

ANTICUERPOS CONTRA LA INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$ PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL

ANTECEDENTES

5 La enfermedad renal por lo general se refiere a una afección en la que los riñones de un individuo están dañados y no pueden funcionar de manera adecuada para filtrar los productos de desecho y agua en exceso de la sangre o para ayudar a controlar la presión sanguínea. El funcionamiento de los riñones libera hormonas que regulan la presión sanguínea, producen vitamina D y controlan la producción de glóbulos rojos. El daño en los riñones puede provocar
10 que se acumulen desechos en el cuerpo y también puede causar o aumentar el riesgo en un individuo de otros problemas de salud, tales como cardiopatía, ataque al corazón o accidente cerebrovascular. Los factores de riesgo principales para la enfermedad renal incluyen diabetes, presión sanguínea elevada y antecedentes familiares de insuficiencia renal. La enfermedad renal puede incluir lesión renal aguda (AKI, por sus siglas en inglés) que incluye una pérdida de
15 la función renal repentina y a veces temporal y la enfermedad renal crónica (CKD, por sus siglas en inglés) que se refiere a cualquier afección que provoca una reducción de la función renal durante un periodo de tiempo prolongado. Se puede desarrollar CKD a lo largo de muchos años y puede conllevar enfermedad renal (de los riñones) terminal (ESRD, por sus siglas en inglés).

 La enfermedad renal es la novena causa de muerte en los Estados Unidos, según las
20 estadísticas de la enfermedad renal de 2015 del Fondo Renal Estadounidense. De aproximadamente un 10 % a un 14 % de la población adulta general en EE. UU. padece CKD, que es más prevalente en mujeres. Sin embargo, los hombres con CKD tienen una probabilidad un 50 % mayor que las mujeres de que la afección de CKD evolucione en insuficiencia renal o ESRD. Además, ciertos grupos raciales y étnicos tienen un riesgo mayor de insuficiencia renal
25 que otros. Por ejemplo, en comparación con los caucásicos, la prevalencia de ESRD es aproximadamente 3.7 veces mayor en estadounidenses de raza negra, 1.4 veces mayor en indígenas estadounidenses y 1.5 veces mayor en estadounidenses de raza asiática. En comparación con personas que no tienen un origen hispano, las que tienen un origen hispano tienen una probabilidad casi 1.5 veces mayor de padecer ESRD.

30 La evolución de la enfermedad renal a menudo conlleva la destrucción total del tejido renal funcional, que en última instancia puede hacer que los individuos afectados requieran diálisis de por vida o que tengan que someterse a un trasplante de aloinjerto renal. La evolución de la enfermedad renal está caracterizada por fibrosis, que contribuye a la destrucción del glomérulo (glomeruloesclerosis) y túbulos renales (fibrosis tubulointersticial). Un factor clave en
35 la evolución de la fibrosis renal es la citocina TGF- β , sus moléculas y receptores interactivos, y

sus cascadas de señalización celular posteriores que activan los mecanismos celulares patofisiológicos que dan lugar a la fibrosis renal y el deterioro de la función renal. La expresión de TGF- β en el riñón y la excreción de TGF- β se correlacionan con el deterioro de la velocidad de filtración glomerular (GFR, por sus siglas en inglés) y fuga de proteínas (proteinuria). La evolución de la enfermedad renal a menudo conlleva la destrucción total del tejido renal funcional, que hace que los individuos afectados requieran diálisis de por vida o que tengan que someterse a un trasplante de aoinjerto renal. A nivel molecular, las conexiones e interacciones entre TGF- β , que participa en muchas patologías incluidas enfermedades neoplásicas e inflamación, y sus receptores y mecanismos de señalización siguen siendo elusivos.

Para el tratamiento de la enfermedad renal, se necesitan especialmente moduladores de la actividad de TGF- β específicos de la enfermedad y tejido que no den como resultado efectos inespecíficos no deseados y que no afecten de manera adversa las otras contribuciones fisiológicas de esta citocina a las funciones celulares normales. Los métodos y los reactivos como se describen en la presente proporcionan un tratamiento ventajoso y beneficioso de la enfermedad renal, así como también anticuerpos dirigidos de manera específica como componentes de tratamiento que tienen efectos directos en el bloqueo, neutralización, modulación y/o inhibición de una integrina diana crucial de la que se ha descubierto que desempeña una función significativa en las patologías de células y tejidos renales y en el mecanismo de la enfermedad renal.

COMPENDIO

Como se describe a continuación, la presente divulgación presenta métodos terapéuticos para tratar a un sujeto, especialmente un sujeto mamífero, y más especialmente, un sujeto humano, que padece una enfermedad renal, en particular, enfermedad renal crónica (CKD) y/o síntomas de esta con un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$, es decir, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$. En función de los descubrimientos descritos en la presente, los niveles elevados de expresión de la integrina $\alpha\beta 8$ en las células y tejido renales, y especialmente en las células y tejidos renales enfermos, tales como en sujetos que padecen una enfermedad renal, por ejemplo, CKD, permiten que un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, actúe específicamente sobre la integrina $\alpha\beta 8$ expresada en los tejidos renales enfermos de sujetos que sufren una enfermedad renal, tal como CKD. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ descritos no presentan reactividad cruzada con otras isoformas del receptor de integrinas, tales como $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ o $\alpha\beta 6$. En las realizaciones, los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ son anticuerpos aislados y purificados. En una realización particular, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ es un anticuerpo humanizado. En otra realización particular, el anticuerpo

contra la integrina $\alpha\beta 8$ es humanizado y tiene una afinidad optimizada para tener unas mejores propiedades estructurales, de unión y/o funcionales, tales como una mejor especificidad, afinidad y/o estabilidad.

Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ y métodos descritos en la presente se desarrollaron basándose en el descubrimiento de que las células y tejido renales, especialmente tejido epitelial del riñón, expresan niveles elevados de integrina $\alpha\beta 8$, que es un receptor para la forma latente de la citocina TGF- β (LAP-TGF- β). En particular, se descubrió que los niveles elevados de integrina $\alpha\beta 8$ expresada en el epitelio renal, como ponen en evidencia las realizaciones experimentales descritas en la presente, están sumamente correlacionados con la fibrosis y/o con la gravedad de la fibrosis y enfermedad fibrótica en tejido renal en sujetos humanos y en modelos en animales que padecen una enfermedad renal. En particular, en comparación con las células y tejido renales normales, las células glomerulares y tubulares en el tejido epitelial del riñón de individuos que padecen enfermedad renal, tal como nefropatía diabética (DN, por sus siglas en inglés), mostraron niveles elevados de expresión de integrina $\alpha\beta 8$, especialmente, en los podocitos y túbulos (tales como los túbulos corticales proximales y distales) de riñón enfermo, como se ejemplifica en la presente. Además de la nefropatía diabética, otros tipos no limitantes de enfermedad renal en los que la fibrosis del tejido renal produce daño debilitante y disfunción de la actividad y función renales incluyen la enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal aguda, enfermedad renal asociada a la hipertensión, enfermedad renal asociada a la hiperglucemia, fibrosis renal, enfermedad renal asociada a la inflamación, enfermedad renal terminal (ESRD), fibrosis renal asociada a la autoinmunidad (por ejemplo, nefritis lúpica) y fibrosis tras el trasplante de riñón y similares.

Para el tratamiento de la enfermedad renal y CKD, se ha mostrado, con la puesta en práctica de los métodos en los que participan los reactivos de tipo anticuerpo descritos en la presente, que la integrina $\alpha\beta 8$, que se une a TGF- β en su forma latente, es una diana sumamente eficaz y útil para reducir y atenuar la fibrosis y el daño tisular que son los rasgos característicos de la enfermedad renal, tal como CKD. Como se describe y ejemplifica en la presente, la integrina $\alpha\beta 8$ desempeña una función directa, significativa y no reconocida previamente, en la fibrosis renal, a la vista del nivel de expresión elevado de integrina $\alpha\beta 8$ en células y tejido renales, particularmente células y tejido epiteliales renales, por ejemplo, en los podocitos glomerulares y células tubulares del riñón, y en la modulación de la actividad de TGF- β , que está implicada en y agrava los efectos nocivos de la fibrosis en el tejido renal en sujetos con enfermedad renal. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ utilizados en los métodos descritos permiten la modulación específica y selectiva de las actividades tanto de la integrina $\alpha\beta 8$ como su ligando TGF- β en células y tejido renales, para dar lugar de esta manera a la

reducción, anulación, atenuación, descenso y/o inhibición de la fibrosis en el tejido renal causada por la unión de la integrina $\alpha\beta 8$ a su ligando, TGF- β latente, que permite entonces la activación/liberación de TGF- β activo y desencadena los efectos nocivos de TGF- β activo al causar la fibrosis del tejido renal.

5 Una manera en la que se puede activar TGF- β en el tejido renal es por su asociación, como péptido asociado a la latencia (LAP, por sus siglas en inglés) TGF- β , con la integrina $\alpha\beta 8$ expresada en la membrana de las células renales. Como se muestra en la presente, se observó que la la expresión de la integrina $\alpha\beta 8$ estaba sumamente elevada en el tejido renal de sujetos que padecían una enfermedad renal y fibrosis renal concomitante. La activación sostenida o
10 prolongada de TGF- β en el riñón provoca la fibrosis del tejido renal. Se determinó que actuar sobre la integrina $\alpha\beta 8$, especialmente en tejido renal que expresa niveles elevados de integrina $\alpha\beta 8$, con los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ descritos en la presente, era un tratamiento terapéutico eficaz de la enfermedad renal, por ejemplo, CKD, que a la vez evitaba varios efectos sistémicos potenciales de la actuación sobre TGF- β y supresión de TGF- β indiscriminadas en
15 otros tejidos del cuerpo que no son el riñón. El modelo UUO es un modelo de fibrosis y la inhibición de la fibrosis y la activación de TGF- β , como se demuestra con los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ descritos en la presente, dará lugar a la reducción y/o inhibición de la evolución de CKD. Como se describe en la presente, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ de afinidad elevada que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$ que tiene una expresión muy elevada
20 en tejido renal enfermo y/o fibrótico también reduce, anula, atenúa, disminuye, neutraliza y/o inhibe o evita de otro modo selectivamente la interacción de la integrina $\alpha\beta 8$ y TGF- β latente en la membrana de las células y tejido renales. Otros tejidos y órganos que no expresan la integrina $\alpha\beta 8$ no se verán afectados. La unión específica del anticuerpo anti- $\alpha\beta 8$ a la integrina $\alpha\beta 8$ expresada en las células renales bloquea de esta manera la activación de TGF- β en el
25 riñón enfermo y/o fibrótico de modo que se trate la enfermedad renal, tal como CKD, y fibrosis asociada, con efectos adversos de mínimos a nulos en la actividad de TGF- β en células y tejidos no renales.

Convenientemente, los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ mitigan específicamente los efectos de la integrina $\alpha\beta 8$ y la interacción de TGF- β latente en el desarrollo y evolución de la
30 fibrosis en tejido renal y enfermedad renal, a la vez que no afecta a la mayor parte de la contribución de la actividad de TGF- β a las funciones celulares normales. En las realizaciones, los métodos descritos en la presente proporcionan además un beneficio de tratamiento terapéutico para la protección del epitelio renal funcional en un individuo que padece enfermedad renal que conlleva fibrosis, tal como CKD y otras enfermedades renales, tales como
35 la enfermedad renal asociada a la nefropatía diabética (DN), enfermedad renal aguda,

enfermedad renal asociada a la hipertensión, enfermedad renal asociada a la hiperglucemia, fibrosis renal, enfermedad renal asociada a la inflamación, enfermedad renal terminal (ESRD), fibrosis renal asociada a la autoinmunidad (por ejemplo, nefritis lúpica) y fibrosis posterior al trasplante de riñón y similares.

5 En un aspecto, se proporciona un método para tratar la fibrosis renal en un sujeto que padece una enfermedad renal, en el que el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para reducir o atenuar la fibrosis renal en un sujeto que padece una enfermedad renal, en el que el método comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, para de esta manera reducir o atenuar la fibrosis en el riñón.

15 En otro aspecto, se proporciona un método para anular la actividad de la integrina $\alpha\beta8$ asociada con la fibrosis renal, en el que el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, y bloquear la unión de la integrina $\alpha\beta8$ a TGF- β , para de esta manera anular la actividad de la integrina $\alpha\beta8$ asociada con la fibrosis renal. En una realización del método, el sujeto padece una enfermedad renal.

20 En otro aspecto más, se proporciona un método para tratar la fibrosis renal bloqueando la activación de TGF- β a partir de su forma latente en células y tejido renales, en el que el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este y bloquear la unión de la integrina $\alpha\beta8$ a la forma latente de TGF- β para producir TGF- β activa, para tratar de esa manera la fibrosis renal. En una realización del método, el sujeto padece una enfermedad renal.

25 Se proporciona un método para tratar el daño renal caracterizado por un aumento en los niveles de creatinina plasmática y/o excreción de proteína urinaria, en el que el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la administración del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este anula los niveles
30 de creatinina plasmática y/o excreción de proteína urinaria en el sujeto, para tratar de esta manera el daño renal.

 En una realización, en anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este disminuye la activación de TGF- β mediada por $\alpha\beta8$ en el tejido renal del sujeto.

35 En las realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores mostrados en la presente,

la enfermedad renal se selecciona entre nefropatía diabética (DN), enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal aguda, enfermedad renal asociada a la hipertensión, enfermedad renal asociada a la hiperglucemia, fibrosis renal, enfermedad renal asociada a la inflamación, enfermedad renal terminal (ESRD), fibrosis renal asociada a la autoinmunidad (por ejemplo, nefritis lúpica) y fibrosis tras el trasplante de riñón y similares. En una realización particular, la enfermedad renal es CKD. En una realización particular, la enfermedad renal es nefropatía diabética.

En una realización de cualquier aspecto de los métodos anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este se une a la integrina $\alpha\beta8$ expresada en las células y/o tejido renales y bloquea la activación de TGF- β a partir de su forma latente.

Se proporciona, como otro aspecto descrito en la presente, un método para detectar la fibrosis renal en tejido renal, en el que el método comprende poner en contacto tejido renal con una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este marcado de manera detectable y detectar la unión del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ a la integrina $\alpha\beta8$ en el tejido renal.

En una realización de cualquier aspecto de los métodos anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta8$, comprende:

(a) una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

RYWMS (SEQ ID NO: 1);

(b) una región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2); y

(c) una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) CDR3 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

LITTEDY (SEQ ID NO: 3); y

(d) una región CDR1 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 4);

(e) una región CDR2 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

YANRLVD (SEQ ID NO: 5); y

(f) una región CDR3 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos:

LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 6).

En otra realización de cualquier aspecto de los métodos anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$, comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSS
TINYTSSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIITTEDYWGQGTTTVTVSS (SEQ
ID NO: 7); y

una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena ligera (V_L):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8).

En otra realización de cualquier aspecto de los métodos anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$, comprende:

(a) una región CDR1 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

RSWIS (SEQ ID NO: 9);

(b) una región CDR2 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2); y

(c) una región CDR3 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

LITTEDY (SEQ ID NO: 3); y

(d) una región CDR1 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

KASQDINKYLS (SEQ ID NO: 10);

(e) una región CDR2 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

YANRLVD (SEQ ID NO: 5); y

(f) una región CDR3 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

LQYDVFPYT (SEQ ID NO: 11).

En otra realización de cualquier aspecto de los métodos anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ (denominado "B5-15" en la presente), o un

fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$, comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRSWISWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST
 INYTSSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILITTEDYWGQGTTVTVSS (SEQ
 ID NO: 12) y

una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena ligera (V_L):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCLQYDVFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 13).

En una realización de cualquier aspecto de los métodos de tratamiento anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo antiintegrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$, se administra al sujeto combinado con un agente terapéutico o tratamiento para una enfermedad renal auxiliares. En las realizaciones, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$, se administra al sujeto antes, a la vez o después de la administración del agente terapéutico o tratamiento auxiliar.

En una realización de cualquier aspecto de los métodos de tratamiento anteriores mostrados en la presente, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, se une a la integrina $\alpha\beta 8$ que tiene una mayor expresión en células y tejido renales fibróticos y atenúa o anula la fibrosis asociada con el aumento de la expresión de la integrina $\alpha\beta 8$ en los podocitos y las células tubulares intersticiales en el tejido renal del sujeto con una enfermedad renal, tal como CKD.

En otro aspecto como se describe en la presente se proporciona un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este comprende:

(a) una región CDR1 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

RYWMS (SEQ ID NO: 1);

(b) una región CDR2 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2); y

(c) una región CDR3 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

LITTEDY (SEQ ID NO: 3); y

(d) una región CDR1 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 4);

(e) una región CDR2 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

YANRLVD (SEQ ID NO: 5); y

5 (f) una región CDR3 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 6).

En otro aspecto como se describe en la presente se proporciona un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el anticuerpo o un
10 fragmento de unión al antígeno de este comprende:

una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSS
TINYTSSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILITTEDYWGQGTTTVTVSS (SEQ
ID NO: 7); y

15 una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena ligera (V_L):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8).

En una realización, el anticuerpo anterior, o un fragmento de unión al antígeno de este, se une a la integrina $\alpha\beta 8$ que tiene una mayor expresión en células y tejido renales fibróticos en un sujeto que padece una enfermedad renal, tal como CKD. En una realización, el anticuerpo
20 contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, se une específicamente a una integrina $\alpha\beta 8$ que tiene una mayor expresión de células y tejido renales fibróticos y bloquea la unión de la integrina $\alpha\beta 8$ a TGF- β latente, para anular de esta manera la actividad de la integrina $\alpha\beta 8$ asociada con la fibrosis renal. En una realización, el anticuerpo contra la
25 integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, atenúa o anula la fibrosis asociada con la mayor expresión de la integrina $\alpha\beta 8$ en podocitos y células tubulares intersticiales en tejido renal del sujeto con enfermedad renal.

En otro aspecto como se describe en la presente se proporciona un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el anticuerpo o un
30 fragmento de unión al antígeno de este comprende:

(a) una región CDR1 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

RSWIS (SEQ ID NO: 9);

(b) una región CDR2 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de
35 aminoácidos:

EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2); y

(c) una región CDR3 variable de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

LITTEDY (SEQ ID NO: 3); y

5 (d) una región CDR1 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

KASQDINKYLS (SEQ ID NO: 10);

(e) una región CDR2 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

10 YANRLVD (SEQ ID NO: 5); y

(f) una región CDR3 variable de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

LQYDVFPYT (SEQ ID NO: 11).

En otro aspecto como se describe en la presente se proporciona un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRSWISWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST
INYTSSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILITTEDYWGQGTTVTSS (SEQ
20 ID NO: 12) y

una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena ligera (V_L):

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINKYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQYDVFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 13).

En una realización, el anticuerpo anterior, o un fragmento de unión al antígeno de este, se une a la integrina $\alpha\beta8$ que tiene una mayor expresión en células y tejido renales fibróticos en un sujeto que padece una enfermedad renal, tal como CKD. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, se une específicamente a una integrina $\alpha\beta8$ que tiene una mayor expresión de células y tejido renales fibróticos y bloquea la unión de la integrina $\alpha\beta8$ a TGF- β latente, para anular de esta manera la actividad de la integrina $\alpha\beta8$ asociada con la fibrosis renal. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, atenúa o anula la fibrosis asociada con la mayor expresión de la integrina $\alpha\beta8$ en podocitos y células tubulares intersticiales en tejido renal del sujeto con enfermedad renal.

En una realización de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, es de la clase de IgG. En una

realización particular, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este es del isotipo IgG1.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que compite por la unión a la integrina $\alpha\beta 8$ con el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este de cualquiera de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ como se describen en los aspectos anteriores. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, es un anticuerpo IgG. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, es un anticuerpo IgG1.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, como se describe en la presente. En una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica la región V_H del anticuerpo comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

gaggtgcagctggtggaaagcggcggaggactggtgcagcctggcggcagcctgagactgagctgcgccgtgtccgg
cttcgtgttcagccggagctggatcagctgggtccgccaggccccagggaagggcctggaatggatcggcgagatcaacccga
cagcagcaccatcaactacaccagcagcctgaaggaccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctgc
agatgaacagcctgcgggcccaggacaccgctgtactactgcgccatcctcatcaccaccgaggactactggggccaggggca
ccaccgtgaccgtgtcctct (SEQ ID NO: 14);

y la secuencia polinucleotídica que codifica la región V_L del anticuerpo comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico:

gacatccagctgaccagagccccagcagcctgagcgccagcgtgggacagagtgaccatcacatgcaaggcc
agccaggacatcaacaagtacctgagctggtccagcagaagcccggcaaggcccccaagagcctgatctactacgccaaccg
gctggtggacggcgtgccagcagattttctggcagcggcagcggcaccgacttcaccctgaccatcagcagcctgcagcccgag
gacttcgccacctactactgcctgcagtacgacgtgtcccctacaccttcggcggaggcaccaaggtggaaatcaag (SEQ ID
NO: 15).

En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido como se ha descrito anteriormente. En las realizaciones, el vector de expresión es un vector de expresión procariota, eucariota o de mamíferos.

En otro aspecto, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión como se ha descrito anteriormente. En las realizaciones, la célula es una célula hospedadora procariota, eucariota o de mamíferos.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este como se ha mostrado anteriormente, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el

polinucleótido como se ha mostrado anteriormente, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona un kit que comprende el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, como se ha descrito en la presente, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ o el fragmento de unión al antígeno.

Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

DEFINICIONES

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que le asigna comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto en la técnica una definición general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2.^a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5.^a Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se utilizan en la presente, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuye a continuación, a menos que se especifique algo distinto.

El término “agente” se refiere a una proteína, polipéptido, péptido (o fragmento o porción de este), molécula de ácido nucleico, compuesto de bajo peso molecular, fármaco o medicamento. El agente puede ser un antagonista y bloquear o inhibir la actividad de otra molécula, tal como un ligando análogo.

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en esta divulgación, se refiere a una inmunoglobulina o un fragmento, porción o un derivado de esta y engloba cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión al antígeno, independientemente de si se produce *in vitro* o *in vivo*. El término incluye, sin carácter limitante, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados e injertados. A menos que esté modificado por el término “intacto”, tal como en “anticuerpos intactos”, a efectos de esta divulgación, el término “anticuerpo” también incluye fragmentos (o porciones) de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb y otros fragmentos (o porciones) de anticuerpos que mantienen la función de unión al antígeno o función de unión al epítipo, es decir, la capacidad de unirse a un polipéptido de manera específica. Normalmente, los fragmentos (o porciones) de este tipo comprenden un dominio de unión al antígeno.

A modo de ejemplo, una inmunoglobulina (anticuerpo) comprende una unidad

estructural tetramérica. Cada tetrámero contiene dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (L) (aproximadamente 25 kD) y una cadena “pesada” (H) (aproximadamente 50-70 kD). El extremo amino (N) de cada cadena polipeptídica define una región variable (V) de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son responsables principalmente del reconocimiento del antígeno y unión a este. Las expresiones región de la cadena ligera variable (V_L) y región de la cadena pesada variable (V_H) se refieren a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, respectivamente, de la molécula de inmunoglobulina (anticuerpo). Una región variable o “región V” se refiere a un dominio de la región variable de un anticuerpo que comprende segmentos componente, concretamente, un armazón 1 (F1), CDR1, armazón 2 (F2), CDR2, armazón 3 (F3), CDR3 y armazón 4 (F4), que son el resultado de la reordenación genética de los genes de la región V de la cadena pesada y la cadena ligera durante la diferenciación de los linfocitos B.

Las regiones V_H y V_L de las moléculas de inmunoglobulina (anticuerpo) comprenden tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son tres regiones hipervariables que se sitúan dentro de las regiones de armazón de V_H y V_L. Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de las regiones V_H y V_L de un anticuerpo se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N de los segmentos de la región variable. Las secuencias de aminoácidos de las regiones de armazón de diferentes cadenas pesada y ligera de anticuerpo están relativamente conservadas dentro de una especie. Las regiones de armazón (FW1-FW4) de las regiones V de la cadena pesada y ligera constitutivas de un anticuerpo proporcionan un posicionamiento y alineación estructurales de las CDR en el espacio tridimensional. La caracterización (y numeración) de las secuencias de aminoácidos de las CDR y regiones de armazón en las moléculas de anticuerpo se pueden determinar tal como indican, por ejemplo, Kabat, Chothia, Base de Datos Internacional de Inmunogenética (IMGT), y AbM (por ejemplo, Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature*, 342:877-883; Chothia *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817; Al-Lazikani *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273(4):927-948). Las definiciones de sitios de combinación de antígenos se presentan en Ruiz *et al.*, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 y Lefranc, 2001, *Nucleic Acids Res.*, 29(1):207-209; MacCallum *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745; Martin *et al.*, 1989, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272; Martin *et al.*, 1991, *Methods Enzymol.*, 203:121-153; Pedersen *et al.*, 1992, *Immunomethods*, 1:126-136; y Rees *et al.*, 1996, en: Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, págs. 141-172.

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que la región constante, o un fragmento de esta, se altera, reemplaza o intercambia de manera que el sitio de unión al

antígeno (región variable, CDR o fragmento de esta) se une a una región constante de una molécula de anticuerpo de una clase y/o especie diferentes o alteradas, o a una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades o función efectora al anticuerpo quimérico (por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.). Como alternativa, un anticuerpo quimérico puede comprender una región variable, o un fragmento de esta, que se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada (por ejemplo, una o más CDR y regiones de armazón de diferentes especies).

