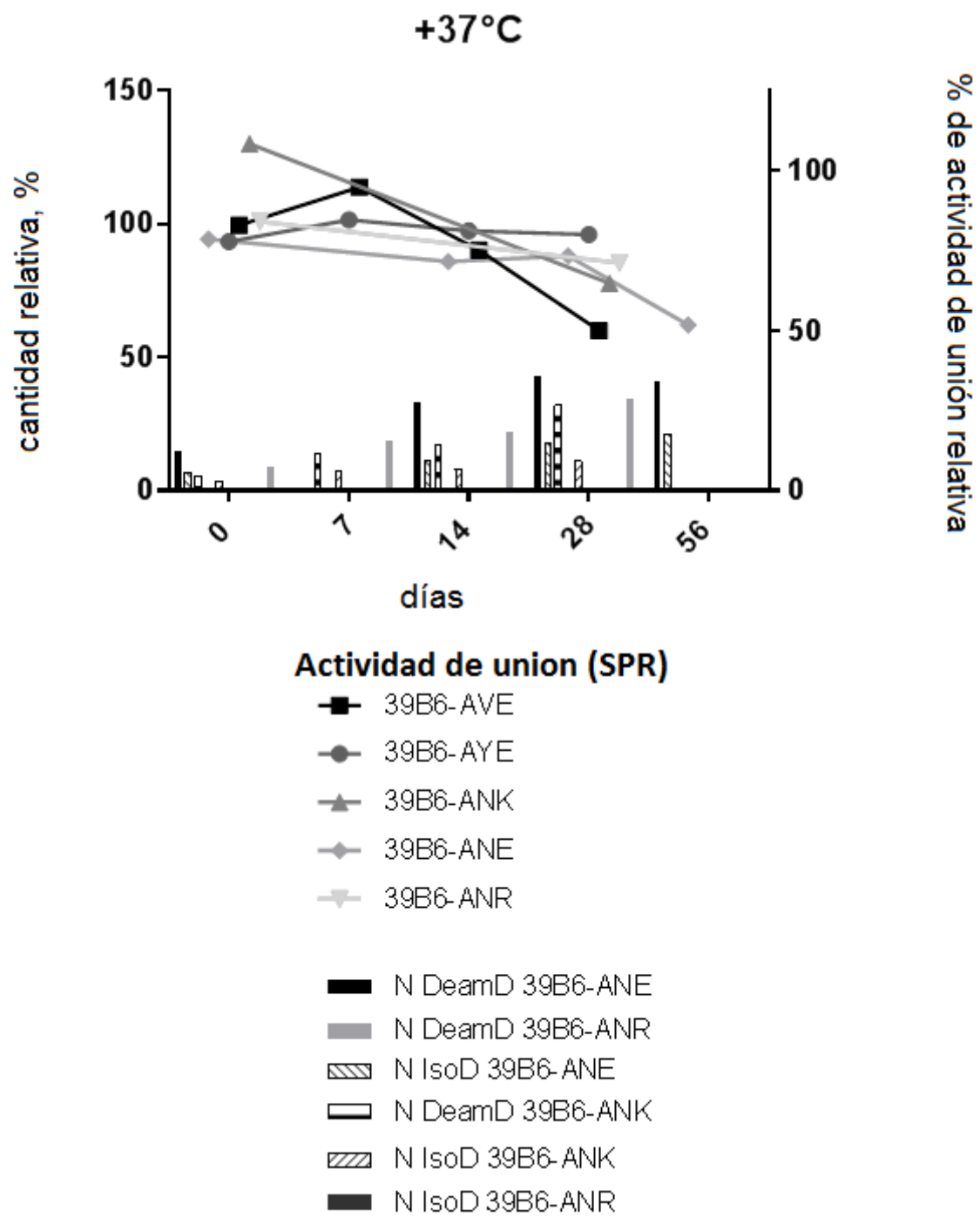
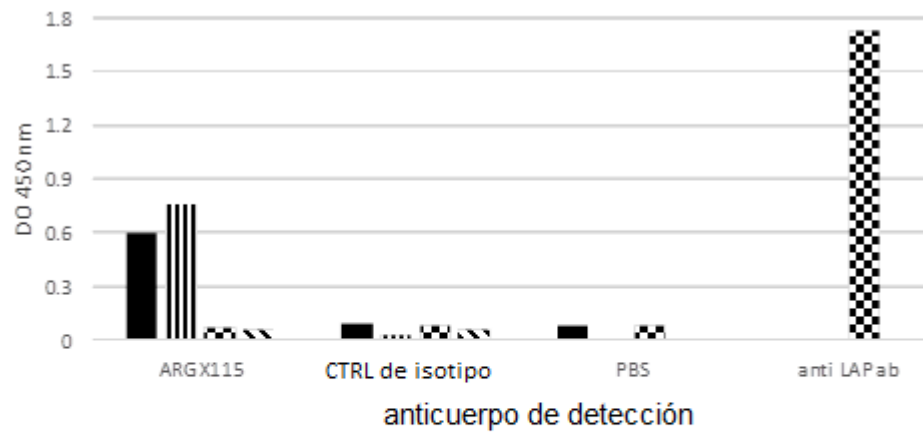


Fig. 19



- recubrimiento GARP, captura de TGFB latente
- || recubrimiento anti-GARP Ab, adición GARP, captura TGFB
- ▨ recubrimiento GARP, captura de LAP
- ▧ recubrimiento anti-GARP Ab, adición GARP, captura LAP

Fig. 20