Las expresiones "porción de unión al antígeno", "dominio de unión al antígeno", "fragmento de unión al antígeno", "fragmento de unión" o "porción de unión" se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. En algunos casos, cuando un antígeno es grande, el dominio de unión a antígeno puede unirse únicamente a una parte del antígeno. Una porción de la molécula antigénica que es responsable de las interacciones específicas con el dominio de unión al antígeno se denomina "epítipo" o "determinante antigénico". En realizaciones particulares, un dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (V_L) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (V_H); sin embargo, no es necesario que comprenda ambas. Por ejemplo, un denominado fragmento de anticuerpo Fd está constituido únicamente por un dominio V_H , pero todavía conserva parte de la función de unión al antígeno del anticuerpo intacto. El sitio de unión o epítipo de un anticuerpo producido contra un antígeno concreto se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo competitivo (por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) competitivo) utilizando un anticuerpo con un epítipo conocido. Si un anticuerpo de prueba compite por la unión a un antígeno determinado, entonces probablemente el anticuerpo compartirá al menos parte del mismo epítipo. El epítipo también se puede localizar utilizando un intercambio de dominios o mutagénesis selectiva del antígeno. Es decir, cada región o cada aminoácido del antígeno se puede "intercambiar", o sustituir, con aminoácidos o componentes que se sabe que no interaccionan con el anticuerpo de prueba. Si la sustitución de una región o aminoácido determinado reduce la unión del anticuerpo de prueba al antígeno sustituido en comparación con el antígeno no sustituido, entonces es probable que esa región o aminoácido sea el epítipo, esté dentro del epítipo o sea al menos una parte del epítipo.

Los fragmentos (o porciones) de unión de un anticuerpo se producen mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos o porciones de unión incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y anticuerpos monocatenarios.

Se entiende que un anticuerpo que no es un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. La digestión de anticuerpos con la enzima papaína da como resultado dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, conocidos también como fragmentos “Fab”, y un fragmento “Fc”, que no tiene actividad de unión al antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de anticuerpos con la enzima pepsina genera un fragmento $F(ab')_2$ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen ligados y comprenden dos sitios de unión al antígeno. El fragmento $F(ab')_2$ tiene la capacidad de reticularse con el antígeno. El término “Fv”, cuando se utiliza en la presente, se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva tanto los sitios de reconocimiento del antígeno como los de unión al antígeno. El término “Fab”, cuando se utiliza en la presente, se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

El término “mAb” se refiere a un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos divulgados en la presente comprenden, sin carácter limitante, anticuerpos nativos enteros, anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; fragmentos Fab, Fab', de la región V monocatenarios (scFv), polipéptidos de fusión y anticuerpos no convencionales.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo derivado de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina, de rata o conejo) que se ha modificado para que contenga una cantidad mínima de secuencias no humanas (por ejemplo, murinas, de rata o conejo). Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) hipervariables son reemplazados por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen una especificidad, una afinidad y/o una capacidad de interés (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). Por lo tanto, las regiones de armazón de anticuerpos humanizados son esencialmente las de la inmunoglobulina humana. En algunos casos, los residuos de la región de armazón (FW) de Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene una especificidad, una afinidad y/o una capacidad de interés.

Los anticuerpos humanizados se pueden modificar adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales en la región de armazón de Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana

mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente el de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5 225 539 o 5 639 641.

“Fragmento” se refiere a una porción de una molécula de ácido nucleico o polipéptido. El “fragmento” o “porción” contiene, preferentemente, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la longitud total de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. En una realización particular, un fragmento o porción de un polipéptido puede contener 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 300 aminoácidos. En las realizaciones, el fragmento o porción mantiene la actividad y/o función total o al menos parcial de toda la molécula de ácido nucleico o polipéptido.

“Detectar” se refiere a identificar la presencia, ausencia o cantidad del analito que se ha de detectar. En diversas realizaciones, el analito es un biomarcador de ácido nucleico o polipéptido.

“Competir”, en relación con un anticuerpo, significa, en general, que un primer anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, compite por la unión con un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, en donde la unión del primer anticuerpo (a su epítipo o sitio de unión al antígeno homólogo (por ejemplo, en la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$)) disminuye de manera detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. Como puede ser el caso de manera alternativa, la unión del segundo anticuerpo a su epítipo o sitio de unión al antígeno homólogo también disminuye de manera detectable en presencia del primer anticuerpo; sin embargo, este no es siempre el caso. Por lo tanto, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo o sitio de unión al antígeno homólogo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítipo o sitio de unión en el antígeno. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de manera detectable la unión del otro anticuerpo con su ligando o epítipo homólogo, ya sea en la misma, o en mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos presentan “reactividad cruzada” entre sí para la unión a su(s) respectivo(s) epítipo(s) o sitio(s) de unión. Tanto los anticuerpos que compiten como los que presentan reactividad cruzada se contemplan en la presente. Independientemente del mecanismo mediante el cual la competición o competición cruzada de los anticuerpos ocurre, tal como mediante impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un sitio de unión, epítipo o fragmento de estos, común y similares, en la presente se engloban tanto los anticuerpos que compiten como los que presentan reactividad cruzada y pueden ser útiles en

los métodos divulgados.

El término “mejorar” en relación con los tratamientos descritos en la presente se refiere a mermar, reducir, disminuir, suprimir, atenuar, anular, detener, inhibir, bloquear, neutralizar o estabilizar el desarrollo o evolución de una enfermedad o afección, tal como la fibrosis en células y/o tejido renales (fibrosis renal).

Las “integrinas”, como se denominan en la presente, son glucoproteínas de la superficie celular que son los receptores principales utilizados por las células de mamíferos para unirse a la matriz extracelular y mediar en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Son heterodímeros (que tienen las subunidades α y β unidas de manera no covalente entre sí) y funcionan como conectores transmembrana entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina de las células. Las proteínas integrina no funcionan como un pegamento pasivo, más bien son moléculas dinámicas que median en la transferencia de información a través de la membrana celular en ambas direcciones. La adhesión mediada por integrinas puede regularse en respuesta a las señales mediante la agrupación y cambios conformacionales desencadenados en las colas citoplasmáticas de las integrinas, que funcionan como transductores de señales para activar diversas rutas de señalización intracelular cuando son activadas por la unión al ligando. Además, la señalización de integrinas controla la supervivencia celular, evolución del ciclo celular y diferenciación. La regulación de las estructuras de adhesión mediada por integrinas es crucial para muchas formas de migración celular. Las integrinas también contribuyen a la patogénesis de un conjunto diverso de enfermedades adquiridas y hereditarias.

Existen varios miembros de la familia de proteínas integrina, algunos de los cuales tienen una amplia distribución tisular. En los vertebrados están presentes aproximadamente veinticuatro integrinas diferentes; una única célula puede expresar múltiples tipos diferentes de receptores de integrina en su superficie. La subunidad $\beta 8$ de la integrina humana, que está codificada por el gen *ITGB8*, tiene ligandos que incluyen la fibronectina y las isoformas TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$. En combinación con MT1-matriz de metaloproteinasas (MMP), la integrina $\alpha \nu \beta 8$ (un heterodímero que comprende una subunidad alfa-V ($\alpha \nu$) asociada con una subunidad beta-8 ($\beta 8$) como se describe adicionalmente más adelante) se expresa en la superficie celular e interacciona con y media en la activación de TGF- β latente en la matriz celular. La proteasa MT1 escinde TGF- β latente para liberar el polipéptido TGF- β maduro, activo. También se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno, otras proteasas, inflamación y cambio de pH son responsables de la liberación de un TGF- β activo.

“ $\alpha \nu \beta 8$ ” se refiere a un “receptor de integrina $\alpha \nu \beta 8$ ”, “integrina $\alpha \nu \beta 8$ ” o polipéptido de “integrina $\alpha \nu \beta 8$ ” o fragmento de este que tiene una identidad secuencial de al menos

aproximadamente un 85 %, o más, con la secuencia de aminoácidos de la integrina $\alpha\beta 8$ humana que se proporciona en la secuencia con referencia NCBI: NM_002214.2 y que tiene actividad y/o función $\alpha\beta 8$ como se expone más adelante. Como otras subunidades de integrina beta (β), $\alpha\beta 8$ humana contiene un péptido señal N-terminal, un dominio extracelular grande que incluye 4 repeticiones ricas en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal corto. $\alpha\beta 8$ tiene una masa molecular de aproximadamente 95 kD, que concuerda con la glucosilación sustancial del producto génico $\beta 8$ de 81 kD predicho. (M. Moyle *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266:19650-19658). El análisis por transferencia Northern ha revelado que la $\alpha\beta 8$ humana se expresa como un ARNm de aproximadamente 8.5 kilobases (kb) en una línea celular de osteosarcoma. Cuando se expresa en células de mamífero, la subunidad de integrina $\beta 8$ se asocia con la subunidad alfa-V (αV) para formar un complejo de integrina $\alpha\beta 8$ en la superficie celular. En una realización particular, el polipéptido es integrina $\alpha\beta 8$ humana. El término “ $\alpha\beta 8$ ”, tal como se utiliza en la presente, es sinónimo de “receptor de integrina $\alpha\beta 8$ ”, “integrina $\alpha\beta 8$ ” e “integrina- $\alpha\beta 8$ ”. La denominación “*itgb8*” se refiere típicamente a la secuencia génica humana de la subunidad $\beta 8$.

La secuencia proteica de la integrina $\beta 8$ humana (utilizada indistintamente con los términos ITGB8, integrina beta-8, integrina $\beta 8$, $\beta 8$ y términos similares) se puede localizar con el número de acceso Uniprot P26012 o la secuencia con la referencia NCBI: NM_002214.2, de la siguiente manera:

```

MCGSALAFFTAAFVCLQNDRRGPAFLWAAWVFSVLGLGQGEDNRCASSNAASCARCL
ALGPECGWCVQEDFISGGSRSERCDIVSNLISKGCSVDSIEYPSVHVIIPTENEINTQV
TPGEVSIQLRPGAEANFMLKVHPLKKYPVDLYYLVDVSASMHNIEKLNSVGNLDSRKM
AFFSRDFRLGFGSYVDKTVSPYISIHPERIHNQCSVDYNLDCMPPHGYIHVLSLTENITE
FEKAVHRQKISGNIDTPEGGFDAAMLQAAVCESHGWRKEAKRLLVMTDQTSHLALDSK
LAGIVVPNDGNCHLKNVYVKSTTMEHPSLGQLSEKLIDNNINVIFAVQGKQFHWYKDL
LPLLPGTIAGEIESKAANLNNLVVEAYQKLISEVKVQVENQVQGIYFNITAICPDGSRK
PGMEGCRNVTNDEVLFNVTVTMKKCDVTGGKNYAIKPIGFNETAKIHIHRNCSCQCE
DNRGPKGKCVDETFLDSKCFQCDENKCHFDEDQFSSESCKSHKDQPVCSGRGVCVCGKC
SCHKIKLGKVGKYCEKDDFSCPYHHGNLCAGHGECEAGRCQCFSGWEGDRCQCPSAAA
QHCVNSKGVQVCSGRGTCVCGRCECTDPRSIGRFCEHCPTCYTACKENWNCMQCLHPHNL
SQAILDQCKTSCALMEQQHYVDQTSECFSSPSYLRIFFIIVTFLIGLLKVLIRQVI
LQWNSNLIKSSSDYRVSASKKDKLILQSVCTRAVTYRREKPEEIKMDISKLNHETFRCL
NF (SEQ ID NO: 16).

```

La secuencia codificante polinucleotídica de *itgb8* para la integrina $\beta 8$ humana se presenta a continuación (secuencia de ácido nucleico ARNm de *itgb8* de 8787 pb). La secuencia

polinucleotídica de la integrina $\beta 8$ humana se puede localizar con el número de acceso: secuencia con referencia NCBI: NM_002214.2. Un polinucleótido o un fragmento de este que tiene una identidad secuencial nucleotídica de al menos aproximadamente un 85 % o superior con la secuencia polinucleotídica de *itgb8* que codifica el polipéptido integrina $\beta 8$ humana está englobado por la divulgación.

```

5      1 ggcggtgct tctagggcg tccagagcc gcctcccct gttgctggca tcccagctt
      61 cctccctgc cagccaggac gctgccgact tgtcttgcc cgctgctcg cagacggggc
      121 tgcaaagctg caactaatgg tgtggcctc cctgccacc tgtggaagca actgcgctga
      181 ttgatgcgcc acagactttt tcccctcga cctcgccggc gtcccctcc acagatccag
10     241 catcaccag tgaatgtaca ttaggggtgt tcccccca gcttcgggtt ttgttgggt
      301 ttgatttgt ttgctcttc gtaagctga ttatgcagc agaagcccca ccggctggag
      361 agaaacaaaa gctctttct ttgtcccga gcaggctgcg gagccctgc agagccctt
      421 ctccagtcgc cgccggggcc ctggccgct gaaggagggtg ctctcgcg agaccgctgg
      481 acccgccgtg ccgagccggg agggccgcag gggccctgag atgccgagcg gtgccggggc
15     541 ccgcttacct gcaccgctt ctccgagccg cggggtcgc ctgctaggcc tgcgaaaaac
      601 gtcctagcga cactcgccc gggggcccg aggtgcgcc gggaggcgcg agcccgctc
      661 cggaaggcag tcaggcgcg ggcgggggc gggctgttt gcattatgt cggtcggcc
      721 ctggctttt ttaccgctgc attgtctgc ctgcaaacg accggcgagg tccgcctcg
      781 ttctctggg cagctgggt gtttcaact gttctggac tggccaagg tgaagacaat
20     841 agatgtgcat cttcaaatgc agcatcctgt gccagggtgc ttgcgtggg tccagaatgt
      901 ggatggtgtg ttaagagga ttcatctca ggtgatcaa gaagtgaac ttgtgatatt
      961 gttccaatt taataagca aggctgtca gttgattca tagaataccc atctgtgat
      1021 gttataatac ccactgaaa tgaaattaat acccaggta caccaggaga agtgtctatc
      1081 cagctgcgtc caggagccga agctaattt atgctgaaag tcatcctc gaagaaatat
25     1141 cctgtggatc ttattatct tttgatgtc tcagcatcaa tgcacaataa tatagaaaaa
      1201 ttaaattccg ttgaaaacga ttatctaga aaaatggcat ttttcccg tgacttctg
      1261 ctggatttg gtcatacgt tgataaaaca gttcacca acattagcat ccacccgaa
      1321 aggattcata atcaatgcag tgactacaat ttgactgca tgctcccca tggatacatc
      1381 catgtgctgt cttgacaga gaacatcact gagttgaga aagcagttca tagacagaag
30     1441 atctctggaa acatagatac accagaagga ggtttgacg ccatgctca ggcagctgc
      1501 tgtgaaagtc atatcggtg gcgaaaagag gctaaaagat tgctgctggt gatgacagat
      1561 cagacgtctc atctcgctc tgatagcaa ttggcaggca tagtggtgcc caatgacgga
      1621 aactgtcatc tgaaaaacaa cgtctatgc aaatcgacaa ccatggaaca cccctacta
      1681 ggccaacttt cagagaaatt aatagacaac aacattaatg tcatcttgc agttcaagga
35     1741 aaacaatttc attggtataa ggaatttcta cccctctgc caggcacca ttgctggtgaa

```

1801 atagaatcaa aggctgcaaa cctcaataat ttggtagtgg aagcctatca gaagctcatt
 1861 tcagaagtga aagttcaggt ggaaaaccag gtacaaggca tctattttaa cattaccgcc
 1921 atctgtccag atgggtccag aaagccaggc atggaaggat gcagaaacgt gacgagcaat
 1981 gatgaagttc tttcaatgt aacagttaca atgaaaaaat gtgatgtcac aggaggaaaa
 5 2041 aactatgcaa taatcaaacc tattggtttt aatgaaaccg ctaaaattca tatacacaga
 2101 aactgcagct gtcagtgtga ggacaacaga ggacctaaag gaaagtgtgt agatgaaact
 2161 tttctagatt ccaagtgttt ccagtgtgat gagaataaat gtcattttga tgaagatcag
 2221 ttttctctg agagttgcaa gtcacacaag gatcagcctg ttgcagtggt tcgaggaggt
 2281 tgtgtttgtg ggaaatgttc atgtcacaaa attaagcttg gaaaagtgtg tggaaaatac
 10 2341 tgtgaaaagg atgacttttc ttgtccatat cccatggaa atctgtgtgc tgggcatgga
 2401 gagtgtgaag caggcagatg ccaatgcttc agtggctggg aaggatgatc atgccagtc
 2461 ccttcagcag cagcccagca ctgtgtcaat tcaaagggcc aagtgtgcag tgaagaggcc
 2521 acgtgtgtgt gtggaagggtg tgagtgcacc gatcccagga gcatcggccg cttctgtgaa
 2581 cactgcccc cctgttatac agcctgcaag gaaaactgga attgtatgca atgcctcac
 15 2641 cctcacaatt tgtctcaggc tatacttgat cagtgcacaaa cctcatgtgc tctcatggaa
 2701 caacagcatt atgtcgacca aacttcagaa tgtttctcca gccaagcta cttgagaata
 2761 ttttcatca tttcatagt tacattcttg attgggtgc ttaaagtcct gatcattaga
 2821 caggtgatac tacaatggaa tagtaataaa attaagtcct catcagatta cagagtgtca
 2881 gcctcaaaaa aggataagtt gattctgcaa agtgtttgca caagagcagt cacctaccga
 20 2941 cgtgagaagc ctgaagaaat aaaaatggat atcagcaaat taaatgtcga tgaaacttcc
 3001 aggtgcaact tcaaaaaaaaa gatttttaa cacttaatgg gaaactggaa ttgtaataa
 3061 ttgtcctaa agattataat tttaaaagtc acaggaggag acaaattgct cacggatcatg
 3121 ccagttgctg gttgtacact cgaacgaaga ctgacaagta tctcatcat gatgtgactc
 3181 acatagctgc tgacttttc agagaaaaat gtgtcttact actgtttgag actagtgtcg
 25 3241 ttgtagcact ttactgtaat atataactta tttagatcag catagaatgt agatcctctg
 3301 aagagcactg attacacttt acaggtacct gttatcccta cgctcccag agagaacaat
 3361 gctgtgagag agtttagcat tgtgtcacta caagggtaca gtaatccctg cactggacat
 3421 gtgaggaaaa aaataatctg gcaagtatat tctaagggtg ccaaacactt caacagttgg
 3481 tgggtgaata gacaagaaca gctagatgaa taaatgattc gtgtttcact cttcaagag
 30 3541 gtgaacagat acaaccttaa tcttaaaaga ttattgcttt taaagtgtg tagttttatg
 3601 catgtgtgtt tatggtttgc ttatttttgc aagatggata ctaattccag cattctctcc
 3661 tctttgcctt tatgtttgt tttctttt acaggataag ttatgtatg tcacagatga
 3721 ctggattaat taagtgctaa gttactactg ccataaaaaa ctaataatac aatgtcactt
 3781 tatcagaata ctagttttaa aagctgaatg ttaatagggg acactgtaa gtatcatcaa
 35 3841 aacctgaata gcttcattgt gcacaagtgt ggagttttgt atcctcttac ctggtaaact

3901 gaagggattg ttggccatt tcatttatct tatcattaat tcacaagata gttagaaatt
 3961 ctgcctcaag caaagtagca catTTTgaat gTTTcttag atTTtgattg caagtagata
 4021 tcagcatttt ttaaatgaaa agctatatta tcttccct tcaaggcagc ctaaggatgt
 4081 tcttcccag aatcactcca acccttcttg ccagaattca taaaagtaca aaattggaga
 5 4141 atagatgata tcttagaaat aagctTTTT tTTTTttg agacggagtt
 4201 tcactctgt caccagggt gaagtgaat ggcgaatta gggttcactg caacctctgc
 4261 cttccgggt caagcagtc tctgcctca gcctctgag tagctgggat tacaggcatc
 4321 caccaccgtg cccagctaatt tttgtattt ttagtagaga cggggTTTT ccatgttga
 4381 caggtgatc taaaactct gacctagggt gatctaccct cctcgccctc ccagagtgtt
 10 4441 gggattacag gcatgagcca ccatgccagg ctgctaattc tctTTTTtag tgagttaggg
 4501 aactgagcct cagaaaactt aaacgatttc tcagaaaaca ctcaagtgat aaagtggcca
 4561 cattggaaag gagTTTTat ctctcattg tcaggccagt gttcattgca caatatcatg
 4621 ctacctctg aatctttaa atattcaatt ggcaaatgtt ttcaatgtg atttactcat
 4681 gtcttaagt tatgaggaaa gttcaaagca aaatagaaag gaataattca aactgaattg
 15 4741 tccataatca gctccagtc ttcatgcta atcagcttct taagagactg aagtatggca
 4801 tacctacagg ggaattcctt cgcacatag cctgtatgaa cagtgtccc tggagttctc
 4861 cagtgtcag ctgagacct gtatacagg gccatgagcc ctgtctccc caatggaaat
 4921 ttatttacac ttacctatc cctatggact tagtctgatt ttattggcta ggagtctaac
 4981 agtctgtgt ggatatacag tttgccat gacaacaaag gaatctatcc gaaatatctt
 20 5041 tttttata ataaactcc aagatttct gtctccagc acttgagta aagtactaga
 5101 tactgcattt tgatgaagac taacccatc tcatattcta ccctaaagag aactgaaaa
 5161 cctataataa gttgttctg agccaataa cacagcagct ctgttagatg tctctacag
 5221 ccaagcactt tcaatgctaa ctgaactgc atttcttcc tcaaatgaga gattgacata
 5281 attcagtact gtgagtcact tgtataagaa accttgatc actaaaaata atgtaaaaat
 25 5341 tgggtttagt agcctaatac acataacgtt ctcttaaaa aggaaaatgg atggatgcct
 5401 gacaaccctc caaaagaaaa aagtgtgaag tagccattaa gatgatgaca attttgaaa
 5461 tgaacattat gatatttatg aacaataaac aaatttccgt atggaatgaa ttatccaaaa
 5521 agagtataac aaaatgaaat ccttaaaaa ccagagtta tttttttt ataccctcac
 5581 ttgttgcac taacttata gtggaccaag gctgtacca taggaaggga caaacttct
 30 5641 tgtaggcaac tcagtgttag acgatgattg tggttatgct tgcaaagtct tgtgcttatc
 5701 tttttgtt ttacttaaaa agctaattt taaagattgt agggcttcta tttacttga
 5761 ataattgata tcttctgtg taatgattg tgagatgaga attaatatt gactagttag
 5821 aattaattaa atggtagggt aacacagggt actcttaggt taaataatgt atgcaaatag
 5881 agtctattt caactaatat ggccacagga gcctttgag attcattgat attaaacaca
 35 5941 attaatgaaa ttttaattg ttaacagaat tgagaactg aacaacactt ttagtactgc

6001 agcatttttg tgccctaaag tatgtaatga ttataaatg tgccatacat aactacaac
 6061 ataacatttg cttgttatg cattttatt ctctggggac accattgcac tgcagtgcac
 6121 acgtatttat aaacatttgt tatattttg gaaacttgct aatatttatt aagtcataga
 6181 cttttctgga ggacttaaaa attcactaaa aatctgatta tgtcttaaat gttcagttta
 5 6241 tctttgggtt attaaaataa aaaaaaaatc taagattaaa cacagtagat atctctggag
 6301 gcaattttcc aaaactcaac attaaaattt gtggatgcat gagatgcaat ccttcaaaga
 6361 atgaatctga aatatatttt taatatttac ttaatatcca ctgaagatat ctttatgcaa
 6421 gacaagagtc agccatcaga cactgaaata tattatgata gattatgaag aattttctct
 6481 gtagaattat attcttctg gaacctggta gagtagatta gactcaaagg cttttcttc
 10 6541 cttttcttac tctgtttt tccactcact ctcccaaga gatttcctaa agcttcaagc
 6601 ttaataagcc taatagtga aaataactga attaatggt ataataaggt tottcatttc
 6661 cagacatctt taattgatct taaagctcat ttgagcttt gccctgaac aaagacagac
 6721 ccataaaaat ctaagaattc taaatttca caactgttg agcttcttt cattttgaag
 6781 gatttgaat atatatgtt tcataaaaagt atcaagtga atagttac atgggagctc
 15 6841 aatcatgtgc agattgcatt ctgttatgt gactcaatat ttaatttaca actatcctta
 6901 ttatattga cctcaagaac tccattttat gcaatgcaga cactgagat atagctaaca
 6961 ttcttcaaaa taattttct tttctttat aattcctcta tagcaaattt ttatgtataa
 7021 ctgattatac atatccatat ttatatttca ttgattcaa gacatcactt ttcaattta
 7081 acatctctga aatttgaca ttcttgcaa ctgttggcac ttcagatgca gtgttataaa
 20 7141 ttatgcttga ataaatatta cactaatcca actttaccta aatgtttatg catctaggca
 7201 aattttgtt tcttataaag atttgagagc ccatttatga caaaatatga aggcgaatt
 7261 taaggacaac tgagtcacgc acaactcaac atggagccta actgattatc agctcagatc
 7321 ccgcatactt tgagtttaca aaagctctt caggccccca ttatacttt acgtgagtg
 7381 gaatgatttc agcaaacctt aacttaacta acaagaatgg gtaggtatgt ctacgtttca
 25 7441 ttaacaaatt ttattattt ttattctatt atagagatc cttttatatt atcatctcac
 7501 ttttaacaa aattaaactgg aaaaatatta catggaactg tcatagttag gttttgcagc
 7561 atcttacatg tctgtatca atggcaggag aaaaatatga taaaacaat cagtgtctgt
 7621 aaaaacaact ttctctaga gtctcttac ttttattct tctttatcat ttgtgggtt
 7681 tcccccttg gctctgatca cttaacttc aagcttatgt aacgactgtt ataaaactgc
 30 7741 atatttaa atttgaatt atagaaata atgttcagc tatctgggca gctgttaag
 7801 taaacctgag agtaataaca ctactcttt atctacctgg aatactttc tgcataaaa
 7861 ttatcttgt aagctaactc tattaatcag gtttctcta gccttgcaa cctacttcag
 7921 ttagaattgt ctaatactgc tctattaatc aggtttctag cctctacaac ctacttcagt
 7981 taaaattgtc taatacagca atattfaaaa aaaaaaact gcaattgtca aggatggaaa
 35 8041 atgtgtgatt tgtgtaaaca attttacca actttacatt ttctacaga taaatgtga

8101 attttgataa gaagtctacg caatgacaag tatggtacat aaattttatt aagaatattg
 8161 agtataaagt actttaattc taaattataa gaaaatatac attgcacat attaataatag
 8221 aaattcattt tgtgtatatt taacatagct tttaaactat ttacattag ctacttcatt
 8281 atggtttctt gaacttctga aaaaaattag aaatgtatta aacttatcag taacataaaa
 5 8341 acttattttg tttcacctaa cgaatactgc gtttgtaaaa ataaatttaa tatagaatat
 8401 atttttaa ataatatttg aatataaaat agctctaaga aagaagcaaa ttactactga
 8461 acatatttct tattatttct ggcttgaat tatacgtaac ttaaattgtc ttaaataata
 8521 cagaatattg gagaatatga tactttcaca taatatacta tgaacctgtt catataactc
 8581 tgattgacta ctaacttctg tttatgtat ttattaaaga gctgacactg tagtttggg
 10 8641 tgagatgttt atttttctaa cagagcttat aacagttagg acaaggcatt taattaatgc
 8701 atcattctgt ttagtagtag gtgttaatca atatgaaatt ctctgtttta aaataaaaaat
 8761 gtaaaaatct aagaataaaa aaaaaaa (SEQ ID NO: 17)

La subunidad alfa-V de la integrina (α -V, ITGAV) (también denominada alfa-V y α v) se asocia con cualquiera de las subunidades β -1 (ITGB1), β -3 (ITGB3), β -5 (ITGB5), β -6 (ITGB6) o β -8 (ITGB8), y forma un heterodímero de una subunidad alfa (α v) y una beta (β 1-8). La subunidad alfa está compuesta por una cadena pesada (cadena pesada de α -V de integrina) y una ligera (cadena ligera de α -V de integrina) ligadas por un enlace disulfuro. En una realización particular, la subunidad α v de integrina se asocia con la subunidad β 8 de integrina, y forma la integrina α v β 8. La α -V humana (ITAV), que se puede asociar con β -8 (ITGB8) como se ha expuesto anteriormente, comprende 1040 aminoácidos y se puede localizar en Uniprot (UniProtKB) N.º de acceso P06756, como se presenta a continuación:

	10	20	30	40	50	
	MAFPpRRRLR LGPRGLPLLL SGLLLPLCRA FNLDVDSPAE YSGPEGSYFG					
	60	70	80	90	100	
25	FAVDFFVPSA SSRMFLLVGA PKANTTQPGI VEGGQVLKCD WSSTRRCQPI					
	110	120	130	140	150	
	EFDATGNRDY AKDDPLEFKS HQWFGASVRS KQDKILACAP LYHWRTMKQ					
	160	170	180	190	200	
	EREPVGTCFL QDGTKTVEYA PCRSQDIDAD GQGFCQGGFS IDFTKADRLV					
30	210	220	230	240	250	
	LGGPGSFYWQ GQLISDQVAE IVSKYDPNVY SIKYNNQLAT RTAQAIFFDS					
	260	270	280	290	300	
	YLGYSVAVGD FNGDGIDDFV SGVPRAARTL GMVYIYDGKN MSSLYNFTGE					
	310	320	330	340	350	
35	QMAAYFGFSV AATDINGDDY ADVFIGAPLF MDRGSDGKLQ EVGQVSVSLQ					

360 370 380 390 400
 RASGDFQTTK LNGFEVFARF GSAIAPLGDL DQDGFNDIAI AAPYGGEDKK
 410 420 430 440 450
 GIVYIFNGRS TGLNAVPSQI LEGQWAARSM PPSFGYSMKG ATDIDKNGYP
 5 460 470 480 490 500
 DLIVGAFGVD RAILYRARPV ITVNAGLEVY PSILNQDNKT CSLPGTALKV
 510 520 530 540 550
 SCFNVRFLK ADGKGVLPK LNFQVELLLD KLKQKGAIRR ALFLYSRSPS
 560 570 580 590 600
 10 HSKNMTISRG GLMQCEELIA YLRDESEFRD KLTPITIFME YRLDYRTAAD
 610 620 630 640 650
 TTGLQPILNQ FTPANISRQA HILLDCGEDN VCKPKLEVSV DSDQKKIYIG
 660 670 680 690 700
 DDNPLTLIVK AQNQGEGAYE AELIVSIPLQ ADFIGVVRNN EALARLSCAF
 15 710 720 730 740 750
 KTENQTRQVV CDLGNPMKAG TQLLAGLRFS VHQQSEMDTS VKFDLQIQSS
 760 770 780 790 800
 NLFDKVSPVV SHKVDLAVLA AVEIRGVSSP DHVFLPIPWN EHKENPETEE
 810 820 830 840 850
 20 DVGPVVQHIY ELRNNGPSSF SKAMLHLQWP YKYNNTLLY ILHYDIDGPM
 860 870 880 890 900
 NCTSDMEINP LRIKISSLQT TEKNDTVAGQ GERDHLITKR DLALSEGDIH
 910 920 930 940 950
 TLGCGVAQCL KIVCQVGRLD RGKSAILYVK SLLWTETFMN KENQNHSSYL
 25 960 970 980 990 1000
 KSSASFNVIE FPYKNLPIED ITNSTLVTTN VTWGIQPAPM PVPVWVILA
 1010 1020 1030 1040
 VLAGLLLLAV LVFVMYRMGF FKRVRPPQEE QEREQLQPHE NGEENSET (SEQ ID
 NO: 18)

30 La secuencia codificante polinucleotídica que codifica la alfa-V humana (ITGAV) se
 presenta a continuación (3147 pb nucleotídicas). La secuencia polinucleotídica de la integrina
 αv humana (CCDS 2292.1) se puede localizar con el número de acceso: secuencia con
 referencia NCBI: NM_002210.4. Un polinucleótido o un fragmento de este que tiene una
 identidad secuencial nucleotídica de al menos aproximadamente un 85 % o superior con la
 35 secuencia polinucleotídica de la integrina αv (ITGAV) que codifica la integrina ITGAV humana

está englobada por la divulgación.

atggctttccgccgcccgcggcgacggctgcgcctcgggtcccgccggtcccgcttctctcgggactcc
 tgctacctctgtgccgcgcttaacctagacgtggacagtcctgccgagtactctgccccgaggggaag
 ttacttcggcttcgccgtggaatttctcgtgccagcgcttcccggtggttctctcgtgggagct
 5 cccaaagcaaacaccaccagcctgggattgtggaaggagggcaggtcctcaaattgactggtcttcta
 cccgcccgtgccagccaattgaattgatgaacaggcaatagagattatgccaaggatgatccattgga
 atttaagtcccatcagtgggttgagcatctgtgaggtcgaaacaggataaaatttggcctgtgcccc
 ttgtaccattggagaactgagatgaaacaggagcgagagcctgttggaacatgcttctcaagatggaa
 caaagactgttgagtatgctccatgtagatcacaagatattgatgctgatggacagggatttgtcaagg
 10 aggttcagcattgatttactaaagctgacagagtactcttgggtgctggttagcttttattggcaa
 ggtcagcttatttcggatcaagtggcagaaaatcgatatcctaatacgaccccaatgtttacagcatcaagt
 ataataaccaattagcaactcggactgcacaagctattttgatgacagctatttgggttattctgtggc
 tgtcggagatttcaatggtgatggcatagatgacttgtttcaggagttccaagagcagcaaggacttgg
 ggaatgggttatatttatgatgggaagaacatgtcctcctatacaattttactggcgagcagatggctg
 15 catatttcggatttctgtagctgccactgacattaatggagatgattatgcagatgtgttattggagc
 acctctctcatggatcgtggctctgatggcaaacctccaagaggtggggcaggtctcagtgctctacag
 agagcttcaggagacttcagacgacaaaagctgaatggatttgaggtctttgcacggttggcagtgcca
 tagctccttgggagatctggaccaggatggttcaatgatattgcaattgctgctccatatgggggtga
 agataaaaaaggaattgtttatatctcaatggaagatcaacaggcttgaacgcagtcctcatctcaaatc
 20 ctggaagggcagtggtgctcgaagcatgccaccaagcttggctattcaatgaaaggagccacagata
 tagacaaaaatggatatccagacttaattgtaggagcttttgggtgatcgagctatctatacagggc
 cagaccagttatcactgtaaatgctggtcttgaagtgtaccctagcattttaaataagacaataaaacc
 tgctcactgcctggaacagctctcaaagtttctgtttaaattgtaggttctgcttaaaggcagatggca
 aaggagtaactcccaggaaaacttaattccagggtggaactcttttgataaactcaagcaaaaggagc
 25 aattcgacgagcactgtttctctacagcagggtcccaagtcactccaagaacatgactattcaagggg
 ggactgatgcagtgtaggaattgatagcgatatctgcgggatgaatctgaatttagagacaaactcactc
 caattactattttatggaatatcggttgattatagaacagctgctgatacaacaggcttgaacccat
 tcttaaccagttcacgctgtaacattagtcgacaggctcacattctacttgactgtggtgaagacaat
 gtctgtaaaccgaagctggaagtttctgtagatagtgatcaaaagaagatctatattggggatgacaacc
 30 ctctgacattgattgtaaggctcagaatcaaggagaagggtcctacgaagctgagctcatcggttccat
 tccactgcaggctgatttcatcggtgttccgaaacaatgaagccttagcaagacttctctgtgcattt
 aagacagaaaaccaaactcgccagggtgatgtgaccttgaaacccaatgaaggctggaactcaactct
 tagctggtctctgttctcagtggtgcaccagcagtcagagatggatacttctgtgaaattgactacaaat
 ccaaagctcaaatctatttgacaaagtaagccagttgtatctcacaagttgatcttgctgttttagct
 35 gcagttgagataagaggagtcgcagtcctgatcatgtcttctccgattccaaactgggagcacaagg

agaaccctgagactgaagaagatgttgggccagtgttcagcacatctatgagctgagaaacaatggtcc
aagttcattcagcaaggcaatgctccatcttcagtggccttacaataataataaacactctgtgtat
atccttcattatgatattgatggaccaatgaactgcacttcagatatggagatcaaccctttgagaatta
agatctcatctttgcaaacaactgaaaagaatgacacgggtgccgggcaaggtagcgaggaccatctcat
5 cactaagcgggatcttgcctcagtgaaggagatattcacactttgggtgtggagttgctcagtgtgtg
aagattgtctgccaagttgggagattagacagaggaaagagtgaatctgtacgtaaagtcattactgt
ggactgagactttatgaataaagaaaatcagaatcattcctattctgaagtcgtctgtcatttaa
tgtcatagagtttcttataagaatctccaattgaggatatcaccaactccacattggttaccactaat
gtcacctggggcattcagccagcgcccatgcctgtgcctgtgtgggtgatcatttagcagttctagcag
10 gattgtgtactaggctgttttggtatttgaatgtacaggatgggctttttaaacgggtccggccacc
tcaagaagaacaagaaagggagcagctcaacctcatgaaaatggtgaaggaaactcagaaacttaa (SEQ ID
NO: 19).

Un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado, denominado en la presente "MEDI-
hu37E1B5" es útil en las composiciones y métodos divulgados. El anticuerpo MEDI-hu37E1B5
15 tiene las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera que se
presentan a continuación. Este anticuerpo es específico y selectivo para su unión a la proteína
integrina $\alpha\beta 8$ que se expresa en las células y tejido renales y, más especialmente, que tiene
una expresión muy elevada en células y tejido renales enfermos, tales como tejido renal
fibrótico, en un sujeto que padece enfermedad renal tal como enfermedad renal crónica (CKD).
20 En una realización, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno
de este, que tiene una identidad secuencial aminoacídica de al menos aproximadamente o al
menos un 85 % o superior con las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena
pesada (V_H), (116 residuos aminoacídicos), y la región variable de la cadena ligera (V_L), (107
residuos aminoacídicos), del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$, que se
25 expone a continuación, está englobado por la divulgación.

Secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIINPDSS
TINYTSSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILITTEDYWGQGTTTVTVSS (SEQ
30 ID NO: 7)

Secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
SRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8)

35 En las secuencias de V_H y V_L anteriores del anticuerpo MEDI-hu37E1B5, las tres

regiones CDR (según las define Kabat) están subrayadas. Más específicamente, las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 son como sigue:

CDR1 de V_H : RYWMS (SEQ ID NO: 1)

5 CDR2 de V_H : EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2)

CDR3 de V_H : LITTEDY (SEQ ID NO: 3)

Las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 son como sigue:

CDR1 de V_L : KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 4)

10 CDR2 de V_L : YANRLVD (SEQ ID NO: 5)

CDR3 de V_L : LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 6)

También está englobada por la divulgación una secuencia polinucleotídica que codifica las regiones V_H y V_L del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ identificado anteriormente, o un fragmento de unión al antígeno de este. En una realización, una secuencia polinucleotídica que codifica las regiones V_H y V_L del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ mencionado anteriormente, o un fragmento de unión al antígeno de este que tiene una identidad secuencial nucleotídica de al menos aproximadamente o al menos un 85 % o superior con la secuencia de nucleótidos de MEDI-hu37E1B5 también está englobada por la divulgación.

20 Otro anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, denominado "B5-15" en la presente, es especialmente útil en las composiciones y métodos divulgados en la presente. El anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ es un anticuerpo humanizado y con optimización de la afinidad (del isotipo IgG1) que se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$ y tiene las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera que se presentan a continuación.

25 El anticuerpo humanizado B5-15 se derivó del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 descrito anteriormente y se optimizó la afinidad a partir de este, que es el "progenitor" del anticuerpo B5-15, como se describe en la presente. El anticuerpo B5-15 es sumamente específico y selectivo para su unión a la integrina $\alpha\beta 8$, especialmente la integrina $\alpha\beta 8$ expresada en las células y tejido renales y, más especialmente, la integrina $\alpha\beta 8$ que tiene una expresión muy elevada en

30 células y tejido renales enfermos, tales como tejido renal fibrótico, en un sujeto que padece enfermedad renal tal como enfermedad renal crónica (CKD). En una realización, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que tiene una identidad secuencial aminoacídica de al menos aproximadamente o al menos un 85 % o superior con las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H), (116 residuos aminoacídicos), y la región variable de la cadena ligera (V_L), (107 residuos aminoacídicos), del

35

anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$, que se expone a continuación, está englobado por la divulgación.

Secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado y optimizado:

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRSWISWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST
INYTSSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILITTEDYWGQGTTVTVSS (SEQ
 ID NO: 12)

Secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado y optimizado:

10 DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYDVFPYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 13)

En las secuencias de V_H y V_L anteriores del anticuerpo B5-15 humanizado y con optimización de la afinidad, las secuencias de aminoácidos de las tres regiones CDR (según las define Kabat) están subrayadas. Más específicamente, las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena pesada(V_H) del anticuerpo B5-15 son como sigue:

CDR1 de V_H : RSWIS (SEQ ID NO: 9)

CDR2 de V_H : EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2)

CDR3 de V_H : LITTEDY (SEQ ID NO: 3)

Las secuencias de aminoácidos de las tres CDR de la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo B5-15 humanizado y con optimización de la afinidad son como sigue:

CDR1 de V_L : KASQDINKYLS (SEQ ID NO: 10)

CDR2 de V_L : YANRLVD (SEQ ID NO: 5)

CDR3 de V_L : LQYDVFPYT (SEQ ID NO: 11)

También está englobada por la divulgación una secuencia polinucleotídica que codifica las regiones V_H y V_L del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ mencionado anteriormente, o un fragmento de unión al antígeno de este. A continuación se proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica la región V_H del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ optimizado:

30 gaggtgcagctggtgaaagcggcggaggactggtgcagcctggcggcagcctgagactgagctgcgccgtgtccgg
 cttcgtgttcagccggagctggatcagctgggtccgccaggccccagggcctggaatggatcgccgagatcaaccccgga
 cagcagcaccatcaactacaccagcagcctgaaggaccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaacagcctgtacctgc
 agatgaacagcctgcgggcccaggacccggtgtactactgcgccatcctcatcaccaccgaggactactggggccagggga
 ccaccgtgaccgtgtctct (SEQ ID NO: 14).

A continuación se proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica la región V_L (κ) del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ optimizado:

gacatccagctgacccagagccccagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggcc
agccaggacatcaacaagtacctgagctggtccagcagaagcccggaaggcccccaagagcctgatctactacgccaaccg
gctggtggacggcgtgcccagcagatttctggcagcggcagcggcaccgacttcaccctgaccatcagcagcctgcagcccag
gacttcgccacctactactgcctgcagtacgacgtgttcccctacaccttcggcggaggcaccaaggtggaaatcaag (SEQ ID
5 NO: 15).

En una realización, una secuencia polinucleotídica que codifica las regiones V_H y V_L del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ mencionado anteriormente, o un fragmento de unión al antígeno de este, que tiene una identidad secuencial nucleotídica de al menos aproximadamente o al menos un 85 % o superior con la secuencia de nucleótidos de B5-15
10 también está englobada por la divulgación.

La citocina, factor de crecimiento transformante beta (β), (TGF- β), es un regulador multifuncional que modula la proliferación, diferenciación, apoptosis, adhesión y migración celulares de varios tipos de células. TGF- β induce la producción de proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) y casi todos los tipos de células, por ejemplo,
15 linfocitos T y B activados, células hematopoyéticas, macrófagos, células dendríticas, producen TGF- β y/o son sensibles a sus efectos. (S. Dennler *et al.*, 2002, *J. Leukoc. Biol.*, 71:731-740). TGF- β es un miembro de una superfamilia diversa que incluye más de 30 miembros relacionados en mamíferos, a saber, 3 isoformas de TGF- β , 4 activinas y más de 20 proteínas morfogénicas óseas (BMP, por sus siglas en inglés). Las 3 isoformas de mamíferos de TGF- β
20 (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ y TGF- $\beta 3$) comparten una homología de un 70-82 % a nivel de aminoácidos y tienen actividades cualitativamente similares en diferentes sistemas. La forma activa de TGF- β es un dímero estabilizado por interacciones hidrófobas, que están fortalecidas en mayor medida por un puente disulfuro entre subunidades, en la mayoría de los casos. La isoforma TGF- $\beta 1$ es la isoforma más abundante en las células renales.

El mecanismo mediante el cual TGF- β inicia la señalización intracelular en la membrana celular, por lo general, se comprende bien. Véase, por ejemplo, I. Loeffler y G. Wolf, 2013, *Nephrol. Dial. Transplant*, 29:i37-i45). Los mediadores intracelulares de la señalización de TGF- β se denominan Smads, los cuales actúan después del receptor TGF- β de tipo 1, T β R-1, y que se categorizan en tres clases. Los Smad regulados por el receptor (R-Smads), por ejemplo,
30 Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8, que son fosforilados y activados directamente por T β R-1 (que es un receptor serina/treonina-cinasa transmembrana), forman complejos heterooligoméricos con una segunda clase de Smad, los Smad mediadores comunes (Co-Smad), por ejemplo, Smad4. Estos complejos Smad se translocan al interior del núcleo donde interaccionan con factores de transcripción de ADN específicos del sitio y participan en la
35 regulación de genes diana. Smad2 y Smad3 responden a la señalización por parte de la

subfamilia de TGF- β . Una tercera clase identificada de Smad incluye los Smad inhibidores Smad6 y Smad7, que ejercen un efecto antagonista en la actividad de los Smad regulados por el receptor al interaccionar físicamente con el receptor T β R-1 activado y pueden evitar el acoplamiento y fosforilación de los R-Smad. En virtud de sus efectos pleiotrópicos, TGF- β también puede activar directamente otras cascadas de transducción de señales, incluidas las vías MAPK, tales como Ras, Raf, Erk, JNK y p38, además de la transcripción mediada por Smad. Además, TGF- β puede activar la cascada de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3K) mediante la fosforilación de su efector Akt, así como también GTPasas de tipo Rho, que incluyen RhoA, Rac y cdc42.

TGF- β es sintetizado por varios tipos de células renales y ejerce sus efectos biológicos (y patofisiológicos) a través de las vías de señalización mencionadas anteriormente. TGF- β presenta un aumento regulado en las enfermedades renales e induce a las células renales a producir proteínas de la matriz extracelular, que conlleva glomerulosclerosis y fibrosis túbulointersticial (TI), que se caracteriza por una deposición progresiva y perjudicial de tejido conectivo en el parénquima renal y es un proceso dañino, que da lugar al deterioro de la función renal. Diferentes tipos de células renales experimentan diferentes cambios patofisiológicos inducidos por la actividad de TGF- β , que da lugar a la apoptosis, hipertrofia tisular y anomalías de procesos del pie de los podocitos, que en última instancia provocan disfunción renal.

Tal como se utilizan en la presente, los términos “determinación”, “evaluación”, “valoración”, “ensayo”, “medición” y “detección” e “identificación” se refieren tanto a determinaciones cuantitativas como cualitativas y, como tal, el término “determinación” se utiliza en la presente indistintamente con “ensayo” “medición” y similares. Cuando se pretende una determinación cuantitativa, se utiliza la frase “determinación de una cantidad, nivel o concentración” de un analito, sustancia, proteína y similares. Cuando se pretende una determinación cualitativa y/o cuantitativa, se utiliza la frase “determinación de un nivel” de un analito o “detección” de un analito.

“Enfermedad” se refiere a cualquier afección o trastorno que dañe, interfiera con o desregule la función normal de una célula, tejido u órgano. Las enfermedades del riñón y asociadas con este, a las que se hace referencia en la presente incluyen, a modo de ejemplo no limitante, nefropatía diabética (DN), enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal aguda, enfermedad renal asociada a la hipertensión, enfermedad renal asociada a la hiperglucemia, fibrosis renal, enfermedad renal asociada a la inflamación, enfermedad renal terminal (ESRD), fibrosis renal asociada a la autoinmunidad (por ejemplo, nefritis lúpica) y fibrosis tras el trasplante de riñón y similares. Tales enfermedades, afecciones, patologías y/o síntomas de estas asociados con el riñón pueden ser agudas o crónicas en un sujeto y no se

pretende que sean limitantes.

En términos generales, la “fibrosis” es la formación de un exceso de tejido conectivo en un órgano o tejido que puede ocurrir como resultado de un proceso reactivo (por ejemplo, respuesta a la lesión; enfermedad) o reparativo. La fibrosis puede ocurrir en un estado reactivo, benigno o patológico. En respuesta a la lesión, la fibrosis se puede denominar formación de cicatrices. La formación de cicatrices renales da como resultado una pérdida progresiva de la función renal, que en última instancia da lugar a insuficiencia renal terminal y necesidad de diálisis o trasplante de riñón.

La fibrosis renal es la consecuencia inevitable de una acumulación excesiva de matriz extracelular que se produce virtualmente en cada tipo de enfermedad renal crónica. La patogénesis de la fibrosis renal es un proceso progresivo que en última instancia da lugar a la enfermedad/insuficiencia renal terminal, un trastorno terrible que requiere diálisis o trasplante de riñón. En general, la fibrosis renal representa un proceso de curación de heridas fallido del tejido renal después de una lesión o daño crónico y sostenido. Se han identificado varias vías celulares, incluidas la activación de células fibroblásticas y mesangiales, así como también la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), como las vías principales en las que las células productoras de la matriz son producidas en condiciones de enfermedad. (Véase, por ejemplo, Y. Liu, 2006, *Kidney Int.*, 69(2):213-217).

Entre los muchos factores fibrogénicos que regulan el proceso fibrótico renal, TGF- β desempeña una función fundamental. Aunque la degradación defectuosa de la matriz puede contribuir a la formación de cicatrices en el tejido, la acción y mecanismos exactos de las enzimas que degradan la matriz en el riñón lesionado son complejos y no se entienden completamente. La intervención en las actividades de factores antifibróticos endógenos puede proporcionar estrategias para ejercer un efecto antagonista en la acción fibrogénica de las vías de señalización TGF- β /Smad.

Los “podocitos” son células epiteliales sumamente especializadas en la cápsula de Bowman en los riñones que envuelven los capilares de los glomérulos. Son los procesos o proyecciones del pie de los podocitos los que envuelven los capilares y producen las rendijas de filtración (o diafragmas en rendija) a través de las cuales se filtran la sangre y los componentes de la sangre. La cápsula de Bowman filtra la sangre y retiene las moléculas de peso molecular más elevado (por ejemplo, proteínas) a la vez que filtra las moléculas con un peso molecular menor (por ejemplo, agua, sales, azúcares) como el primer paso en la formación de la orina. Junto con las células endoteliales del asa capilar glomerular y la membrana basal glomerular, los podocitos forman una barrera de filtración. Los podocitos y las células mesangiales del riñón sustentan la estructura y función del glomérulo.

El “glomérulo” en el riñón es una red o agrupación de capilares, denominado un ovillo, situado dentro de un saco similar a una taza (cápsula glomerular) ubicado en el extremo de cada túbulo renal (nefrona) y participa en la filtración de la sangre. La composición de la pared del capilar glomerular determina qué y cuánto se filtra al interior de la cápsula glomerular. Las paredes de los capilares están compuestas por una capa endotelial que tiene poros relativamente grandes a través de los cuales pueden pasar solutos, proteínas plasmáticas y fluidos, pero no las células sanguíneas; una capa de la membrana basal, que está fusionada con la capa endotelial y que evita que las proteínas plasmáticas sean filtradas y eliminadas de la sangre; y una capa epitelial, que está constituida por podocitos que están unidos a la membrana basal por sus procesos del pie. El fluido pasa a través de las rendijas de filtración formadas por los podocitos. Un diafragma delgado entre las rendijas actúa como una barrera de filtración final antes de que el fluido entre en el espacio glomerular.

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren a un material que está exento en grados variables de componentes que normalmente lo acompañarían cuando se encuentra en su estado nativo. “Aislado” denota un grado de separación de la fuente o entorno original. “Purificar” denota un grado de separación que es mayor que el aislamiento. Una proteína “purificada” o “biológicamente pura” está sustancialmente exenta de otros materiales de modo que cualesquiera impurezas no afectan materialmente a las propiedades biológicas de la proteína o provocan otras consecuencias adversas. Es decir, según se utiliza en la presente, un ácido nucleico o péptido está purificado si está sustancialmente exento de material celular, contaminantes virales, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos, u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La pureza y homogeneidad se determinan normalmente utilizando técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), análisis por espectrometría de masas, etc. El término “purificado” puede denotar que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Para una proteína que se puede someter a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glucosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que se pueden purificar por separado.

“Polinucleótido aislado” se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN) que está exento de genes que, en el genoma de origen natural del organismo del cual se deriva la molécula de ácido nucleico, flanquean el gen. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, tal como un vector de expresión; a un virus o plásmido con replicación autónoma; o al interior del ADN genómico o un procariota o eucariota; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADNc o

genómico producido por PCR o digestión con una endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. Además, la expresión incluye una molécula de ARN que se transcribe a partir de una molécula de ADN, así como también un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una o más secuencias polipeptídicas adicionales.

5 “Polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido o molécula de la divulgación, tal como un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ aislado, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente, o de los componentes que están presentes durante un proceso de aislamiento o purificación. Un polipéptido o molécula de este tipo está sustancialmente exenta de otros elementos presentes en su entorno natural.

10 Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas procedentes de la fuente tisular o celular de la que se deriva. Normalmente, el polipéptido o molécula está aislado cuando está exento en al menos un 60 % en peso de las proteínas y moléculas orgánicas con las que se asocia de manera natural. Preferentemente, el preparado es al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 % y de la manera más

15 preferente al menos un 99 % en peso un polipéptido de la divulgación. Un polipéptido aislado de la divulgación se puede obtener, por ejemplo, mediante extracción a partir de una fuente natural, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de este tipo; o sintetizando químicamente la proteína. El término “aislado” también se refiere a preparados donde la proteína o molécula aislada está lo suficientemente pura para

20 administrarse como una composición farmacéutica, o donde la proteína o molécula aislada es al menos un 70-80 % (p/p) pura, más preferentemente, al menos un 80-90 % (p/p) pura, aún más preferentemente un 90-95 % pura; y, de la manera más preferente, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % (p/p) pura. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de

25 poliacrilamida, análisis por HPLC y/o análisis por espectrometría de masas.

El término “dosis” se refiere a una concentración, cuantía o cantidad medida de un agente terapéutico tal como un fármaco, medicina, compuesto, por ejemplo, un agente biológico o molécula de bajo peso molecular, que se administra (sin limitar la ruta de administración) a un sujeto o paciente que necesita el agente, tal como para el beneficio terapéutico o de tratamiento.

30 “Incrementa” se refiere a una alteración positiva, por ejemplo, un incremento de al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1000 % o más.

“Reduce” se refiere a una alteración negativa, por ejemplo, una reducción de un 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o un 100 %.

35 “Referencia” o “control” se refiere a un patrón de comparación tal como, sin carácter limitante, un placebo. En una realización, un nivel de referencia es el nivel, expresión o actividad

de un biomarcador en una muestra biológica obtenida de un tejido no afectado.

Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de una secuencia génica o de ADNc de longitud completa o la secuencia génica o de ADNc completa. Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia polipeptídica de referencia será por lo general de al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 25 aminoácidos y aún más preferentemente aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos. Para las moléculas de ácido nucleico, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será por lo general de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente al menos aproximadamente 75 nucleótidos y aún más preferentemente aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300 nucleótidos o cualquier número entero cercano o entre ellos.

“Sensible” en el contexto de la terapia se refiere a susceptible al tratamiento.

“Se une específicamente” o “se une selectivamente” se refiere a un agente (por ejemplo, un anticuerpo) que reconoce y se une a una molécula (por ejemplo, polipéptido, antígeno, ligando), pero que no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. Por ejemplo, dos moléculas (por ejemplo, un anticuerpo y su ligando) que se unen específicamente entre sí forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una afinidad elevada y una capacidad entre baja y moderada, lo que la distingue de la unión no específica que normalmente tiene una afinidad baja, con una capacidad entre moderada y elevada.

“Muestra biológica” o “muestra” se refiere a cualquier líquido, célula o tejido obtenido de un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica es sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, esputo, lágrimas, saliva, orina, semen, heces, etc. Las muestras celulares o tisulares, tales como muestras renales, se pueden procesar adicionalmente en un tampón adecuado para producir un homogeneizado o suspensión en el que se proporcionan los componentes intracelulares de células y tejido.

“Sujeto” se refiere a un mamífero, incluido, sin carácter limitante, un ser humano, tal como un paciente humano, un sujeto humano, un individuo humano, un primate no humano, o un mamífero no humano, tal como un animal bovino, equino, canino, ovino o felino. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, un sujeto es un paciente humano que padece, está en riesgo de padecer o que padece y está recibiendo tratamiento para una

afección o enfermedad renal, tal como CKD, y/o síntomas de esta. Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” se pueden utilizar de manera indistinta en esta memoria.

Se entiende que los intervalos que se proporcionan en la presente son una abreviatura de todos los valores dentro del intervalo, incluidos el primer y último valores mencionados. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o subintervalo del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50.

Una “composición farmacéutica” o “formulación” se refiere a una composición (una composición fisiológicamente aceptable) adecuada para el uso farmacéutico en un sujeto, tal como un animal o un mamífero, incluidos seres humanos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz en terapia o profilaxis del anticuerpo anti-integrina $\alpha v\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, como se describe en la presente y un excipiente, portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición farmacéutica engloba una composición que comprende el principio o los principios activos (un anticuerpo contra la integrina $\alpha v\beta 8$ o un fragmento o porción de unión al antígeno de este) y el ingrediente o los ingredientes inertes que constituyen el portador, así como también cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más ingredientes cualesquiera, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. En una realización, la composición farmacéutica incluye opcionalmente otro agente, compuesto, fármaco o medicamento con actividad biológica. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación engloban cualquier composición que se realiza mezclando un anticuerpo contra la integrina $\alpha v\beta 8$, o un fragmento o porción de unión al antígeno de este, y un excipiente, portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Un “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquiera de los portadores y tampones farmacéuticos estándar y similares, tal como una solución salina tamponada con fosfato, opcionalmente otro agente con actividad biológica, una solución de dextrosa acuosa (por ejemplo, al 5 %) y emulsiones (por ejemplo, una emulsión de aceite/agua o agua/aceite). Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen adyuvantes, aglutinantes, rellenos, diluyentes, desintegrantes, agentes emulsionantes, agentes humectantes, lubricantes, deslizantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes y agentes colorantes. Se pueden consultar portadores, excipientes, vehículos y diluyentes farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19.^a Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995 (o ediciones actualizadas de esta referencia)). Un portador farmacéutico adecuado para su

inclusión en una composición o formulación depende normalmente del modo de administración previsto del agente activo, por ejemplo, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ como se describe en la presente o un fragmento o porción de unión al antígeno de este. Los modos de administración ilustrativos incluyen la enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; infusión intravenosa o administración tópica, transdérmica o transmucosa).

Una “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que se puede formular en un compuesto para uso farmacéutico, incluidas, sin carácter limitante, sales metálicas (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o fosfato orgánico.

“Farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se refiere a un material que no es indeseable desde un punto biológico, fisiológico o de otro tipo, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin provocar ningún efecto biológico indeseable o sin interaccionar de manera nociva con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido o con cualquiera de los compuestos presentes sobre o en el cuerpo del individuo.

“Condiciones fisiológicas” se refiere a las condiciones en el cuerpo de un animal o mamífero, tal como un ser humano. Las condiciones fisiológicas incluyen, sin carácter limitante, temperatura corporal y un entorno acuoso de enzimas, pH y fuerza iónica fisiológicos. Las condiciones fisiológicas también engloban condiciones en el cuerpo de un sujeto particular que difieren de las condiciones “normales” presentes en la mayoría de los sujetos, tales como temperatura corporal humana normal (aproximadamente 37 °C) o pH normal de la sangre humana (aproximadamente 7.4).

Tal como se utilizan en la presente, los términos y la expresión “tratar”, “que trata”, “tratamiento” y similares se refieren a reducir, disminuir, suavizar, aliviar, anular, neutralizar o mejorar un trastorno y/o los síntomas relacionados con este. Se apreciará que, aunque no se excluya, tratar un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o síntomas relacionados con este sean eliminados o aliviados por completo. “Tratamiento” se puede referir al tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico o tratamiento diagnóstico. En ciertas realizaciones, “tratamiento” se refiere a la administración de un compuesto o composición a un sujeto con fines terapéuticos, profilácticos o diagnósticos.

De acuerdo con los métodos descritos, tratar o tratamiento conlleva la administración de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ como se describe en la presente. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ se administra por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea, a un sujeto que lo necesita. Como apreciará el experto en la técnica, la administración intravenosa se refiere por lo general a proporcionar o suministrar un

ingrediente activo, agente terapéutico, sustancia, medicamento, fármaco o anticuerpo, tal como un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, a una vena o vaso sanguíneo de un sujeto para suministrar el principio activo a la circulación sistémica del sujeto. La administración intravenosa puede comprender la inyección intravenosa o la infusión intravenosa a una vena o vaso, por ejemplo, mediante una jeringuilla y aguja o catéter. La inyección o infusión intravenosa puede conllevar el uso de tubos de plástico y una bolsa de infusión (por ejemplo, un conjunto de infusión), de modo que el principio activo se suministre a través de los tubos a una bolsa de infusión, y a continuación de la bolsa de infusión al sujeto, tal como a través de un catéter y/o un puerto colocado en el cuerpo del sujeto, con una tasa de flujo que determina de manera convencional y práctica el facultativo médico. La inyección o infusión intravenosa se puede llevar a cabo con el uso de una bomba o mediante un sistema de venoclisis.

“Tratamiento profiláctico” (tal como un tratamiento preventivo o protector) es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o que únicamente muestra signos tempranos de la enfermedad, o que está en riesgo de padecer una enfermedad, con el fin de reducir, disminuir, aliviar o eliminar el riesgo de desarrollar una enfermedad, patología o afección o una forma más seria o grave de la enfermedad o patología o afección. Se contempla que los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$ descritos en la presente, o un fragmento de unión al antígeno de estos, o composiciones de estos, se pueden administrar como un tratamiento profiláctico o protector para reducir la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad, patología o afección renal o para minimizar la gravedad de la enfermedad, patología o afección renal si esta se desarrolla en el sujeto.

Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos o síntomas de una enfermedad o patología con el fin de reducir, disminuir, aliviar o eliminar los signos o síntomas. Los signos o síntomas de una enfermedad o patología pueden ser, sin carácter limitante, bioquímicos, conductuales, celulares, fenotípicos, genotípicos, histológicos, funcionales, físicos, subjetivos u objetivos. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ de la divulgación se puede administrar como un tratamiento terapéutico.

Tal como se utiliza en la presente, un agente terapéutico que “previene” un trastorno o afección se refiere a un agente biológico, un compuesto o material medicinal que, en una muestra estadística, reduce la aparición de casos del trastorno o afección en la muestra tratada respecto a un control o muestra de referencia no tratados, o retrasa el inicio de, o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección respecto a una muestra de control o referencia no tratada. En una realización, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ de la divulgación es un agente terapéutico preventivo en los métodos descritos en la presente.

La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una dosificación suficiente para producir un

resultado deseado (por ejemplo, reducción, atenuación, eliminación o mejora de los síntomas) en relación con una afección de la salud, patología o enfermedad de un sujeto o con un fin diagnóstico. El resultado deseado puede comprender una mejora subjetiva u objetiva en un sujeto al que se le administra una dosis o dosificación. “Cantidad con eficacia terapéutica” se refiere a la cantidad de un agente eficaz para producir el efecto beneficioso previsto sobre la salud. Se entenderá que el nivel posológico específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular puede depender de diversos factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado; la biodisponibilidad, estabilidad metabólica, tasa de excreción y duración de la acción de ese compuesto; el modo y momento de administración del compuesto; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; y de la gravedad de la afección particular del paciente.

Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se refieren a una cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación postraducciona (por ejemplo, glucosilación o fosforilación). Por lo tanto, los términos se pueden utilizar de manera intercambiable en la presente para referirse a un polímero de residuos aminoacídicos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoacídicos son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural. Por lo tanto, el término “polipéptido” incluye proteínas de longitud completa y origen natural, así como también polipéptidos producidos de manera recombinante o sintética que corresponden a una proteína de origen natural de longitud completa o a dominios o fragmentos particulares de una proteína de origen natural. El término también engloba proteínas maduras a las que se ha añadido una metionina amino-terminal para facilitar la expresión en células procariontas. Los polipéptidos se pueden sintetizar químicamente o sintetizar mediante métodos de ADN recombinante; o se pueden purificar a partir de tejidos en los que se expresan de manera natural, de acuerdo con métodos bioquímicos estándar de purificación. Los “polipéptidos funcionales” poseen una o más de las funciones o actividades biológicas de una proteína o polipéptido concreto, por ejemplo, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$. Los polipéptidos funcionales pueden contener una secuencia primaria de aminoácidos que se ha modificado respecto a la que se considera que es la secuencia estándar de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$. Preferentemente, tales modificaciones son sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran ni alteran sustancialmente la función o actividad normal de la proteína. Un fragmento, porción o segmento polipeptídico se refiere a un tramo de residuos aminoacídicos de al menos aproximadamente 6 aminoácidos contiguos de una secuencia particular, más normalmente al menos aproximadamente 10-12 aminoácidos contiguos.

Las moléculas de ácido nucleico (polinucleótidos), que codifican polipéptidos tales como

un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ de la presente divulgación, incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido divulgado, por ejemplo, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este. No es necesario que tales moléculas de ácido nucleico sean idénticas en un 100 % a una secuencia de ácidos nucleicos endógena pero normalmente mostrarán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con respecto a una secuencia endógena normalmente tienen la capacidad de hibridarse con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con respecto a una secuencia endógena normalmente tienen la capacidad de hibridarse con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. "Hibridar" se refiere a un apareamiento para formar una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen) o fragmentos de estas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger, 1987, *Methods Enzymol.*, 152:399; Kimmel, A. R., 1987, *Methods Enzymol.*, 152:507).

A modo de ejemplo no limitante, una concentración rigurosa de sales será normalmente inferior a aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferentemente inferior a aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM y más preferentemente inferior a aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Se puede obtener una hibridación de baja rigurosidad en ausencia de un disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación de rigurosidad elevada se puede obtener en presencia de al menos aproximadamente un 35 % de formamida y más preferentemente al menos aproximadamente un 50 % de formamida. Las condiciones rigurosas de temperatura incluirán normalmente temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37°C y aún más preferentemente de al menos aproximadamente 42°C. Los expertos en la técnica conocen bien otros parámetros variables, tales como el tiempo de hibridación, la concentración del detergente, por ejemplo, de dodecilsulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador. Se consiguen varios niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización particular, la hibridación ocurre a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y un 1% de SDS. En otra realización particular, la hibridación ocurre a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, 1% de SDS, 35% de formamida y 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. En otra realización particular, la hibridación ocurre a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, 1% de SDS, 50% de formamida y 200 µg/mL de ADN de esperma de salmón. Para los expertos en la técnica serán evidentes variaciones útiles de estas condiciones.

Para la mayoría de las aplicaciones, los pasos de lavado posteriores a la hibridación

también variarán en su rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden ser definidas por la concentración de las sales y por la temperatura. Como se ha indicado anteriormente, la rigurosidad del lavado se puede aumentar al disminuir la concentración de sales o al aumentar la temperatura. Por ejemplo, la concentración rigurosa de sales para los pasos de lavado será inferior a aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM y, en particular, inferior a aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1.5 mM. Las condiciones rigurosas de temperatura para los pasos de lavado incluirán normalmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, o al menos aproximadamente 42 °C, o al menos aproximadamente 68 °C. En una realización particular, los pasos de lavado ocurrirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y 0.1% de SDS. En otra realización particular, los pasos de lavado ocurrirán a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y 0.1 % de SDS. En otra realización particular, los pasos de lavado ocurrirán a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y 0.1 % de SDS. Para los expertos en la técnica serán evidentes variaciones adicionales de estas condiciones. Los expertos en la técnica están muy familiarizados con las técnicas de hibridación y estas se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (*Science*, 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72:3961, 1975); Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna de las sustituciones conservadoras de aminoácidos como parte de la identidad secuencial. La identidad porcentual se puede medir utilizando software o algoritmos de comparación de secuencias, o mediante inspección visual. En la técnica se conocen varios algoritmos y software que se pueden utilizar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos (remítase, por ejemplo, a Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, tal como se modifica en Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, y se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). En ciertas realizaciones, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, San Francisco Sur, California) o Megalign (DNASTAR).

“Sustancialmente idéntico” se refiere a una molécula polipeptídica o de ácido nucleico

que muestra una identidad de al menos un 50 % respecto a una secuencia aminoacídica o secuencia de ácido nucleico de referencia. Una secuencia de este tipo puede ser idéntica en al menos un 60 %, o al menos un 80 % o un 85 %, o al menos un 90 %, 95 %, o incluso un 99 % a nivel de aminoácidos o ácido nucleico con la secuencia utilizada para la comparación.

5 La identidad secuencial se mide normalmente utilizando software para el análisis de secuencias (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencias de Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, BESTFIT, GAP o los programas PILEUP/PRETTYBOX). Dicho software empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas
10 sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos de aminoácidos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque ilustrativo para determinar el grado de identidad, se puede utilizar un programa BLAST con un puntaje de probabilidad de
15 entre e^{-3} y e^{-100} , lo cual indica una secuencia sumamente relacionada.

 Un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ de mamífero (especialmente, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ humana), o una isoforma o variante alélica funcional desde un punto de vista inmunológico de este, puede ser útil en los métodos descritos, como son otras isoformas o variantes, incluidos fragmentos del anticuerpo que poseen la actividad de unión y bloqueo del
20 anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$. Una “variación alélica” en el contexto de un polinucleótido o un gen es una forma alternativa (alelo) de un gen que existe en más de una forma en la población. A nivel polipeptídico, las “variantes alélicas” por lo general difieren unas de otras en solamente una o, como máximo, unas pocas sustituciones de aminoácidos. Una “variación de especie” de un polinucleótido o polipéptido es una en la que la variación ocurre de manera
25 natural entre diferentes especies de un organismo.

 En esta divulgación, los términos y expresiones “comprende”, “que comprende”, “que contiene” y “que tiene” y similares pueden tener el significado atribuido a ellos en la Ley de Patentes de EE. UU. y pueden significar “incluye”, “que incluye” y similares; “que está constituido esencialmente por” o “constituido esencialmente”, asimismo, tiene el significado atribuido en la
30 Ley de Patentes de los EE. UU. y la expresión es abierta, lo que permite la presencia de más de lo que se indica siempre que no se cambien las características básicas o novedosas de lo que se indica mediante la presencia de más de lo que se indica, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

 A menos que se afirme específicamente o sea obvio a partir del contexto, se entiende
35 que el término “o”, tal como se utiliza en la presente, es inclusivo. A menos que se afirme

específicamente o sea obvio a partir del contexto, se entiende que los términos “un”, “uno/a” y “el/la”, tal como se utilizan en la presente, son singulares o plurales.

A menos que se afirme específicamente o sea obvio a partir del contexto, se entiende que el término “aproximadamente”, tal como se utiliza en la presente, es un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándares de la media. Se entiende que el término “aproximadamente” se refiere a dentro de un 5 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.1 %, 0.05 % o 0.01 % del valor mencionado. A menos que sea evidente a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en la presente se encuentran modificados por el término “aproximadamente”.

Cualquier composición o método proporcionado en la presente se puede combinar con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en la presente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

Las **FIG. 1A** y **1B** presentan gráficos y tablas que muestran la unión de anticuerpos específicos contra la integrina- $\alpha\beta8$ a la proteína integrina $\alpha\beta8$ como se divulga en la presente.

Más específicamente, la **FIG. 1A** muestra un gráfico que muestra una comparación de la afinidad de unión entre un anticuerpo IgG contra la integrina $\alpha\beta8$ “hu37E1B5” producido utilizando la secuencia divulgada en el documento WO 2013/026004 y un anticuerpo IgG quimérico contra la integrina $\alpha\beta8$ “Chi-37E1B5” como se describe en la presente en el Ejemplo 1. Como se observa a partir de los resultados de unión que se muestran en la **FIG. 1A**, el anticuerpo hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta8$ tiene una afinidad de unión muy deficiente en comparación con la del anticuerpo Chi-37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta8$. La **FIG. 1B** presenta un gráfico que muestra una comparación de la afinidad de diferentes anticuerpos IgG contra la integrina $\alpha\beta8$ (“hu37E1B5” y “Chi-37E1B5”) como se analiza en la **FIG. 1A**, y un anticuerpo con injerto de CDR denominado “MEDI-hu37E1B5”) para la unión a la proteína integrina $\alpha\beta8$, y una tabla de las mediciones de K_d de estos anticuerpos, como se mide mediante un ensayo Biacore. El anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta8$ se generó utilizando injerto de CDR a partir de un anticuerpo Chi-37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta8$ y mostró un perfil de unión a la integrina $\alpha\beta8$ que fue similar al del anticuerpo Chi-37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta8$ (**FIG. 1B**).

Las **FIG. 2A-2D** presentan los resultados y las secuencias de aminoácidos de los prototipos (*hits*) clonales del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ representativos procedentes de la generación de mutaciones puntuales de saturación en las posiciones CDR del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 C94I humanizado contra la integrina $\alpha\beta8$, junto con los gráficos que muestran los análisis de afinidad de unión del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 C94I contra la integrina $\alpha\beta8$ y prototipos de CDR1V_H, CDR3V_H y V_L contra la integrina $\alpha\beta8$, denominados “P1” o “P2”, según se generan mediante experimentos de mutación puntual de saturación y se identifican en

los análisis de selección descritos en el Ejemplo 1. La **FIG. 2A** muestra la afinidad de unión mejorada de los prototipos de CDR1V_H contra la integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con la del anticuerpo progenitor MEDI-hu37E1B5. La **FIG. 2B** muestra la afinidad de unión mejorada de los prototipos de CDR3V_H contra la integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con la del anticuerpo progenitor MEDI-hu37E1B5. La **FIG. 2C** muestra la afinidad de unión mejorada de los prototipos de V_L contra la integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con la del anticuerpo progenitor MEDI-hu37E1B5. La **FIG. 2D** representa la alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los prototipos de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ clonales primarios representativos, designados "P2-23," "P2-33," "P2-25," "P1-21," "P1-35," "P1-42," "P2-16," "P2-19," "P2-36," y "P2-14," obtenidos a partir de la selección en los clones del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ con maduración de la afinidad. Las regiones de armazón (FW1-FW4) y las CDR (CDR1-CDR3) en las regiones V_H y V_L de los clones se designan encima de las secuencias. Se indican las diferencias en los residuos aminoácidos en las regiones de CDR con un subrayado doble.

Las **FIG. 3A** y **3B** presentan los datos de unión a la integrina $\alpha\beta 8$ de la selección en la colección de combinación utilizada para generar el anticuerpo contra $\alpha\beta 8$ humanizado y con optimización de la afinidad como se describe en el Ejemplo 1. Como se representa en las **FIG. 3A** y **3B**, se combinaron las 10 mutaciones puntuales beneficiosas de una manera combinatoria. Se sometieron a selección 4608 clones y se eligieron 88 clones para su confirmación. Se identificaron 6 prototipos combo que mostraron una mejora de unión aditiva respecto al mejor prototipo primario P2-23.

La **FIG. 4** presenta los resultados de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) en el que se comparó la unión a la proteína integrina $\alpha\beta 8$ de diferentes concentraciones de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ MEDI-hu37E1B5, y anticuerpos con optimización de la afinidad B5-15 y B5-15 N59Q. Para los ensayos ELISA, se recubrieron los pocillos de una placa de cultivo tisular con proteína integrina $\alpha\beta 8$ producida de manera recombinante. Se detectó la unión del anticuerpo utilizando un anticuerpo de cabra contra la Fc humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se observó una unión mejorada de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ con optimización de la afinidad B5-15 y B5-15 N59Q en comparación con la del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ progenitor MEDI-hu37E1B5 en un intervalo de concentraciones de anticuerpos. B5-15 N59Q es una versión aglucosilada del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$. Se ha mostrado que la glucosilación de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ (en la secuencia de CDR2H) es importante para la actividad inhibidora pero no afecta a la unión a la integrina $\alpha\beta 8$ (véase el documento WO 2015/195835).

La **FIG. 5** presenta un gráfico y tabla que muestran los resultados del bioensayo con TMLC luciferasa para medir la inhibición de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ en la

activación de TGF- β . El gráfico en la **FIG. 5** muestra la respuesta máxima porcentual de la actividad de TGF- β frente al anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ (isotipo IgG). Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ evaluados en el ensayo fueron el anticuerpo progenitor (Chi-37E1B5, que se muestra como “Chi-B5” en la figura) y con optimización de la afinidad (B5-15) contra la integrina $\alpha\beta 8$. Se muestran los valores de K_d (pM) y Cl_{50} (nM) para los dos anticuerpos en la tabla que sigue al gráfico. Como se observa en el gráfico, un incremento en la concentración de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ en el ensayo dio como resultado una reducción de la activación de TGF- β , y B5-15 demostró una mayor potencia *in vitro* que Chi-37E1B5.

La **FIG. 6** muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de cuatro anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$, “Chi-37E1B5” (el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ quimérico con adquisición de licencias de UCSF), “hu37E1B5” (el anticuerpo 37E1B5 humanizado de UCSF del documento WO 2013/026004), “MEDI-hu37E1B5” (el anticuerpo Medl contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado) y “B5-15” (el anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado y con optimización de la afinidad). Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de “Chi-37E1B5” se resaltan en negrita. Las CDR de V_H y V_L se subrayan en cada secuencia de la región variable.

Como se muestra en la **FIG. 6**, la secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo Chi-37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ es como se indica a continuación:

EVQLVESGGGLVQPGGSLNLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSS
TINYTSSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMNKVRSEDTALYYCACLITTEDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 20).

La secuencia de nucleótidos de la región V_H del anticuerpo Chi-37E1B5 es como se indica a continuación:

gaagtcagctggtggagtctggaggtggcctggtgcagcctggaggatccctgaacctctcctgtgcagtcctcaggattc
gttttagtagatactggatgagttgggtccggcaggctccagggaaagggctagaatggattggagaaattaatccagatagcagt
acgataaaactatacgtcatctctaaaggataaattcatcatctccagagacaacgccaaaaatacgtgtacctgcaaatgaacaaa
gtgagatctgaggacacagccctttactgtgcatgtcttactacggaggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctc
ctca (SEQ ID NO: 21).

La secuencia de aminoácidos de la región V_L (kappa) del anticuerpo Chi-37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ es como se indica a continuación:

EIVLTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYYANRLVDGVP
SRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 22).

La secuencia de nucleótidos de la región V_L (kappa) del anticuerpo Chi-37E1B5 es como se indica a continuación:

gaaattgtgctgactcagtcctcatctccatgtatgcatctctaggagagagagtcactatcccttgcaaggcgagtcagg

acattaatagctatttaagctggttcagcagaaaccagggaaatctcctaagaccctgatctattatgcaaacagattggttagatgg
ggtcccatcaagggtcagtggtcagtggtatctgggaagattattctctcaccatcagcagcctggagatgaagatatgggaatttatt
attgtctacagtatgatgagttccgtacacgttcggaggaggcaccaagctggaaatcaaa (SEQ ID NO: 23).

También en la **FIG. 6**, la secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ de UCSF es como se indica a continuación:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSS
TINYTSSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTTEDYWGQGTTVTVSS (SEQ
ID NO: 24).

La secuencia de aminoácidos de la región V_L (kappa) del anticuerpo hu37E1B5 de UCSF es como se indica a continuación:

EIVLTQSPSSLSLSPGERVTITCKASQDINSYLSWYQQKPGKAPKLLIYYANRLVDGVP
ARFSGSGSGQDYTLTISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPTYFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25).

Las **FIG. 7A-7C** muestran imágenes microfotográficas de tejidos renales humanos teñidos mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHC) con un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$. Como se muestra en la **FIG. 7A**, se observó que el tejido renal humano estaba muy enriquecido en integrina $\alpha\beta 8$, especialmente en los podocitos en comparación con otros tejidos humanos sanos evaluados, excepto para el tejido nervioso. La **FIG. 7B** muestra que la integrina $\alpha\beta 8$ es abundante en muestras de tejido renal obtenidas de individuos con nefropatía diabética (DN) y enfermedad renal crónica (CKD), basándose en el patrón de tinción con el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$. En particular, en las muestras de tejido renal obtenidas de pacientes con DN y CKD, se observó tinción de la integrina $\alpha\beta 8$ esencialmente en los túbulos. Los glomérulos de los riñones en pacientes con DN mostraron una reducción de la tinción de la integrina $\alpha\beta 8$, probablemente como consecuencia de la pérdida de podocitos debido al daño y fibrosis del tejido renal. La **FIG. 7C** muestra el resultado de la tinción IHC con anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ de tejidos renales de individuos normales ("riñón normal") y tejidos renales de pacientes que tienen diferentes etapas de nefropatía diabética ("DN"). Los resultados muestran que la tinción con $\alpha\beta 8$ estuvo elevada en nefronas funcionales viables. En muestras tisulares renales obtenidas de pacientes que padecen DN, las áreas no teñidas son la matriz fibrótica que ha reemplazado las nefronas funcionales y se designan con un asterisco (*).

Las **FIG. 8A-8E** presentan gráficos de barras, representaciones de puntos y gráficos de cajas que muestran los resultados del análisis del perfil transcriptómico realizado utilizando muestras tisulares renales obtenidas de pacientes que padecen la enfermedad renal nefropatía diabética (DN) comparadas con muestras tisulares renales obtenidas de donantes vivos. La **FIG. 8A** muestra los niveles de expresión relativa de ARNm (respecto a la expresión de *hprt1*) de diferentes integrinas asociadas AV, *ITGB8*, *ITGB1*, *ITGB3*, *ITGB5* e *ITGB6* en tejido renal

obtenido de sujetos humanos que padecen CKD. *ITGB8* es la subunidad $\beta 8$ más abundante en riñones de pacientes con CKD. La **FIG. 8B** presenta un gráfico de cajas que muestra que la expresión de ARNm de *ITGB8* normalizada respecto a ARNm de *NPHS1* (nefrina, gen específico de podocitos) fue superior en los glomérulos de muestras renales de pacientes con DN respecto a su expresión en donantes vivos como controles sanos. La **FIG. 8C** presenta gráficos de cajas que muestran que la expresión de ARNm de *ITGB8* normalizada respecto a ARNm de *NPHS1* fue superior en el intersticio tubular de muestras renales de pacientes con DN respecto a su expresión en donantes vivos como controles sanos. La **FIG. 8D** presenta un gráfico de puntos que muestra que la expresión de ARNm de *ITGB8* estuvo fuertemente correlacionada con el puntaje de activación de TGF- β (un combinado de genes posteriores en la ruta de TGF- β) en CKD en el intersticio tubular de pacientes con CKD. La **FIG. 8E** presenta un gráfico de cajas que muestra los niveles de expresión de ARNm (recuento normalizado) de los diferentes genes de integrina (*ITGAV*, *ITGB2*, *ITGB4*, *ITGB5*, *ITGB6*, *ITGB7* e *ITGB8*) en glomérulo renal de donante sano (Glomérulos-LD), en glomérulo renal de pacientes que padecen DN (Glomérulos-DN), en intersticio tubular renal de donantes sanos (Tub-LD) y en intersticio tubular renal de pacientes que padecen DN (Tub-DN) tras la obtención del perfil transcripcional hologenómico utilizando secARN. Se observó un aumento de la expresión de ARNm de *ITGB8* en el intersticio tubular de pacientes con DN (n = 20) frente a donantes vivos (LD, n=19) ($p < 0.01$).

Las **FIG. 9A-9J** presentan imágenes microfotográficas que muestran los resultados de la tinción IHC utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ como se describe en la presente (**FIG. 9A-9D**) y gráficos de barras que muestran los resultados de los análisis *in vivo* de la expresión de ARNm (**FIG. 9E-9I**) y contenido de hidroxiprolina porcentual como un indicador de la fibrosis (**FIG. 9J**) en ratones $\alpha\beta 8$ transgénicos humanizados que se sometieron a un procedimiento de oclusión ureteral unilateral (UUO, por sus siglas en inglés) (un modelo en ratones de fibrosis renal).

Las microfotografías de tinción IHC mostradas en **FIG. 9A y 9B** demuestran que los ratones $\alpha\beta 8$ transgénicos humanizados expresan $\alpha\beta 8$ principalmente en el glomérulo del riñón, de manera similar a lo que se observa habitualmente en el riñón humano sano. Se demostró que la inducción de fibrosis con el procedimiento de UUO incrementó la expresión de $\alpha\beta 8$ en los túbulos renales (**FIG. 9C y 9D**), de manera similar a lo que se observa habitualmente en los riñones de seres humanos que padecen CKD.

Como se muestra en la **FIG. 9E**, los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida (*lead*)) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de ARNm de colágeno 1 $\alpha 1$ 8

días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Se administraron 10 mg/kg de cada uno de los anticuerpos.

Como se muestra en la **FIG. 9F**, los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de ARNm de colágeno 3a1 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Se administraron 10 mg/kg de cada uno de los anticuerpos.

Como se muestra en la **FIG. 9G**, UUO incrementó la expresión de ARNm de fibronectina 1 (*Fn1*) cortical en riñón obstruido 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles sometidos a un procedimiento simulado. Los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de *Fn1* a los 8 días de lesión en comparación con los controles de UUO. Se administraron 10 mg/kg de cada uno de los anticuerpos.

Como se muestra en la **FIG. 9H**, el anticuerpo B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuó los incrementos inducidos por UUO en la expresión de actina del músculo liso α (α -SMA, por sus siglas en inglés) 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) no redujo el incremento inducido por UUO en α -SMA. Se administraron 10 mg/kg de cada uno de los anticuerpos.

Como se muestra en la **FIG. 9I**, los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de ARNm de factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Se administraron 10 mg/kg de cada uno de los anticuerpos.

Como se muestra en la **FIG. 9J**, UUO incrementó el % de hidroxiprolina cortical en riñón obstruido (OH-P) 8 días después de la cirugía UUO. Los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) atenuaron los incrementos inducidos por UUO en el % de OH-P a los 8 días de la lesión por UUO en comparación con los controles. Se administraron 10 mg/kg de cada uno de los anticuerpos. La lectura de la hidroxiprolina cortical renal sirve como una medición del contenido fibrótico/fibrosis del tejido real.

Las **FIG. 10A** y **10B** muestran gráficos relacionados con los efectos posteriores de la señalización TGF- β en animales $\alpha\beta 8$ transgénicos humanizados que se sometieron a cirugía UUO tras el tratamiento con el anticuerpo de control isotópico (NIP228) o un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ (B5-15). La **FIG. 10A** muestra que la cirugía UUO en ratones $\alpha\beta 8$ transgénicos

humanizados dio como resultado un aumento en la fosforilación de SMAD2/3 dependiente de TGF- β de 5.7 veces frente al grupo con un tratamiento simulado. El tratamiento con el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ (B5-15) disminuyó significativamente la activación de SMAD2/3 en 1.6 veces en comparación con el tratamiento con el control isotípico. Los niveles totales de SMAD2/3 se incrementaron en todos los grupos UO en comparación con los animales con un tratamiento simulado (**FIG. 10B**).

La **FIG. 11** muestra un gráfico que demuestra el efecto del tratamiento de un sistema celular de tricultivo primario renal con B5-15 (un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$) o NIP228 (un control isotípico). El sistema celular de tricultivo es un modelo de glomeruloesclerosis humano donde las células endoteliales glomerulares, podocitos, y células mesangiales forman una red vascular (Waters *et al.*, 2017, *J Pathol*, 243(3):390-400). El tratamiento con TGF- β o CTGF induce la formación de nódulos, un indicador de la fibrosis. El tratamiento con un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ reduce significativamente el número de nódulos en comparación con el tratamiento con un control isotípico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación presenta de manera general anticuerpos, composiciones y métodos para tratar la enfermedad renal, por ejemplo, nefropatía diabética (DN), enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal aguda, enfermedad renal asociada a la hipertensión, enfermedad renal asociada a la hiperglucemia, fibrosis renal, enfermedad renal asociada a la inflamación, enfermedad renal terminal (ESRD), fibrosis renal asociada a la autoinmunidad (por ejemplo, nefritis lúpica) y fibrosis tras el trasplante de riñón y similares, en un individuo que lo necesita tal como se describe en la presente. En particular, los anticuerpos, composiciones y métodos se refieren a tratar la fibrosis renal, que se asocia con la enfermedad renal, tal como CKD.

La presente divulgación se refiere a un método de tratamiento para mejorar, atenuar, anular, reducir o mejorar la fibrosis en tejido renal en un sujeto que padece una enfermedad renal, tal como CKD. En general, la fibrosis se refiere a la formación de un exceso de tejido conectivo fibroso (tejido cicatricial) en un órgano tal como el riñón, que provoca el engrosamiento y cicatrización del tejido conectivo renal. Como se ha señalado anteriormente, los métodos conllevan la administración de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ de la que se ha observado que tiene una expresión muy elevada en células renales enfermas y en tejido renal, especialmente, tejido y células epiteliales renales en sujetos que padecen una enfermedad renal, tal como CKD. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, se unen selectivamente a la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en células y tejidos renales

fibróticos, y de esta manera bloquea, neutraliza o inhibe la interacción de la integrina $\alpha\beta 8$ expresada en el riñón con la forma latente de TGF- β (LAP-TGF- β) en la superficie celular renal. La unión del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ interfiere con la interacción integrina $\alpha\beta 8$ /LAP TGF- β , que a su vez bloquea o previene la activación de TGF- β en la superficie celular renal, de modo que no se produce TGF- β activo y, por lo tanto, no puede ejercer sus efectos celulares asociados con la fibrosis renal en el tejido renal de un sujeto, tal como un ser humano o un sujeto no humano. Los métodos proporcionan un beneficio terapéutico, especialmente en el tratamiento de la enfermedad renal, por ejemplo, al reducir, atenuar, anular o disminuir la dañina fibrosis inducida por TGF- β activa en la enfermedad renal, por ejemplo, CKD.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, reduce la activación de TGF- β local en células y tejido renales donde la integrina $\alpha\beta 8$ tiene una expresión muy elevada, por ejemplo, uniéndose directamente al receptor de la integrina $\alpha\beta 8$ de LAP TGF- β . La unión de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ a la integrina $\alpha\beta 8$, que bloquea la activación de TGF- β a partir de su forma latente, también puede reducir o prevenir el reclutamiento de la proteasa que escinde el TGF- β latente y libera el péptido TGF- β maduro y activo. Esto podría ocurrir mediante el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ que inhibe la unión de la integrina $\alpha\beta 8$ en la superficie celular renal a TGF- β latente asociado con la matriz celular, para inhibir de esa manera la posterior activación de TGF- β como se describe más adelante.

Factor de crecimiento transformante beta (β) (TGF- β) y su interacción con la integrina $\alpha\beta 8$

En las células, la citocina TGF- β se sintetiza y secreta a la matriz extracelular como un precursor inactivo que se compleja con un “péptido asociado a la latencia (LAP)” y una “proteína de unión a TGF β latente (LTBP)”. La forma latente de TGF- β debe activarse con el fin de unirse a su receptor, por ejemplo, integrina $\alpha\beta 8$, y tener una función biológica (J.J. Worthington *et al.*, 2011a, *Trends Biochem. Sci.*, 36:47-54). El LAP se escinde del TGF- β activo, pero permanece unido de manera no covalente en una conformación que evita que TGF- β se acople con su receptor. Los activadores de TGF- β incluyen diversas proteasas y moléculas de la superficie celular que alteran el complejo latente y permiten que el TGF- β activo se acople con su receptor. Los activadores de TGF- β putativos incluyen, sin carácter limitante, proteasas que degradan LAP, trombospondina-1, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) e integrinas. Por lo tanto, la activación del complejo latente es esencial para la regulación de la función de TGF- β y los activadores de TGF- β son el paso limitante de la velocidad en la conversión de TGF- β latente en activo. A modo de ejemplo, en riñones con CKD humanos ($n = 4$), la cantidad de TGF- β latente es 53 veces superior a la de TGF- β activo.

La fibrosis es un impulsor importante de la evolución de la enfermedad renal crónica (CKD) en pacientes humanos y se correlaciona con la disfunción y daño renales. TGF- β participa en el desarrollo de la fibrosis renal en CKD. TGF- β renal presenta un aumento regulado en riñones con CKD fibróticos frente a los de control (D.S. Goumenos *et al.*, 2002, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17:2145-2152). Se ha mostrado que TGF- β urinario se correlaciona con el daño renal (albuminuria) en la diabetes de tipo 2. (Marwood *et al.*, 2002, *Exp. Biol. Med.*, 227(11):943-956).

Los receptores transmembrana de la integrina α_v , por ejemplo, $\alpha_v\beta_8$, son agentes importantes en la regulación de la fisiología de la matriz extracelular y en la activación de TGF- β . Resumiendo, las integrinas α_v median en la activación de TGF- β latente. En particular, $\alpha_v\beta_8$ se une al motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) del péptido asociado a la latencia (LAP) que se une a TGF- β , para regular de esta manera los niveles de TGF- β libre y activo en los tejidos (Mu, D. *et al.*, 2002, *J. Cell Biol.*, 157(3):493-507; Araya, J., 2006, *Am. J. Pathol.*, 169(2):405-415).

A diferencia de la actividad de otras integrinas $\alpha_v\beta$, la integrina $\alpha_v\beta_8$ es activa constitutivamente, y la activación de LAP TGF- β (mediante la liberación de la citocina TGF- β activa después de la unión de LAP TGF- β a la integrina $\alpha_v\beta_8$) está mediada por la escisión de la proteasa MMP-14, más que por el anclaje a la actina citoplasmática (sin efecto de tracción). Hay un enriquecimiento en la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_8$ en el tejido renal, y el gen que codifica la integrina $\alpha_v\beta_8$ tiene una expresión muy elevada en el tejido renal en comparación con otros tejidos, tales como, por ejemplo, páncreas, hígado, vesícula biliar, glándulas salivares, esófago, estómago, intestino, pulmón, corazón o vejiga, como se ejemplifica más adelante.

Como se describe en la presente, tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado que los niveles elevados de la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_8$ en células epiteliales renales se correlacionan directamente con niveles elevados de fibrosis tisular renal resultado de la activación de TGF- β . Los niveles elevados de actividad de TGF- β inducen e incrementan el daño a las células y tejido renales (en el riñón), lo que provoca fibrosis y, por lo tanto, agrava la enfermedad renal, tal como CKD. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha_v\beta_8$ descritos en la presente se unen específicamente a la integrina $\alpha_v\beta_8$ expresada por las células renales e inhiben la actividad destructiva de TGF- β y la consecuente fibrosis en las células y tejido renales al bloquear y/o reducir la unión de la integrina $\alpha_v\beta_8$ a TGF- β latente (LAP TGF- β) e inhibir la liberación de la forma activa de TGF- β . Esta acción de los anticuerpos contra la integrina $\alpha_v\beta_8$ específicos sirve como un tratamiento contra la destrucción de células y tejido renales resultado de la actividad de TGF- β , por ejemplo, al inhibir la cascada de señalización intracelular de TGF- β . De acuerdo con los métodos divulgados y ejemplificados en la presente, bloquear la actividad

de la integrina $\alpha\beta 8$ proporcionando anticuerpos que se unen específicamente a la integrina $\alpha\beta 8$ en el riñón reduce significativamente la activación de TGF- β ubicado en el riñón y, de esta manera, reduce específicamente el daño en células y tejido renales, concretamente, fibrosis renal, en los riñones enfermos.

5 El uso de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ que se dirigen específicamente al receptor de la integrina $\alpha\beta 8$ en las células renales surgió del descubrimiento, como se describe en la presente, de que la integrina $\alpha\beta 8$ se expresa de manera preferente en el riñón en sujetos normales y que la expresión de la integrina $\alpha\beta 8$ presenta un aumento y ubicación significativos en las células epiteliales renales (por ejemplo, podocitos y túbulos intersticiales) en los riñones de sujetos con una enfermedad renal fibrótica, por ejemplo, pacientes humanos con CKD. Como se ha mencionado anteriormente, la presente divulgación proporciona el sorprendente hallazgo de que la proteína $\alpha\beta 8$ presenta un gran aumento regulado en riñones de pacientes humanos con CKD. Además, la activación de TGF- β por la unión específica de la integrina $\alpha\beta 8$ a la forma activa latente de TGF- β en el riñón es una causa directa de la destructiva fibrosis en el tejido renal. Los presentes descubrimientos contradicen un hallazgo anterior en la técnica según el cual la integrina $\alpha\beta 8$ se detecta principalmente en las células mesangiales del riñón y los animales transgénicos que no expresaron la integrina $\alpha\beta 8$ en las células mesangiales no obstante albergaron TGF- β activo que provocó la apoptosis de células endoteliales (S. Khan *et al.*, 2011, *Am. J. Pathology*, 178(2):609-620). Por el contrario, y como se describe y ejemplifica en la presente, los presentes métodos conllevan la inhibición y bloqueo de la interacción de la integrina $\alpha\beta 8$ con LAP-TGF- β y su unión a este, de modo que no se libere TGF- β activo en la membrana de las células renales y no sea capaz de causar fibrosis (y/o un daño adicional) a las células y tejido renales en sujetos que padecen una enfermedad renal tal como CKD.

Anticuerpos dirigidos específicamente contra la integrina $\alpha\beta 8$

25 La presente divulgación engloba el desarrollo y uso de anticuerpos que se dirigen contra la integrina $\alpha\beta 8$ y la tienen como diana y se unen a ella de manera específica, especialmente a la integrina $\alpha\beta 8$ expresada en células y tejido renales y en células y tejido renales fibróticos. Estos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos, son muy beneficiosos en los métodos de tratamiento de la enfermedad renal, especialmente fibrosis renal en la enfermedad renal, tal como enfermedad renal crónica (CKD), en un sujeto que necesite tratamiento. En las realizaciones, el sujeto puede padecer una afección que esté asociada con el daño o lesión de las células y tejido renales y que provoque fibrosis del tejido renal como se describe en la presente, o una enfermedad renal aguda, crónica o terminal. El tratamiento de los sujetos que padecen fibrosis renal y enfermedad renal que conlleva fibrosis, independientemente de la etiología, utilizando anticuerpos, composiciones y métodos descritos en la presente

proporcionan un beneficio médico y clínico importante para los sujetos que lo necesitan, especialmente, pacientes aquejados de enfermedad renal, tal como CKD o DN. En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ es un anticuerpo humanizado.

En una realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ es un anticuerpo humanizado, denominado anticuerpo “MEDI-hu37E1B5” como se ha descrito anteriormente, que se dirige específicamente a la integrina $\alpha\beta8$ humana y se une a ella. En una realización particular, el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 se dirige específicamente y se une a la integrina $\alpha\beta8$ humana que se expresa en el riñón y que tiene una expresión muy elevada en el riñón fibrótico. En una realización, el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 no presenta reactividad cruzada con anticuerpos contra otras integrinas.

En otra realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ es un anticuerpo humanizado, con optimización de la afinidad, denominado anticuerpo “B5-15” contra la integrina $\alpha\beta8$ como se ha descrito anteriormente, que se dirige específicamente a la integrina $\alpha\beta8$ humana y demuestra una afinidad de unión elevada a ella. El anticuerpo B5-15 optimizado es del subtipo IgG1, demuestra una unión específica y selectiva a la integrina $\alpha\beta8$ humana y muestra una actividad funcional al bloquear o inhibir la interacción o asociación de unión entre la integrina $\alpha\beta8$ humana y la forma latente de TGF- β y de esta manera bloquea o inhibe la activación de TGF- β por la liberación de TGF- β activo de su forma latente. Como se demuestra en la presente (FIG. 4), B5-15 tiene un perfil de unión mejorado a la integrina $\alpha\beta8$ en comparación con el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 con injerto de CDR contra la integrina $\alpha\beta8$ descrito en el Ejemplo 1.

El anticuerpo B5-15 bloquea la unión de la integrina $\alpha\beta8$ a LAP-TGF- β y bloquea la activación de TGF- β y la señalización intracelular por TGF- β , por lo tanto se protegen las células y tejido renales de los efectos dañinos del péptido TGF- β activo, que puede inducir y agravar la fibrosis. Sin desear ceñirse a ninguna teoría, el anticuerpo B5-15 modifica alostéricamente la integrina $\alpha\beta8$ y reduce su afinidad por el dominio de unión de TGF- β latente (LAP), que evita la activación de TGF- β desde su forma latente de modo que no se libere péptido TGF- β activo. Por lo tanto, el anticuerpo induce un cambio conformacional en la integrina $\alpha\beta8$, de modo que $\alpha\beta8$ no puede seguir uniéndose a TGF- β latente para facilitar su activación (WO 2015/195835). Hasta la presente divulgación, se desconocían las propiedades de unión y actividades funcionales de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$, tal como el anticuerpo B5-15, en la fibrosis renal (de riñón).

En las realizaciones, los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$ divulgados en la presente se unen específicamente al receptor de la integrina $\alpha\beta8$ que tiene una expresión elevada en células y tejido renales, especialmente tejido renal enfermo, dañado y/o fibrótico tal como se

detecta en individuos con enfermedad renal, por ejemplo, CKD o DN. Las composiciones que comprenden estos anticuerpos y su uso en métodos para tratar la enfermedad renal y nefropatía, especialmente, enfermedad renal que conlleva fibrosis, están englobadas por la presente divulgación. Los anticuerpos descritos se unen únicamente a la integrina $\alpha\beta8$ humana y no presentan reactividad cruzada con ninguna otra integrina.

Los anticuerpos descritos también son ventajosos debido a que se dirigen selectivamente y se unen específicamente al receptor de la integrina $\alpha\beta8$ para TGF- β latente y no se dirigen directamente a la propia citocina, de esta manera proporcionan una estrategia terapéutica más segura para tratar la enfermedad renal, especialmente, la enfermedad renal que conlleva fibrosis. Además, la inhibición, bloqueo o neutralización de la actividad de la isoforma TGF- $\beta1$ es especialmente ventajosa, ya que, por lo general, se considera que esta isoforma de TGF- β es la responsable de la mayor parte de actividad de TGF- β relacionada con la enfermedad. La prevalencia de la isoforma TGF- $\beta1$ en el riñón es probable que de como resultado la participación de la forma activa de TGF- $\beta1$ en la fibrosis renal y enfermedad renal.

Aunque actuar directamente sobre TGF- β puede ser una estrategia para inhibir o prevenir patologías provocadas por la actividad de TGF- β , una neutralización general y/o inhibición crónica de las acciones de TGF- β resultado de actuar directamente sobre la citocina podría tener graves efectos secundarios en el individuo tratado, dada la participación de TGF- β en la modulación de diversas funciones y rutas celulares. Por lo tanto, la estrategia de utilizar anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$ como se proporcionan en la presente para bloquear, inhibir, neutralizar y, por lo tanto, evitar de manera eficaz, la interacción de la integrina $\alpha\beta8$ /LAP TGF- β en las células y tejido renales sin comprometer la activación de TGF- β *in vivo* en otras células, tejidos y órganos, o para otros fines fisiológicos, proporciona una herramienta terapéutica y método valiosos para tratar la enfermedad renal y fibrosis, tal como CKD o DN. Convenientemente, la especificidad de los anticuerpos contra $\alpha\beta8$ descritos en la presente para células y tejido renales que expresan niveles elevados de la integrina $\alpha\beta8$ disminuye los efectos adversos, tales como respuestas autoinmunitarias, desarrollo de carcinoma y aterosclerosis de inicio rápido. Se han observado efectos adversos con la inhibición pan-TGF- β , por lo tanto, actuar específicamente sobre la integrina $\alpha\beta8$ para afectar a la activación de TGF- β es probable que de como resultado una reducción de los eventos adversos.

Como otra ventaja, los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$ descritos en la presente no cruzan la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) y, por lo tanto, no pueden dar como resultado la unión a la integrina $\alpha\beta8$ expresada en las células y tejido del encéfalo.

Los anticuerpos contra $\alpha\beta8$ descritos bloquean específicamente la unión de la integrina $\alpha\beta8$ expresada en células epiteliales renales a la forma latente de TGF- β y, por lo tanto,

bloquean la fibrosis provocada por la liberación en el tejido renal de TGF- β activa, que se ha observado que desempeña una función central en la patobiología glomerular y túbulointersticial de la enfermedad renal que induce alteraciones de la barrera de filtración glomerular, glomeruloesclerosis y fibrosis, así como también en la degeneración de túbulos que dan lugar a la disfunción renal permanente. En consecuencia, los métodos de la presente conllevan el uso de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ específicos para tratar la enfermedad renal, tal como la enfermedad renal crónica o nefropatía diabética, caracterizada por la fibrosis del tejido renal perjudicial, al unirse específicamente a un receptor diana, es decir, integrina $\alpha\beta 8$, que tiene una expresión muy elevada en la superficie de las células renales en individuos que tienen riñones dañados y/o enfermedad renal, en lugar de actuar sobre el propio TGF- β . Al utilizar los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ específicos proporcionados en la presente que se dirigen y se unen a la integrina $\alpha\beta 8$ se anula y evita de manera eficaz la actividad de la citocina TGF- β que es el principal culpable de la generación de la fibrosis del tejido renal y daño posterior al tejido renal en la enfermedad renal.

Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ descritos en la presente se unen específicamente a una o más regiones de la proteína receptora integrina $\alpha\beta 8$ que contiene los epítomos o sitios de unión al antígeno. En una realización, el epítomo de una integrina $\alpha\beta 8$ al que se une el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, tal como el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 o el anticuerpo B5-15, se cartografió hasta una región a una distancia de aproximadamente 28 Å (Angstroms) del sitio de unión de la integrina $\alpha\beta 8$ y LAP-TGF- β . (S. Minagawa *et al.*, 2014, *Sci. Transl. Med.*, 6(241): 241re79. Doi:10.1126/scitranslmed.3008074).

En una realización, se contempla un anticuerpo que compite por la unión a la integrina $\alpha\beta 8$ con un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR de la cadena ligera: CDR1 de V_L : KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 4); CDR2 de V_L : YANRLVD (SEQ ID NO: 5); y CDR3 de V_L : LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 6); y una región variable de la cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR de la cadena pesada: CDR1 de V_H : RYWMS (SEQ ID NO: 1); CDR2 de V_H : EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2); y CDR3 de V_H : LITTEDY (SEQ ID NO: 3) como se describen en la presente. El anticuerpo puede ser monoclonal, quimérico, humanizado, etc., y puede ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3 o IgG4. En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

En otra realización, se contempla un anticuerpo que compite por la unión a la integrina $\alpha\beta 8$ con un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR de la cadena ligera: CDR1 de V_L : KASQDINKYLS (SEQ ID NO: 10); CDR2 de V_L : YANRLVD (SEQ ID NO: 5); y CDR3 de V_L : LQYDVFPYT (SEQ ID NO: 11); y una región

variable de la cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR de la cadena pesada: CDR1 de V_H: RSWIS (SEQ ID NO: 9); CDR2 de V_H: EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2); y CDR3 de V_H: LITTEDY (SEQ ID NO: 3) como se describen en la presente. El anticuerpo puede ser monoclonal, quimérico, humanizado, etc., y puede ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3 o IgG4. En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

También se proporciona un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ descrito, o un fragmento de unión al antígeno de este; un vector o vectores procariotas, eucariotas o de mamíferos; y células hospedadoras (procariotas, eucariotas o de mamífero) adecuadas para codificar y expresar el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este como se describe.

En otros aspectos, los anticuerpos útiles en los métodos y composiciones descritos incluyen inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos fragmentos de unión al epítipo de la integrina $\alpha\beta 8$ diferentes (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuepos humanizados, anticuerpos de camélido, anticuerpos quiméricos, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpo que muestran la actividad biológica deseada (por ejemplo, la porción de unión al antígeno), Fv ligados con disulfuro (dsFv), intracuerpos y fragmentos de unión al epítipo o antígeno de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos adecuados incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos activos desde un punto de vista inmunológico y funcional de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno.

Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ engloban anticuerpos monoclonales humanos, humanizados o quiméricos contra $\alpha\beta 8$. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ utilizados en composiciones y métodos descritos en la presente pueden ser anticuerpos desnudos, inmunoconjugados o proteínas de fusión. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico del isotipo IgG, especialmente un isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o cualquier alelo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 detectado en la población humana. Los anticuerpos de la clase IgG humana tienen características funcionales ventajosas, tales como una semivida prolongada en suero y la capacidad de mediar diversas funciones efectoras (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Capítulo 1 (1995)). El anticuerpo de la clase IgG humana se clasifica a su vez en las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, el

anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ es del isotipo o subclase IgG1 humanos. La subclase IgG1 humana tiene una actividad de ADCC y actividad de CDC elevadas en seres humanos (Clark, *Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)). En las realizaciones, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ es un anticuerpo humanizado que contiene regiones de armazón y CDR humanas de un anticuerpo progenitor, tal como el anticuerpo MEDI-hu37E1B5. En otra realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ comprende una secuencia de aminoácidos optimizada para mejorar una o más propiedades del anticuerpo, incluidas la especificidad por el antígeno, función, estabilidad, semivida/longevidad y similares.

Métodos de tratamiento que conllevan la administración de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$

Los métodos descritos proporcionan el tratamiento de la enfermedad renal, especialmente enfermedad renal fibrótica y, en particular, enfermedad renal crónica (CKD) en la que se reduce la función renal durante un periodo de tiempo y normalmente se produce una fibrosis considerable del tejido renal y se agrava con el tiempo. En general, las cinco etapas de CKD son: Etapa 1, caracterizada por daño renal con una función renal normal (velocidad de filtración glomerular estimada (GFR, por sus siglas en inglés) ≥ 90 mL/min por 1.73 m^2) y proteinuria persistente (≥ 3 meses); Etapa 2, caracterizada por daño renal con pérdida moderada de la función renal (GFR estimada de 60-89 mL/min por 1.73 m^2) con o sin proteinuria persistente (≥ 3 meses); Etapa 3, caracterizada por la pérdida de moderada a grave de la función renal (GFR estimada de 30-59 mL/min por 1.73 m^2); Etapa 4, caracterizada por pérdida grave de la función renal (GFR estimada de 15-29 mL/min por 1.73 m^2); y Etapa 5, caracterizada por insuficiencia renal que requiere diálisis o trasplante para la supervivencia. La CDK en etapa 5 también se conoce como ESRD (GFR estimada < 15 mL/min por 1.73 m^2). La velocidad de filtración glomerular (GFR), medida en mililitros por minuto (mL/min), se refiere a la velocidad con la que los riñones filtran los desechos y fluidos extra de la sangre.

Los métodos descritos que conllevan la administración de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este también son útiles para tratar la enfermedad renal y/o fibrosis asociada con el daño o lesión a las células y tejido renales, causado, por ejemplo, por la nefropatía diabética (DN), enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal aguda, enfermedad renal asociada a la hipertensión, enfermedad renal asociada a la hiperglucemia, fibrosis renal, enfermedad renal asociada a la inflamación, enfermedad renal terminal (ESRD), fibrosis renal asociada a la autoinmunidad (por ejemplo, nefritis lúpica) y fibrosis posterior al trasplante renal, y similares. La inflamación tisular general y localizada en el riñón contribuye a la patofisiología y evolución de la nefropatía diabética. Las condiciones de hiperglucemia e hipertensión que normalmente acompañan a la nefropatía

diabética, pueden además conllevar hipertensión glomerular y estrés mecánico en las células y tejido renales, lesión y desprendimiento de podocitos, inflamación del glomérulo e inflamación de los túbulos renales, todo lo cual da como resultado fibrosis (formación de cicatrices) en el riñón, y más especialmente, en el glomérulo y túbulos del riñón.

5

TRATAMIENTOS COMBINADOS

En otra realización, se pueden administrar uno o más de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ junto con otro fármaco, medicamento o agente terapéutico o compuesto, tal como el que se proporcionaría a un paciente que padece enfermedad renal o CKD. Como es el caso con frecuencia, los individuos que padecen enfermedad renal o CKD también tienen una presión sanguínea elevada. Los medicamentos y fármacos que reducen la presión sanguínea ayudan a mantener la presión sanguínea en un intervalo diana y retrasan o detienen un daño renal adicional. Los medicamentos contra la presión sanguínea comunes incluyen, sin carácter limitante, inhibidores de la acetilcolin-esterasa (ACE), antagonistas del receptor de angiotensina II (ARB), betabloqueantes, antagonistas de los canales de calcio, inhibidores de la renina directos, diuréticos y vasodilatadores. Los medicamentos y fármacos que se administran para tratar los síntomas y complicaciones de la CKD incluyen, sin carácter limitante, la eritropoyetina (EPO), eritropoyetina humana recombinante, rhEPO), medicamentos correctores del desequilibrio de electrolitos, diuréticos, inhibidores de ACE y ARB, así como también terapia con hierro y vitamina D.

20

En la coterapia, se pueden incluir opcionalmente uno o más anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en la misma composición farmacéutica como el otro fármaco o medicamento. Como alternativa, un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ puede estar en una composición farmacéutica separada y se puede administrar a la vez o en un momento diferente a uno o más de otros fármacos o medicamentos. Un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ como se describe en la presente, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ es adecuado para la administración antes, a la vez o después de la administración de otro fármaco o medicamento, o una composición farmacéutica que comprende el fármaco o medicamento. En ciertos casos, la administración de uno o más de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ a un sujeto se superpone con el momento de administración de otro fármaco o medicamento o de un fármaco o medicamento adjunto proporcionado por separado o en una composición separada.

30

COMPOSICIONES Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

La presente divulgación engloba el uso de composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ descritos y uno o más excipientes, portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En ciertas

35

realizaciones, las composiciones pueden comprender uno o más agentes con actividad biológica (por ejemplo, inhibidores de proteasas).

Los ejemplos no limitantes de excipientes, portadores y diluyentes incluyen vehículos, líquidos, tampones, agentes de isotonicidad, aditivos, estabilizantes, conservantes, solubilizantes, surfactantes, emulsionantes, agentes humectantes, adyuvantes, etc. Las composiciones pueden contener líquidos (por ejemplo, agua, etanol); diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, tampones Tris-HCl, fosfato, acetato, tampones citrato), pH y fuerza iónica; agentes detergentes y solubilizantes (por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80); antioxidantes (por ejemplo, metionina, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio); conservantes (por ejemplo, Timerosol, alcohol bencílico, *m*-cresol); y sustancias espesantes (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa). El uso de excipientes, diluyentes y portadores en la formulación de composiciones farmacéuticas es conocido en la técnica, remítase, por ejemplo, a *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición, páginas 1435-1712, Mack Publishing Co. (Easton, Pensilvania (1990)), que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

A modo de ejemplo no limitante, los portadores pueden incluir diluyentes, vehículos y adyuvantes, así como también portadores de implante, y rellenos y materiales de encapsulación sólidos o líquidos, inertes, atóxicos que no reaccionan con el principio o los principios activos. Los ejemplos no limitantes de portadores incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina fisiológica, agua y emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceite/agua). Un portador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), un aceite vegetal y mezclas adecuadas de estos.

Las formulaciones que comprenden uno o más de los anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ para la administración parenteral se pueden preparar, por ejemplo, como soluciones o suspensiones líquidas, como formas sólidas adecuadas para la solubilización o suspensión en un medio líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Las soluciones y suspensiones inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la materia utilizando diluyentes, portadores, disolventes (por ejemplo, solución acuosa tamponada, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica), agentes dispersantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión adecuados y similares. También se pueden utilizar aceites fijos, ésteres grasos, polioles y/u otros ingredientes inactivos estériles. Además, las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir soluciones inyectables estériles acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del sujeto previsto y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener agentes de suspensión y

agentes espesantes. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyecciones a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las realizaciones incluyen formulaciones farmacéuticas estériles de anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ que son útiles como tratamientos para enfermedades renales. Tales formulaciones inhibirían la unión de los ligandos a la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, y de esa manera tratarían de manera eficaz afecciones patológicas donde, por ejemplo, la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ tisular presenta una elevación anómala. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ pueden poseer una afinidad adecuada para inhibir de manera potente la actividad de la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, y pueden tener una duración de la acción adecuada para permitir una dosificación poco frecuente en seres humanos. Una duración de la acción prolongada permitirá unas programaciones posológicas mediante rutas parenterales alternadas, tales como la inyección subcutánea o intramuscular, menos frecuentes y más convenientes.

Tales formulaciones estériles se pueden crear, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución del anticuerpo. Normalmente, el anticuerpo se almacenará en forma liofilizada o en solución. Por lo general, las composiciones de anticuerpos terapéuticas se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un adaptador que permite la retirada de la formulación, tal como un tapón que se puede perforar con una aguja de una inyección hipodérmica.

Para el uso terapéutico, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad renal, especialmente fibrosis renal, se puede administrar un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, en una dosis que dependa de los requisitos del paciente, la salud física y características del paciente y la gravedad de la afección, por ejemplo, la etapa de la CKD que se está tratando. Por ejemplo, las dosificaciones se pueden determinar empíricamente teniendo en cuenta el tipo y etapa de la enfermedad renal y/o fibrosis diagnosticadas a un paciente particular. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de las presentes composiciones y métodos, debe ser suficiente para dar como resultado una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo de un periodo de tiempo dado. El tamaño de la dosis también estará determinado por la existencia, naturaleza e importancia de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañen a la administración de la dosis del anticuerpo y/o la dosis combinada con el otro agente terapéutico en un paciente particular. La determinación de la dosis adecuada para un paciente y situación particulares está comprendida en las competencias de un facultativo médico. En general, el tratamiento se inicia utilizando dosis más pequeñas, que son inferiores a la dosis óptima del agente terapéutico. A partir de entonces, la dosis se incrementa en pequeños incrementos hasta que se consigue la eficacia,

tal como la eficacia óptima. Por comodidad, y si se desea, la dosificación diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día. El tratamiento con una dosis determinada u óptima se puede prolongar durante un periodo de tiempo corto (por ejemplo, horas o días) o durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, días, semanas, meses, años).

5

MÉTODOS DE DETECCIÓN

En algunas realizaciones, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ se utiliza para la detección, por ejemplo, para obtener imágenes o para determinar la presencia de integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. En tales realizaciones, el anticuerpo se marca directa o indirectamente con un resto detectable. En consecuencia, en algunas realizaciones, se proporcionan métodos para determinar la presencia de integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en una muestra biológica obtenida de un sujeto (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*), que conllevan poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ como se describe en la presente marcado y detectar la presencia del anticuerpo marcado unido a la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$, para determinar de esa manera la presencia de integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en la muestra. Tales métodos se pueden utilizar para diagnosticar la enfermedad renal o una afección relacionada con el riñón tal como la inflamación, fibrosis renal o CKD.

En una realización, el anticuerpo se conjuga con una molécula o “resto” efectores, que pueden ser, sin carácter limitante, restos marcadores tales como marcas radioactivas o marcas fluorescentes o una molécula o resto terapéuticos. En una realización, una molécula o resto efectores pueden incluir, sin carácter limitante, un fármaco antitumoral, una toxina, un agente citotóxico, un agente radioactivo, una citocina, un segundo anticuerpo o una enzima. En otra realización, la actividad de la molécula o resto terapéuticos está modulada en virtud de su conjugación al anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo está ligado a una enzima que convierte el profármaco en un agente citotóxico.

Se puede utilizar un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este para dirigir una molécula o resto efectores a una célula que expresa integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en su superficie, especialmente células y tejido renales enfermos, por ejemplo, células y tejido de riñón con CKD. Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos que pueden ser moléculas efectoras incluyen radioisótopos, ricina, doxorrubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracina, actinomicina D, toxina diftérica, etotoxina de *Pseudomonas* (PE, por sus siglas en inglés) A, PE40, abrina, esteroides, glucocorticoides y otros agentes quimioterápicos. Los marcadores detectables incluyen, sin carácter limitante, radioisótopos, compuestos fluorescentes, compuestos bioluminiscentes o quimioluminiscentes, quelantes de metales o enzimas.

35

En una realización, se utiliza un fragmento contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este como un agente terapéutico para reducir, anular, atenuar, disminuir, bloquear o inhibir la activación de TGF- β en los riñones, especialmente, riñones con CKD o enfermos, de un individuo que lo necesita, ya sea por sí solo (sin conjugar) o conjugado a una marca detectable o un resto efector, tal como un agente de tratamiento terapéutico auxiliar, tal como un agente terapéutico o tratamiento adecuado para la enfermedad renal o CKD.

Un “resto o marca detectable” puede ser un agente o componente diagnóstico que se puede detectar por medios físicos o químicos, por ejemplo, medios espectroscópicos, radiológicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos y similares. A modo de ejemplo, las marcas detectables incluyen radiomarcas (por ejemplo, ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{67}Ga) así como también otros agentes para la obtención de imágenes aprobados por la FDA. Las marcas adicionales pueden incluir ^{32}P , tintes fluorescentes, reactivos densos electrónicamente, enzimas, biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas u otras moléculas que se puedan convertir en detectables, por ejemplo, incorporando una radiamarca en el agente de direccionamiento. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para conjugar un ácido nucleico o nanoportador a la marca, tal como utilizando métodos como los descritos en Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

Un anticuerpo o agente “marcado” o “etiquetado” es uno que está unido, ya sea covalentemente, mediante un conector o un enlace químico, o no covalentemente, mediante enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno, a una marca que permite la detección de la presencia del anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno o un agente al detectar la marca que se une al anticuerpo o agente. Las técnicas para la conjugación de agentes detectables y terapéuticos a anticuerpos son conocidas y puestas en práctica por los expertos, por ejemplo, como se describe en Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (Eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery” en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (Eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review” en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (Eds.), págs. 475-506 (1985); y Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

MODOS DE ADMINISTRACIÓN

Además de los regímenes de administración descritos en la presente, se puede administrar un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, o composiciones o formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo contra la

integrina $\alpha\beta 8$ o un fragmento de unión al antígeno de este, a sujetos mediante modos y rutas que son adecuados para administrar y/o suministrar un fármaco biológico, tal como una proteína o anticuerpo, a un sujeto. En general, los métodos de suministro o administración biológicos adecuados abarcan los modos o rutas de administración parenterales. Tales métodos de suministro incluyen, sin carácter limitante, suministro subcutáneo (SC), inyección o infusión subcutánea, suministro intravenoso (IV), por ejemplo, infusión o inyección intravenosa o inyección IV lenta. Otros modos o regímenes de suministro y administración pueden incluir, sin carácter limitante, la intraarticular, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, recta, transdérmica o intratecal. En realizaciones particulares, se proporciona el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ a un sujeto mediante administración intravenosa, por ejemplo, infusión IV o una inyección IV embolada. En otra realización particular, se proporciona el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ a un sujeto mediante inyección subcutánea, tal como una inyección subcutánea única.

Se puede administrar un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ en un régimen de tratamiento crónico. Se puede administrar el anticuerpo durante un periodo de tiempo o periodo de tiempo predeterminado seguido por un periodo sin tratamiento. También se puede repetir un régimen o ciclo posológico. En algunas realizaciones, el tratamiento (por ejemplo, la administración del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$) conlleva la administración de una primera dosis, seguida por una segunda dosis y/o una o más dosis posteriores de mantenimiento, por ejemplo, durante un periodo de tiempo que comprende múltiples días. Se pueden administrar dosis posteriores o de mantenimiento a intervalos periódicos, por ejemplo, intervalos semanales, tales como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o más, por ejemplo, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas o a intervalos mensuales o intervalos mayores, tales como anuales, después de las dosis inicial, segunda o posteriores.

También se contempla que el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ se pueda administrar mediante el suministro directo, por ejemplo, infusión o inyección, en el sitio de la enfermedad o cerca de este, cuando sea factible. Puede ser útil la inyección en el riñón o tejido renal o cerca de este. También se contempla que el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ se pueda administrar mediante la implantación de un dispositivo de liberación diferida, que libere el anticuerpo en el sitio de acción diana, tal como en el tejido renal. Los modos alternativos de administración o suministro del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ pueden incluir la inhalación (por ejemplo, inhalador o spray de aerosol), suministro intranasal o suministro transdérmico (por ejemplo, mediante un parche en la piel). Además, la administración puede ser mediante una bomba osmótica (por ejemplo, una bomba Alzet) o minibomba (por ejemplo, una minibomba osmótica

Alzet), que permita un suministro controlado, continuo y/o de liberación lenta del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o una composición farmacéutica de este, a lo largo de un periodo predeterminado. La bomba o minibomba osmótica también se puede implantar de manera subcutánea en el riñón o tejido renal, o cerca de este, como sitio diana.

5

KITS

También se proporcionan kits para el tratamiento de la enfermedad renal, tal como enfermedad renal que conlleva fibrosis, por ejemplo, CKD o DN. En una realización, el kit incluye una composición, por ejemplo, una composición terapéutica, que contiene una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ o un fragmento de unión al antígeno de este. En una
10 realización, el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, está en una forma farmacéutica unitaria.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que comprende el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, o un fragmento de unión al antígeno de este, por ejemplo, en forma acuosa o liofilizada. Si el anticuerpo está en una forma liofilizada, el kit puede incluir
15 un recipiente con un diluyente, excipiente o vehículo apropiado para su mezcla con el anticuerpo seco para preparar una solución que contenga el anticuerpo, adecuada para la administración, por ejemplo, administración intravenosa. Los recipientes pueden ser ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, sacos, envases alveolados u otras formas de recipientes adecuados que se conocen en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel
20 laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para alojar medicamentos, por ejemplo, en forma acuosa o seca. Los recipientes pueden estar en cajas para la protección del daño o la rotura. En el kit se pueden incluir una o más jeringuillas para la dilución del anticuerpo y/o para la administración.

El kit puede proporcionar además instrucciones para administrar el anticuerpo contra la
25 integrina $\alpha\beta8$, o una composición que contiene el anticuerpo, a un sujeto que padece una enfermedad renal, enfermedad renal fibrótica, por ejemplo, CKD o DN. Por lo general, las instrucciones incluirán información sobre el uso del anticuerpo o la composición para el tratamiento de la enfermedad renal, enfermedad renal fibrótica, por ejemplo, CKD o DN. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen uno o más de los siguientes: descripción del
30 anticuerpo terapéutico; programación posológica y administración para el tratamiento de la enfermedad renal, enfermedad renal fibrótica, por ejemplo, CKD o DN, o síntomas de esta; información posológica; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información sobre sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en el recipiente (de haber
35 uno) o como una etiqueta aplicada en el recipiente o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta

por separado que se suministran en el kit o con el recipiente en el kit.

La presente divulgación engloba, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen cualesquiera técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro del ámbito del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polimerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas se pueden aplicar a la producción de un polinucleótido que codifica un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o polinucleótidos de una porción o fragmento de unión al antígeno de este, y/o un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, o polipéptidos de una porción o fragmento de unión al antígeno de este como se ha descrito en la presente, y, como tales, se pueden tener en cuenta para la realización y puesta en práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos se exponen con fin de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo preparar y utilizar los métodos terapéuticos de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$

La presente divulgación engloba varios anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ y estos se utilizan de acuerdo con los métodos, composiciones y productos descritos en la presente, y/o como anticuerpos de referencia o control. Específicamente, se adquirió la licencia de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ quimérico, denominado "Chi-37E1B5" en la presente, de Los Regentes de la Universidad de California (UCSF). Un segundo anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$, denominado "hu37E1B5" en la presente, se produjo en MedImmune utilizando una secuencia humanizada que se presentó en la Solicitud PCT Internacional publicada WO 2013/026004 (UCSF). Cuando se evaluó el anticuerpo hu37E1B5 en los estudios de unión de afinidad, se observó que tenía una afinidad de unión muy deficiente por la proteína integrina $\alpha\beta 8$, como se muestra en la **FIG. 1A**. Por lo tanto, se generó un tercer anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado, denominado "MEDI-hu37E1B5" en la presente, utilizando técnicas de injerto de CDR conocidas y puestas en práctica en la técnica. Las CDR utilizadas para producir el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ se obtuvieron del anticuerpo

Chi-37E1B5 descrito anteriormente. El anticuerpo MEDI-hu37E1B5 mostró una afinidad de unión por la proteína integrina $\alpha\beta 8$ que fue similar a la del anticuerpo Chi-37E1B5 como se muestra en la **FIG. 1B**. Las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L y las CDR del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 se exponen en la **FIG. 6**. Sorprendentemente, se conservó la

5 afinidad de unión tras la humanización del anticuerpo Chi-37E1B5. Por el contrario, el anticuerpo de UCSF humanizado ("hu37E1B5") mostró una afinidad de unión muy deficiente tras la humanización a partir de Chi-37E1B5.

Además, para obtener un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ con una mejor afinidad de unión por la integrina $\alpha\beta 8$, se generó un cuarto anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ optimizado, denominado "B5-15" en la presente, a partir del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 como anticuerpo

10 progenitor utilizando técnicas de maduración de la afinidad conocidas y utilizadas en la técnica. El anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ resultante (también denominado B5-15 "optimizado" o "con optimización de la afinidad") mostró una mejora del perfil de unión a la proteína integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con el del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la

15 integrina $\alpha\beta 8$ como se muestra en la **FIG. 4**. Las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L y las CDR del anticuerpo B5-15 optimizado también se exponen en la **FIG. 6**.

Humanización del anticuerpo Chi-37E1B5 quimérico mediante injerto de CDR

Se emplearon métodos de injerto de CDR, tal como se conocen y ponen en práctica en la técnica, para humanizar el anticuerpo 37E1B5 (Chi-37E1B5) quimérico de ratón/humano y

20 para producir el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado. Para la humanización, se seleccionó la región armazón (FW) de la línea germinal humana individual más cercana con la misma clase canónica para imitar la estructura de plegamiento del anticuerpo. Se identificaron los residuos de FW murinos críticos para la retromutación, se sintetizaron los genes, la IgG se convirtió y se produjo mediante transfección transitoria

25 utilizando células 293, y los anticuerpos resultantes se sometieron a una selección en función de la unión a la integrina $\alpha\beta 8$. Este proceso produjo un clon de la cadena ligera totalmente humanizado y un híbrido con FW de la línea germinal humana con 4 residuos cruciales de ratón. Se demostró que el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado resultante de los métodos anteriores, sorprendentemente, conservaba la actividad de unión total del

30 anticuerpo 37E1B5 (Chi-37E1B5) quimérico original (**FIG. 1B**). Como se ha observado en la **FIG. 1B**, tanto el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 humanizado como el anticuerpo Chi-37E1B5 mostraron una mayor unión a la integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con el anticuerpo hu37E1B5, cuya secuencia se publicó en el documento WO 2013/026004 como se ha señalado anteriormente.

La mutagénesis de saturación en el sitio y maduración de la afinidad dan lugar a la

producción del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado con optimización de la afinidad

Además, se realizó mutagénesis de saturación en el sitio en el anticuerpo MEDI-hu37E1B5 humanizado para eliminar un residuo Cys 94 (que se ha mostrado que es un inconveniente en la estructura del anticuerpo ya que está asociado con una potencial fragmentación/escisión peptídica del esqueleto del anticuerpo) mediante la conversión en primer lugar del residuo en todos los demás 19 aminoácidos. Se realizó una selección en función de la unión a la integrina $\alpha\beta 8$ con todos los anticuerpos mutantes resultantes mediante análisis ELISA. Dependiendo del residuo en la posición 94, se redujo la afinidad de unión. Los mutantes que mejor se unen a la integrina $\alpha\beta 8$ obtenidos con este procedimiento se denominaron MEDI-hu37E1B5-C94I y MEDI-hu37E1B5-C94G. El anticuerpo mutante MEDI-hu37E1B5-C94I tuvo una reducción de la afinidad de unión a $\alpha\beta 8$ de aproximadamente 3 veces. Se seleccionó el anticuerpo MEDI-hu37E1B5-C94I humanizado para un análisis y optimización de la afinidad adicionales.

Se realizó la maduración de la afinidad de MEDI-hu37E1B5-C94I, con el sitio de N-glucosilación, utilizando un tipo de mutagénesis en la que se introducen pocos cambios en las posiciones mutadas (*parsimonious mutagenesis*), un método reconocido en la técnica. Resumiendo, en primer lugar se generaron mutaciones puntuales de saturación en cada posición de la CDR de Medi-hu37E1B5-C94I. Las mutaciones cubrieron las 6 CDR de las regiones V_H y V_L del anticuerpo. En total, se sometieron a una selección 6528 clones individuales (redundancia $>4x$) en función de la unión a la integrina $\alpha\beta 8$. A partir de estos, se identificaron 10 prototipos primarios: 3 estuvieron en CDR1- V_H ; 2 estuvieron en CDR3- V_H ; 1 estuvo en CDR1- V_L ; y 4 estuvieron en CDR3- V_L . Todos los prototipos mostraron una mejora de 2-5 veces en la unión a la integrina $\alpha\beta 8$.

Las **FIG. 2A-2C** presentan gráficos que muestran los análisis de afinidad de unión del anticuerpo MEDI-hu37E1B5 C94I contra la integrina $\alpha\beta 8$ y “prototipos” de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ representativos (denominados prototipos “P1” o “P2”) identificados en los análisis de la selección, por ejemplo, prototipos de CDR1 V_H (**FIG. 2A**), prototipos de CDR3 V_H (**FIG. 2B**) y prototipos de V_L (**FIG. 2C**). A modo de ejemplo, para designar los prototipos clonales de anticuerpos, “P” representa una placa de múltiples pocillos concretos y el número que sigue a la P representa el número del pocillo en la placa.

La **FIG. 2D** representa la alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los prototipos de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ clonales primarios representativos, designados "P2-23," "P2-33," "P2-25," "P1-21," "P1-35," "P1-42," "P2-16," "P2-19," "P2-36," y "P2-14," obtenidos a partir de la selección en los clones del anticuerpo contra la

integrina $\alpha\beta 8$ con maduración de la afinidad. Las regiones de armazón (FW1-FW4) y las CDR (CDR1-CDR3) en las regiones V_H y V_L de los clones se designan encima de las secuencias. Se indican las diferencias en los residuos aminoacídicos en las regiones de CDR con un subrayado doble.

A continuación, se creó una colección combinatoria de las 10 mutaciones puntuales más beneficiosas de manera combinatoria. Se sometieron a una selección 4608 clones en función de su unión a la integrina $\alpha\beta 8$. Se eligieron 88 clones para su confirmación. Se identificaron 6 prototipos de la evaluación combinatoria que mostraban una mejora aditiva en la unión a la integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con el mejor prototipo primario, P2-23. Los datos de unión a la integrina $\alpha\beta 8$ de la selección en la colección combinatoria se muestran en la **FIG. 3A** y **FIG. 3B**. Se eligió el anticuerpo humanizado y con optimización de la afinidad, denominado B5-15 ("B5-15 optimizado" o "B5-15 con optimización de la afinidad") expresado en células CHO (G22) como el anticuerpo óptimo final en función de su afinidad de unión a la integrina $\alpha\beta 8$ superior a la de MEDI-hu37E1B5 (**FIG. 4**) y de su potencia *in vitro* en un ensayo con TMLC luciferasa superior a la de Chi-37E1B5 (**FIG. 5**).

Bioensayo de activación de TGF- β

En la técnica se utiliza el bioensayo con TMLC luciferasa para medir la activación de TGF- β mediante integrinas, tal como la integrina $\alpha\beta 8$. El bioensayo se basa en la línea celular de pulmón de visón, TMLC, que se transfecta de manera permanente con un promotor del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) fusionado a la luciferasa, como se describe, por ejemplo, en M. Abe *et al.*, 1994, *Anal. Biochem.*, 216(2):276-284; L.A. Randall *et al.*, 1993, *J. Immunol. Methods*, 164(1):61-67; M.A. van Waarde *et al.*, 1997, *Anal. Biochem.*, 247(1):45-51; y I. Tesseur *et al.*, 2006, *BMC Cell Biology*, 7:15 (<https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-15>).

Se midió la activación de TGF- β utilizando células epiteliales de pulmón de visón transformadas (TMLC) transfectadas de manera estable con una porción del promotor del inhibidor activado del plasminógeno 1 (PAI-1) ligado a un marcador de luciferasa (células proporcionadas por Daniel Rifkin, Universidad de Nueva York) y cultivadas como se ha descrito previamente (M. Abe *et al.*, 1994, *Anal. Biochem.*, 216(2):276-284). Se cocultivaron células HeLa-B8 (1.5×10^4 células/pocillo) con TMLC (1.5×10^4 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos durante toda la noche en DMEM con contenido elevado de glucosa (Life Technologies/Thermo Fisher) suplementado con un 10 % de FBS y 10 U/mL de penicilina G, 10 μ g/mL de sulfato de estreptomicina G con o sin anticuerpo de prueba. Después de 16 horas, se retiraron los sobrenadantes y se lisaron las células en 100 μ L de tampón de lisis celular (Promega) y se determinó la actividad luciferasa utilizando el sistema de ensayo con luciferasa (Promega) transfiriendo 80 μ L de lisado y mezclándolo con 80 μ L de sustrato en una placa de

96 pocillos de fondo transparente y con paredes blancas. Las muestras se leyeron inmediatamente en un luminómetro y se mostraron como unidades de luciferasa relativas (RLU, por sus siglas en inglés) o porcentaje de respuesta máxima, determinado utilizando TMLC solas como la referencia o control de un 0 % y TMLC cocultivadas con células HeLa-B8 como una respuesta máxima o de un 100 % en el ensayo.

Generación de la línea celular HeLa-B8

Las células HeLa-B8 son un derivado de la línea celular HeLa (ECACC). Resumiendo, se mantuvieron células HeLa confluentes en MEM (Life Technologies/Thermo Fisher) suplementado con un 10 % de FBS, 1 % de aminoácidos no esenciales (Life Technologies/Thermo Fisher) y 10 U/mL de penicilina G (Life Technologies/Thermo Fisher), 10 µg/mL de sulfato de estreptomicina G y antes de su uso, se retiraron las células utilizando accutase y se resuspendieron en PBS en una concentración de 1×10^6 células/mL. Se añadió tinte de células muertas aqua fijable LIVE/DEAD (Life Technologies/Thermo Fisher, 1:1000) a las células en hielo durante 20 minutos. Las células se sedimentaron y se lavaron en tampón de tinción de citometría de flujo frío (eBioscience). Se añadió 37E1B5-mIgG1 recombinante o isotipo-mIgG1 (100 µg/mL de 1×10^6 células/mL) a las células y se incubó en hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron y se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario contra ratón-Alexa-647 (Jackson ImmunoResearch, 1:200) a las células y se incubó en hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron y lavaron y se resuspendieron en una concentración de 10×10^6 células/mL en medio para células HeLa que contenía un 1 % de FBS. Las células se clasificaron en un clasificador celular BD FACSAria III (BD Biosciences) utilizando el anticuerpo Chi-37E1B5. A continuación, se cultivaron las células clasificadas $\alpha\beta 8^+$ elevada en medio para células HeLa completo, se expandieron y se guardaron para un uso futuro. Las células siguieron siendo positivas para una expresión elevada de $\alpha\beta 8$ durante al menos 1 mes de cultivo.

Características del anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$ humanizado y con optimización de la afinidad

La secuencia de aminoácidos (aa) de la región variable de la cadena ligera (L) (V_L , κ) del polipéptido que es el anticuerpo B5-15 humanizado y optimizado tiene 107 residuos aminoacídicos que se muestran a continuación:

V_L de B5-15 (κ)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYLSWFQQKPGKAPKSLIYYANRLVDGVP
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQYDVFPYTFGGGTKVEIK (107 aa) (SEQ ID NO: 13)

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (H) (V_H) del

polipéptido que es el anticuerpo B5-15 tiene 116 residuos aminoacídicos que se muestran a continuación:

V_H de B5-15

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFVFSRSWISWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST
 5 INYTSSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAILITTEDYWGQGTTVTVSS (116
 aa) (SEQ ID NO: 12)

En particular, la región variable de la cadena ligera (L) (V_L) del anticuerpo B5-15 incluye tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran a continuación:

CDR1 de V_L: KASQDINKYLS (SEQ ID NO: 10)
 10 CDR2 de V_L: YANRLVD (SEQ ID NO: 5)
 CDR3 de V_L: LQYDVFPYT (SEQ ID NO: 11)

La región variable de la cadena pesada (H) (V_H) del anticuerpo B5-15 incluye tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran a continuación:

CDR1 de V_H: RSWIS (SEQ ID NO: 9)
 15 CDR2 de V_H: EINPDSSTINYTSSL (SEQ ID NO: 2)
 CDR3 de V_H: LITTEDY (SEQ ID NO: 3)

Se presenta una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos Chi-37E1B5, hu37E1B5, MEDI-hu37E1B5 y B5-15 contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en la **FIG. 6**.

Ejemplo 2

Método de detección inmunohistoquímico (IHC) para la expresión de la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en tejido humano fijado en formol e incluido en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$

Método IHC

25 Para preparar cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE), se retiraron del almacenamiento portaobjetos sobre los cuales se habían fijado las muestras de tejido. Los portaobjetos se marcaron de manera apropiada y se cargaron en soporte(s) Autostainer XL. Los portaobjetos teñidos se desparafinaron y se rehidrataron con agua del grifo.

Los soportes de los portaobjetos se transfirieron a una olla a presión que contenía
 30 solución de recuperación del antígeno Dako (Dako S1699). Se realizó la recuperación del antígeno mediada por calor durante 2 minutos a presión (SP DDCP_5024) con las siguientes alteraciones: tras la recuperación del antígeno, se permitió que la olla a presión se enfriara y despresurizara; se colocó la olla a presión en una corriente de agua del grifo y se quitó la tapa; se enfrió la olla a presión durante 5 minutos y a continuación su contenido se enjuagó con una
 35 corriente de agua del grifo; se retiraron los portaobjetos y se lavaron en una corriente de agua

del grifo durante 5 minutos. Los portaobjetos se bloquearon con peroxidasa (3 % de peróxido de hidrógeno en metanol) durante 10 minutos.

Se realizó inmunohistoquímica de la siguiente manera:

- Marcar los portaobjetos con un bolígrafo PAP en las ubicaciones apropiadas (para dibujar barreras hidrófobas en el tejido);
- Cargar los portaobjetos en un dispositivo de autotinción Dako;
- Lavar en PBS de Dulbecco estándar con un 0.1 % de Tween 20 (PBST) x1 (una vez);
- Incubar los portabojetos en suero de caballo al 2.5 % (del kit ImmPRESS) 20 minutos;
- Paso de soplado; Incubar con anticuerpos Calico CAL16 (un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ recombinante de conejo purificado) a una concentración de 1.0 ug/mL diluidos en PBST, control isotópico de inmunoglobulina de conejo Dako a una concentración de 1.0 ug/mL o Vector Ki67 con una dilución 1:200 como control del experimento durante 60 minutos;
- Lavar en PBST x1;
- Incubar en polímero marcado, Vector ImmPRESS™ HRP, kit de detección polimérico con anticuerpo de caballo contra IgG de conejo (Peroxidasa) (n.º de catálogo MP-7401) durante 30 minutos;
- Lavar en PBSTx1;
- Incubar en PBST durante 5 minutos;
- Lavar en PBSTx1; Cambiar a desecho peligroso x1;
- Incubar en DAB + sustrato/cromógeno (Dako, K3468) durante 5 minutos;
- Lavar en agua pura (lo hace automáticamente el dispositivo de autotinción) x1;
- Retirar los portaobjetos del dispositivo de autotinción Dako;
- Contrateñir con Hematoxilina I de Gill, deshidratar y colocar cubreobjetos sobre los portaobjetos utilizando el programa 9; y
- Retirar los portaobjetos del dispositivo para colocar cubreobjetos Leica CV5030 y dejar que se sequen/asienten.

Tabla 1

PROGRAMA N.º 9		CONTRATINCIÓN Y DESHIDRATACIÓN		
PASO	ESTACIÓN	REACTIVO	TIEMPO [M:S]	EXACTO
1	LAVADO 5	CORRIENTE DE AGUA DEL GRIFO	3:00	NO
2	11	HEMATOXILINA DE GILL I	0:25	SÍ

PROGRAMA N.º 9		CONTRATINCIÓN Y DESHIDRATACIÓN		
PASO	ESTACIÓN	REACTIVO	TIEMPO [M:S]	EXACTO
3	LAVADO 4	CORRIENTE DE AGUA DEL GRIFO	4:00	NO
4	12	ALCOHOL ÁCIDO AL 1%	0:02	SÍ
5	LAVADO 2	CORRIENTE DE AGUA DEL GRIFO	5:00	NO
6	13	IMS AL 95 %	1:30	NO
7	14	IMS	1:00	NO
8	15	IMS	1:30	NO
9	16	IMS	1:00	NO
10	17	XILENO	2:00	NO
11	18	XILENO	2:00	NO
12	SALIDA	XILENO		/

Como alternativa, se pueden realizar los pasos en el “Programa n.º 9” manualmente.

Para hacer esto, se pueden colocar los portaobjetos en los reactivos mencionados durante el tiempo mencionado. Se podría utilizar el programa automático o realizar los pasos manualmente.

Ejemplo 3

La integrina $\alpha\beta 8$ se expresa preferencialmente en el riñón

El análisis de la tinción IHC como se ha descrito en el Ejemplo 2 se llevó a cabo en numerosas muestras de tejido para determinar la expresión y distribución de la integrina $\alpha\beta 8$ en tejidos humanos. La siguiente Tabla 2 presenta los resultados del análisis IHC.

Tabla 2

Tejido	N	Número de muestras que expresan la integrina $\alpha\beta 8$	Ubicación
Corazón	3	0	
Pulmón	3	0	
Riñón	3	3	Glomerular y tubular
Bazo	3	0	
Ganglio	3	0	

	Tejido	N	Número de muestras que expresan la integrina $\alpha v \beta 8$	Ubicación
5	linfático			
	Timo	3	2	Células epiteliales que rodean los corpúsculos de Hassall
	Amígdala	3	2	Epitelio escamoso estratificado trabecular
10	Hígado	3	0	
	Vesícula biliar	3	1	Epitelio cilíndrico con tinción citoplasmática débil
	Páncreas	3	1	Pequeña área de expresión positiva estromal
	Cerebelo del encéfalo	3	1	Parénquima homogéneo débil
15	Cerebelo del encéfalo	3	2	Parénquima homogéneo débil
	Tiroides	3	0	
	Suprarrenal	3	2	Células de la corteza - tinción de la integrina $\alpha v \beta 8$ intersticial rara detectada Capilares
20	Parótida	3	0	
	Piel	3	0	
	Músculo esquelético	3	0	
25	Estómago	3	0	
	Íleon	3	2	Células nerviosas adventicias
	Colon	3	0	
	Ovario	3	1	?Células nerviosas
30	Trompa de Falopio	3	1	Epitelio cilíndrico débil raro
	Miometrio del útero	3	0	
	Endometrio	3	1	Epitelio de la glándula endometrial
35	Endocuello uterino	3	1	Escamoso estratificado débil

Tejido	N	Número de muestras que expresan la integrina $\alpha\beta 8$	Ubicación
Exocuello uterino	3	2	Membrana epitelial Escamoso cilíndrico/estratificado
Mama	3	0	
	3	3	Trofoblasto escaso débil, membrana rara
Próstata	3	1	Epitelio glandular moderado
Testículos	3	2	Espermatocito primario citoplasmático débil
Vesícula seminal	3	2	Epitelio glandular/vesicular
Vejiga	3	0	
Uréter	3	0	

Como se observa en la Tabla 2, el tejido renal expresa un nivel elevado de la integrina $\alpha\beta 8$. Además, se observó que el tejido renal humano estaba muy enriquecido en integrina $\alpha\beta 8$ en comparación con otros 33 tipos de tejido humano, concretamente, corazón, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, amígdala, hígado, vesícula biliar, páncreas, cerebelo del encéfalo y cerebro, tiroides, suprarrenal, parótida, piel, músculo esquelético, estómago, íleon, colon, ovario, trompa de Falopio, miometrio del útero, endometrio, endocuello uterino, exocuello uterino, mama, placenta, próstata, testículos, vesícula seminal, vejiga y uréter. En la **FIG. 7A** (parte de la izquierda), se observó una tinción marcada de integrina $\alpha\beta 8$ en tejido renal humano y especialmente en los podocitos y células epiteliales de los túbulos en el tejido renal. Por el contrario, se observó que la tinción era débil, esporádica o inexistente en los otros tipos de tejidos que se examinaron.

Para los análisis de la tinción IHC presentados en la **FIG. 7A**, se utilizó el clon CAL16 del anticuerpo monoclonal de conejo contra la integrina $\alpha\beta 8$ (un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ recombinante de conejo purificado de Calico Biolabs Inc. (Pleasanton, CA)). Este anticuerpo, que está comercializado, se optimizó y validó respecto a su unión a la integrina $\alpha\beta 8$ expresada tanto en tejidos humanos como de ratón.

Ejemplo 4

La expresión de $\alpha\beta 8$ aumenta en el tejido renal de pacientes con enfermedad renal crónica (CKD)

Se evaluó la expresión de la integrina $\alpha\beta 8$ en muestras de tejido renal humano tomadas de pacientes con nefropatía diabética (DN) y de individuos con tejido renal normal como

controles “sanos”. Se obtuvieron muestras de tejido renal con DN del Biobanco Addenbrooke's y Biobanco MedImmune (Gaithersburg). Se obtuvieron muestras renales normales del banco de tejidos MedImmune (Cambridge). Más específicamente, se obtuvieron muestras de 9 pacientes que padecían nefropatía diabética y enfermedad renal crónica, DN-CKD, mediante punción biopsica. Se utilizaron muestras de 4 individuos “normales” sanos como controles. En las muestras normales, fueron evidentes algunas áreas de inflamación crónica leve, pero no afectaron al diseño del estudio o los resultados (**FIG. 7A**, parte de la derecha).

Como se ha descrito en el Ejemplo 3, el anticuerpo utilizado en los experimentos de tinción IHC fue el clon CAL16 del anticuerpo monoclonal de conejo contra la integrina $\alpha\beta8$ (anticuerpo recombinante de conejo purificado) de Calico Biolabs Inc. (Pleasanton, CA). Después de la tinción, un patólogo especialista con experiencia revisó los portaobjetos.

Los resultados de este análisis de la tinción IHC fueron de la siguiente manera: En los individuos sanos, los glomérulos mostraron tinción positiva con el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ en comparación con la tinción con el anticuerpo de control con emparejamiento de isotipo; la tinción con el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ fue generalmente más ligera (3/4 muestras), aunque una muestra (1/4) mostró una tinción marcada en los podocitos (patrón de podocitos). En los túbulos renales, se observó una tinción multifocal ligera en los túbulos corticales, membrana, de basal a apical. (**FIG. 7A**, parte de la derecha). No pareció que la tinción de los túbulos estuviera en los túbulos colectores. El patrón de tinción global de riñones humanos sanos tuvo lugar principalmente en los glomérulos, similar a ratones transgénicos sanos, mientras que se observó tinción de la integrina $\alpha\beta8$ mediante IHC en las estructuras tubulares tanto en pacientes con CKD como en los ratones transgénicos UUO.

En los pacientes que padecían DN-CKD, el grado de tinción de $\alpha\beta8$ en los glomérulos fue variable y estuvo en relación con el grado de daño glomerular. La pérdida de podocitos en el tejido enfermo se correlacionó con una tinción menor. Debido a la pérdida de podocitos en el riñón enfermo, la intensidad de la tinción fue variable. La tinción de los túbulos en tejido renal con DN-CKD varió de tinción leve a tinción marcada del citoplasma y la membrana, principalmente en las áreas de inflamación/fibrosis. Se observó un aumento de la expresión global de la integrina $\alpha\beta8$ en riñones con DN-CKD como pone en evidencia el patrón de tinción del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$. La sobreexpresión se observó principalmente en los túbulos renales. (**Fig. 7B**). Basándose en la tinción con el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, el cambio en la expresión de la integrina $\alpha\beta8$ en el tejido renal con DN-CKD pareció que se aproximaba adecuadamente a la expresión de la integrina $\alpha\beta8$ en riñones de modelos en ratones que mostraban fibrosis e inflamación tubulointersticial.

La **FIG. 7C** presenta microfotografías de células del tejido renal obtenidas de pacientes

humanos que padecen enfermedad renal. Las células del tejido renal se tiñeron con un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ y se analizaron mediante IHC. Los resultados de la tinción IHC demostraron que la proteína integrina $\alpha\beta 8$ presenta un aumento regulado en células y tejido renales de pacientes humanos con nefropatía diabética (DN) en comparación con células y tejido renales normales (**FIG. 7C**, fila superior). En particular, en las muestras de tejido renal obtenidas de pacientes con DN y CKD, se observó sobreexpresión de integrina $\alpha\beta 8$ esencialmente en los túbulos (**FIG. 7C**, fila inferior). Los glomérulos de los riñones en pacientes con DN mostraron una reducción de la expresión de la integrina $\alpha\beta 8$, probablemente como consecuencia de la pérdida de podocitos debido al daño y fibrosis del tejido renal. Las áreas no teñidas en las muestras de tejido renal de pacientes que padecen DN en Etapa 2 y Etapa 3 son la matriz fibrótica que ha reemplazado las nefronas funcionales, que se señalan con un asterisco (*) en la **FIG. 7C**. Este resultado resalta la importancia de actuar sobre la integrina $\alpha\beta 8$ para proteger el epitelio funcional. Para los análisis de la tinción IHC presentados en la **FIG. 7C**, se utilizó el clon CAL16 del anticuerpo monoclonal de conejo contra la integrina $\alpha\beta 8$ (un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ recombinante de conejo purificado de Calico Biolabs Inc. (Pleasanton, CA)). Este anticuerpo, que está comercializado, se optimizó y validó respecto a su unión a la integrina $\alpha\beta 8$ expresada tanto en tejidos humanos como de ratón.

Ejemplo 5

El gen *itgb8* presenta un aumento regulado en riñones de individuos con CKD y presenta una expresión elevada en comparación con otras integrinas β

Los análisis transcriptómicos proporcionaron evidencia de que en los riñones de pacientes con CKD humanos hay una expresión mayor de *ITGB8* (que codifica la integrina $\beta 8$) en comparación con los riñones de sujetos humanos sanos. En estos análisis, se midió la expresión de ARNm de la familia de la integrina β relativa en homogeneizados de riñón con CKD humano. Resumiendo, se homogeneizó 1 sacabocados (dispositivo para obtener sacabocados de 2 mm) de biopsias renales en tampón de lisis RLT utilizando un TissueLyserII. Se aisló el ARN de los lisados con las columnas del Minikit RNAeasy. La concentración de ARN se midió con un Nanodrop y se ajustaron las concentraciones para realizar análisis de qPCR utilizando el Kit en 1 paso TaqMan RNA-to-Ct y sondas específicas para todas las integrinas, y se incluyó *hprt-1* como gen de mantenimiento. La **FIG. 8A** representa un gráfico de barras que muestra los niveles de expresión relativa de ARNm que codifica diferentes isoformas de integrinas β en riñones de pacientes humanos que padecen CKD. Como se observa en la **FIG. 8A**, la expresión del ARNm de la integrina $\beta 8$ predominó respecto a la de otras integrinas β (es decir, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ y $\beta 6$) en los riñones de pacientes con CKD.

En otros experimentos, los perfiles transcriptómicos de 157 pacientes que padecían

diferentes grados de CKD se analizaron y compararon con los de los donantes vivos (LD, por sus siglas en inglés). Doce (12) de los 157 pacientes padecían nefropatía diabética (DN). Se separaron los compartimentos glomerulares y túbulointersticiales y se realizó el análisis de la expresión de genes hologenómico tal como describen S. Martini *et al.* (2014, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 25(11):2559-2572). En este análisis, se evaluó en primer lugar la expresión de ARNm de *itgb8* en el compartimento glomerular renal en relación con la nefrina (codificada por el gen NPHS1). La nefrina es una proteína de los podocitos necesaria para el funcionamiento correcto de la barrera de filtración renal, que está constituida por células endoteliales fenestradas, la membrana basal glomerular y los podocitos de las células epiteliales. Las mutaciones en NPHS1 se asocian con el síndrome nefrótico congénito. La expresión de NPHS1 es un indicador del número de podocitos. En la CKD, según disminuye el número de podocitos, hay una reducción de la expresión de NPHS1. La **FIG. 8B** muestra que la expresión de ARNm de *itgb8* se correlacionó positivamente con el marcador génico de podocitos, NPHS1, y fomentó la expresión de este gen en los podocitos renales. Para evaluar mejor la expresión de *itgb8* en la corteza glomerular teniendo en cuenta la pérdida de podocitos, se normalizó la expresión de *itgb8* mediante NPHS1. Por lo tanto, los datos se normalizaron para la expresión de nefrina (codificada por el gen NPHS1) para entender los cambios de expresión dentro de los podocitos en condiciones de pérdida de podocitos como en la enfermedad renal crónica. La **FIG. 8C** presenta un gráfico de cajas que muestra que la expresión de ARNm de *itgb8* fue superior en el intersticio tubular (TI, por sus siglas en inglés) de muestras renales de pacientes con DN respecto a su expresión en donantes vivos (LD) como controles sanos. La **FIG. 8D** presenta un gráfico de puntos que muestra que la expresión de ARNm de *itgb8* se correlacionó claramente con el puntaje de activación de TGF- β en CKD en el TI de pacientes con CKD, lo que respalda la función de la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ en la activación de TGF- β en CKD.

En una cohorte separada, se obtuvieron los perfiles del intersticio tubular (Tub) y el glomérulo (Glom) de muestras renales obtenidas de 20 pacientes humanos con DN en comparación con el TI y glomérulo de muestras renales obtenidas de 19 pacientes LD obteniendo perfiles transcripcionales hologenómicos utilizando secARN. Los resultados mostraron que la expresión de ARNm de *itgb8* aumentó en el intersticio tubular de pacientes con DN (indicado como “Tub-DN” en el gráfico) respecto a los donantes vivos (LD), (**FIG. 8E**). El descubrimiento de los niveles elevados de ARNm de *itgb8* en el intersticio tubular de pacientes con enfermedad renal, es decir, nefropatía diabética, se correlaciona con condiciones de daño renal y fibrosis en estos pacientes con enfermedad renal.

Las observaciones clave de estos análisis fueron las siguientes: La expresión de ARNm de *itgb8* estuvo elevada en el glomérulo de muestras de pacientes con DN después de la

normalización respecto a nefrina (NPHS1), un gen marcador de podocitos. La expresión de ARNm de *itgb8* estuvo elevada en el intersticio tubular (TI) de pacientes con DN. En el TI, la expresión de ARNm de *itgb8* se correlacionó positivamente con el puntaje de activación de TGF- β putativo, lo que concuerda con la función propuesta de la integrina $\alpha\beta8$ para controlar la activación de TGF- β en las enfermedades fibróticas. Se observaron resultados similares tras el análisis de la expresión de ARNm de WT1, otro gen marcador de podocitos (datos que no se muestran). Estas observaciones confirman el descubrimiento de que en el riñón con CKD humano, la expresión de la integrina $\alpha\beta8$ se correlaciona con la fibrosis en CKD, que está asociada con la activación de TGF- β , un agente importante para provocar y agravar la fibrosis renal.

Ejemplo 6

Eficacia *in vivo* de anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$

Se utilizó un modelo de fibrosis en ratón para estudiar la eficacia *in vivo* del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ para tratar la fibrosis en el riñón. Este modelo conllevó realizar un procedimiento denominado oclusión ureteral unilateral (UUO) (ligadura unilateral del uréter) en los animales. Para el modelo, los ratones macho $\alpha\beta8$ transgénicos (Tg) humanizados se sometieron a un procedimiento simulado o UUO que conllevó una duración de la lesión de cinco (5) y ocho (8) días. Se produjeron ratones Tg cruzando un ratón en el que se inactivó el gen $\alpha\beta8$ (ratón $\alpha\beta8$ KO) con un ratón $\alpha\beta8$ humana BAC transgénico. La generación de ratones Tg que expresan el gen *ITGB8* humano se describe, por ejemplo, en S. Minagawa *et al.*, 2014, *Sci. Transl. Med.*, 6(241):241ra79 (doi: 10.1126/scitranslmed.3008074). Los ratones $\alpha\beta8$ transgénicos humanizados expresaron la integrina $\alpha\beta8$ humana principalmente en el glomérulo renal, en un patrón similar al observado en seres humanos sanos. La inducción de la fibrosis tras la ligadura ureteral (UUO) incrementó la expresión de integrina $\alpha\beta8$ en los túbulos renales, de manera similar a lo que se observa en CKD en seres humanos.

El agente de prueba utilizado fue B5-15, el anticuerpo IgG1 humanizado y con optimización de la secuencia contra la integrina $\alpha\beta8$ como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo de control fue un anticuerpo IgG con isotipo emparejado.

Protocolo para el estudio en el modelo en ratón Tg de UUO:

Modelo: 91 ratones macho transgénicos (Tg) $\alpha\beta8$ humanizados se sometieron a un procedimiento de oclusión ureteral unilateral (UUO) o simulado; duración de la lesión de 5 u 8 días. Los animales en los grupos recibieron dosis con el respectivo tratamiento de anticuerpo en días alternos (DA) en los días -1, 1, 3, 5 y 7. A los animales con un tratamiento simulado se les administró vehículo en los días 0, 2, 4 y 6.

Edad de los ratones al comienzo del estudio: 92-121 días de edad.

Agentes/compuestos de prueba: se administraron el anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ (anticuerpo monoclonal Chi-37E1B5), anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ con optimización de la secuencia, control de isotipo de IgG y/o vehículo (PBS) con las dosis, frecuencias y a los grupos mostrados en la Tabla 3 a continuación.

5 **Tabla 3**

N/grupo (N. ^{os} de los animales)	Raza	Compuesto e intervalo de administración (Día (D))	Dosis y ruta	Intervalo de preparación quirúrgica (Día (D))	Condición
10 n = 6 (3428 – 3433)	Tg	Control IgG D-1, D1, D3, D5, D7 Vehículo D0, D2, D4, D6	10 mg/kg N/A	Una vez en D0	Cirugía simulada
15 n = 10 (3434 – 3443)	Tg	Control IgG D-1, D1, D3 Vehículo D0, D2, D4, D6	10 mg/kg N/A	Una vez en D0	UUO permanente
20 n = 10 (3454 – 3463)	Tg	D-1, D1, D3, D5, D7 Vehículo D0, D2, D4, D6	10 mg/kg N/A	Una vez en D0	UUO permanente
25 n = 10 (3464 – 3473)	Tg	B5-15 D-1, D1, D3, D5, D7 Vehículo D0, D2, D4, D6	10 mg/kg N/A	Una vez en D0	UUO permanente

30 Criterios de valoración del estudio: Morfología: Cuerpo (inicial, final, Δ); Peso renal (obstruido y contralateral) e índice; y Longitud de la tibia.

Expresión de ARNm cortical renal mediante Luminex:

- Factor de crecimiento del tejido conectivo (*CTGF*)
- Actina del músculo liso α (*ACTA2*)
- Fibronectina 1 (*FN1*)

- Colágeno 1a1 (*Col1a1*)
- Colágeno 3a1 (*Col3a1*)

Contenido de hidroxiprolina cortical renal

Lectura histológica: Tinción con rojo picrosirio (PRS, por sus siglas en inglés) y $\alpha\beta 8$.

5 Los resultados de la tinción IHC de tejido renal de ratones $\alpha\beta 8$ transgénicos humanizados con anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta 8$ para determinar la fibrosis renal y el alcance de esta se muestran en las **FIG. 9A-9D**. Las microfotografías de tinción IHC con anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ como se muestra en las **FIG. 9A** y **9B** demuestran que los ratones $\alpha\beta 8$ transgénicos humanizados expresaron la integrina $\alpha\beta 8$ principalmente en el
10 glomérulo del riñón, de manera similar a lo que se observa habitualmente en el riñón humano sano. Se demostró que la inducción de fibrosis con el procedimiento de UUO incrementó la expresión de integrina $\alpha\beta 8$ en los túbulos renales (**FIG. 9C** y **9D**), de manera similar a lo que se observa habitualmente en los riñones de seres humanos que padecen CKD. Las **FIG. 9E-9H** ilustran los resultados obtenidos a partir de los estudios *in vivo* utilizando el procedimiento UUO
15 como se ha descrito anteriormente y como se resume en la Tabla 3.

Como se muestra en la **FIG. 9E**, los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de ARNm de *Col1a1* 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Como se muestra en la **FIG. 9F**, los anticuerpos
20 Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de *Col3a1* 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Como se muestra en la **FIG. 9G**, UUO incrementó la expresión de ARNm de fibronectina 1 (FN-1) cortical en riñón obstruido 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles sometidos a un procedimiento simulado. Los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y
25 B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de FN-1 a los 8 días de lesión en comparación con los controles de UUO. Como se muestra en la **FIG. 9H**, el anticuerpo B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta 8$ atenuó un incremento inducido por UUO en la expresión de ARNm de actina del músculo liso α (α -SMA) 8 días después de la cirugía UUO
30 respecto a los controles de UUO. El incremento Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) no redujo el incremento inducido por UUO en α -SMA. Una reducción de α -SMA es importante ya que la presencia de células α -SMA⁺ es perjudicial para la función renal normal. Esto se debe a que estas células son contráctiles, contribuyen directamente a la remodelación
35 fibrótica, y también son sumamente sintéticas y producen mediadores proinflamatorios y

profibróticos. Como se muestra en la **FIG. 9I**, los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) contra la integrina $\alpha\beta8$ atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) 8 días después de la cirugía UUO respecto a los controles de UUO. Como se muestra en la **FIG. 9J**, UUO incrementó el % de hidroxiprolina cortical en riñón obstruido (OH-P) 8 días después de la cirugía UUO. Los anticuerpos Chi-37E1B5 (etiquetado como Ab Avb8 progenitor) y B5-15 (etiquetado como Ab Avb8 de partida) atenuaron los incrementos inducidos por UUO en el % de OH-P a los 8 días de la lesión por UUO en comparación con los controles. La lectura de la hidroxiprolina cortical renal sirve como una medición del contenido fibrótico/fibrosis del tejido renal.

Resumiendo, a los 8 días después de la cirugía UUO, Chi-37E1B5 y B5-15 atenuaron los incrementos inducidos por UUO en la expresión de ARNm de Col1a1, Col3a1, FN-1 y CTGF y el % de contenido de hidroxiprolina. Adicionalmente, a los 8 días después de la cirugía UUO, B5-15 atenuó un incremento inducido por UUO en la expresión de ARNm de α -SMA.

Los dos anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$ utilizados en este Ejemplo, Chi-37E1B5 y B5-15, se administraron a los ratones en el modelo UUO con la dosis máxima. El objetivo de este estudio fue demostrar si un anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$ podría reducir de manera eficaz la fibrosis inducida por TGF- β provocada por la asociación con la integrina $\alpha\beta8$. Esperaríamos ver una diferencia en la reducción de la fibrosis inducida por TGF- β con las dosis más bajas (es decir, CE_{50}) de cualquiera de estos anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$. Es decir, esperaríamos ver una reducción mayor en la fibrosis inducida por TGF- β en el modelo UUO con el tratamiento con B5-15 que con Chi-37E1B5 a una dosis equivalente. Esto se debe principalmente a que B5-15 demuestra una afinidad de unión mayor por la integrina $\alpha\beta8$ que Chi-37E1B5 (véanse las **FIG. 1B** y **FIG. 4**) y porque B5-15 tiene una potencia *in vitro* mayor que Chi-37E1B5 (véase la **FIG. 5**). El tratamiento con B5-15 tiene ventajas respecto a Chi-37E1B5 porque se conseguiría una administración de dosis al paciente menos frecuente o una administración de dosis menores a los pacientes, lo que conllevaría menos eventos adversos, en caso de que los hubiera, y una mayor adhesión al tratamiento por parte del paciente.

Como se ha analizado anteriormente, el receptor diana de la integrina $\alpha\beta8$ tiene una expresión muy elevada y se expresa de manera preferente en el tejido renal enfermo/fibrótico y se une en el tejido renal mediante el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta8$, que interfiere con la interacción de unión de la integrina $\alpha\beta8$ al TGF- β latente. Los anticuerpos contra la integrina $\alpha\beta8$ como se divulgan en la presente son especialmente convenientes y beneficiosos para tratar la enfermedad renal fibrótica en sujetos que padecen enfermedad renal porque el uso de un anticuerpo dirigido contra la integrina $\alpha\beta8$, que se une al TGF- β latente, obvia y evita la

actuación sistémica sobre TGF- β , y por lo tanto evita problemas potencialmente serios que acompañarían una inhibición sistémica de TGF- β en otros tejidos en el sujeto que se está sometiendo al tratamiento.

Ejemplo 7

5 Estudios ex vivo que utilizan el anticuerpo B5-15 contra la integrina $\alpha\beta 8$

Para evaluar la unión y acoplamiento del anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$ (B5-15) con el receptor de la integrina $\alpha\beta 8$ diana de TGF- β , se evaluó la activación posterior de la vía de señalización de TGF- β en lisados renales midiendo SMAD2/3 renal total y fosforilada. Resumiendo, las muestras renales de los animales utilizados en el estudio descrito en el

10 Ejemplo 5 se homogeneizaron en un tampón de lisis específico (diluido 1x en agua destilada + 10 μ L/mL de inhibidor de proteasa y fosfatasa) utilizando un TissueLyser II; se midió el contenido proteico utilizando el ensayo con ácido bicinonínico (BCA) tal como lo conocen y utilizan los expertos y la técnica; y se normalizó la concentración proteica en todas las muestras. Se analizaron las formas total y fosforilada de la proteína SMAD2/3 (fosfo-SMAD2

15 (Ser465/467)/SMAD3 (Ser423/425)) mediante ELISA siguiendo el protocolo del fabricante. Como se ha mencionado anteriormente, los miembros de la familia Smad de moléculas de transducción de señales son componentes de la vía intracelular que transmite señales de TGF- β desde la superficie celular al interior del núcleo.

Los resultados de los experimentos mostraron que el anticuerpo B5-15 contra la

20 integrina $\alpha\beta 8$ redujo la vía de señalización de TGF- β posterior en los riñones de ratones transgénicos que portan el gen que codifica $\alpha\beta 8$ humana ("ratones $\alpha\beta 8$ transgénicos humanizados") que se han sometido a una oclusión ureteral unilateral (UUO) de 5 días de duración. En las **FIG. 10A** y **FIG. 10B**, * = ≤ 0.05 y **** = ≤ 0.0001 . En las **FIG. 10A** y **FIG. 10B**, para "Tratamiento simulado + NIP228 (control isotópico de IgG)", n=6; para "UUO + NIP228

25 (control isotópico de IgG)", n=8; y para "UUO + B5-15 (el anticuerpo contra la integrina $\alpha\beta 8$)", n=8.

Como se observa en las **FIG. 10A** y **10B**, la cirugía UUO en ratones $\alpha\beta 8$ humanizados dio como resultado un aumento en la fosforilación de SMAD2/3 dependiente de TGF- β de 5.7 veces frente al grupo con un tratamiento simulado. Cabe señalar que el anticuerpo contra la

30 integrina $\alpha\beta 8$ (B5-15) disminuyó significativamente la activación de SMAD2/3 en 1.6 veces en comparación con el tratamiento con el control isotópico. Los niveles totales de SMAD2/3 se incrementaron en todos los grupos UUO en comparación con los animales con un tratamiento simulado.

Ejemplo 8

35 Tratamiento de un sistema celular de tricultivo utilizando B5-15, un anticuerpo

contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$

Para evaluar el efecto de B5-15 (un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$) en un modelo de glomerulosclerosis humana (descrito en Waters *et al.*, 2017, *J Pathol*, 243(3):390-400), tratamos el sistema celular de tricultivo (donde las células endoteliales glomerulares, los podocitos, y las células mesangiales forman una red vascular) con 10 ng/mL de TGF- β o 25 ng/mL de CTGF para inducir la fibrosis. Un aumento del número de nódulos es un reflejo de la evolución de la fibrosis. El tratamiento con 15 $\mu\text{g/mL}$ de B5-15 redujo significativamente el número de nódulos en comparación con el tratamiento con 15 $\mu\text{g/mL}$ de un control isotópico (NIP228), véase la **FIG. 11**.

Formación 3D del tricultivo

En tricultivo de podocitos (Celprogen, CA, EE. UU.), células endoteliales glomerulares (GEC) y células mesangiales (MC) (tanto las GEC como las MC procedieron de ScienCell Research Laboratories, CA, EE. UU.) humanos se suspendieron dentro de la cola de la rata colágeno de tipo 1 (1.5 mg/mL; Corning, MA, EE. UU.), fibronectina plasmática humana (90 $\mu\text{g/mL}$; Merck Millipore, MA, EE. UU.), 1.5 mg/mL de NaHCO_3 , HEPES 25 mM y medio M199 (10x; Sigma, MO, EE. UU.) a 4 °C. Se ajustó el pH del gel con HCl 0.1 M (Fisher Scientific, Reino Unido) a pH 7.4. La suspensión de células/gel se pipeteó en placas de 48 pocillos (Corning Incorporated, NY, EE. UU.) en un volumen de 320 μL por pocillo, respectivamente. Se utilizaron células glomerulares renales con una proporción de 16:3:1 (GEC: POD: MC), 330 000-340 000 GEC, 50 000-70 000 POD y 20 000-24 000 MC por 320 μL . La suspensión de células/gel se hizo polimerizar a 37 °C durante 20 minutos, tras lo cual se pipetearon 500 μL de medio sobre la superficie del gel. El medio del tricultivo estuvo compuesto de RMPI 1640 (GibcoTM de Thermo Fisher, Reino Unido), 2 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de insulina, Apo-transferrina, selenito de sodio (en mezcla ITS) y un 1 % de ECGS (todos los suplementos procedieron de ScienCell Research Laboratories, CA, EE. UU.). Los cultivos se mantuvieron durante 24 h. Las células se utilizaron en experimentos entre p2-p6.

Ensayos de simulación con TGF- β , NIP228, un anticuerpo contra $\alpha\text{v}\beta 8$ y CTGF

Para la estimulación, se añadieron 10 ng/mL de TGF- β (R&D Systems (Bio-Techne Ltd), MN, EE. UU.), 15 $\mu\text{g/mL}$ de NIP228, 15 $\mu\text{g/mL}$ de un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ y 25 ng/mL CTGF (Invitrogen, CA, EE. UU.) solos o combinados, al medio colocado sobre los geles de cultivo para una incubación de 24 horas. El tratamiento de control fue medio solo.

Demostramos que el tratamiento con un anticuerpo contra la integrina $\alpha\text{v}\beta 8$ puede inhibir la evolución de la fibrosis provocada por la activación de TGF- β .

Otras realizaciones

A partir de la descripción anterior resultará evidente que se pueden realizar variaciones

y modificaciones a la invención descrita en la presente para adaptarla a varios usos y condiciones. Tales realizaciones también se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

5 La mención de una lista de elementos en cualquier definición de una variable en la presente incluye las definiciones de esa variable como un único elemento o una combinación (o subcombinación) de los elementos enumerados. La mención de una realización en la presente incluye a esa realización como una realización única o combinada con cualquier otra realización o partes de ella.

10 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente a modo de referencia en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada patente y publicación independiente se incorpora a modo de referencia.

15 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

20

25

30

35