

DESCRIPCIÓN

TÍTULO DE LA INVENCION

ANTICUERPOS ANTI-TGF-BETA 1 LATENTE Y MÉTODOS DE USO

CAMPO DE LA TÉCNICA

[0001]

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente y a los métodos de uso de estos.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002]

El factor de crecimiento transformante beta (factor de crecimiento transformante beta; TGF-beta) es un miembro de la superfamilia de citocinas TGF-beta, que consiste en isoformas del TGF-beta, activinas, inhibinas, ganglionar, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), hormona antimülleriana (AMH), así como factores de crecimiento y diferenciación (GDF). Los miembros de esta superfamilia son proteínas diméricas con estructuras conservadas y tienen funciones pleótropas *in vitro* e *in vivo* (NPL 1, 2). Las isoformas del TGF-beta participan de muchos procesos celulares, incluidos la inhibición del crecimiento, la migración celular, la invasión, la transición epitelio-mesénquima (EMT), la remodelación de la matriz extracelular (ECM) y la depresión inmunitaria (NPL 3). Sin embargo, aunque normalmente están reguladas y participan dinámicamente en el mantenimiento de la homeostasis tisular, las isoformas del TGF-beta a menudo se sobreexpresan de forma crónica en los estados de la enfermedad, incluidos el cáncer, la fibrosis y la inflamación y esta producción excesiva de TGF-beta impulsa la progresión de la enfermedad mediante la modulación del crecimiento, de la migración o del fenotipo celular.

[0003]

Se han identificado tres isoformas separadas del TGF-beta (TGF-beta 1, TGF-beta 2 y TGF-beta 3) en mamíferos y comparten una homología del 70 % al 82 % al nivel del aminoácido (NPL 4). Las tres isoformas del TGF-beta se unen al receptor de TGF-beta de tipo 2 (TGFR2) como homodímeros (su forma activa); luego, el TGFR2 recluta y activa al receptor de TGF-beta de tipo 1 (TGFR1) para activar la señalización del

receptor (NPL 5). Sin embargo, las cantidades de expresión de las tres isoformas varían según el tejido (NPL 6) y sus funciones son distintas, tal como lo demuestran los fenotipos de los ratones desactivados (NPL 7-11).

[0004]

Como otros miembros de la superfamilia del TGF-beta, el TGF-beta se sintetiza como una proteína precursora, la cual forma un homodímero que interactúa con su péptido relacionado con la latencia (LAP) y con una proteína de unión al TGF-beta latente (LTBP) para formar un complejo más grande denominado complejo latente grande (LLC). El gen del TGF-beta codifica una secuencia preproteína que consiste en un péptido señalizador, un propéptido que finaliza con lugar de escisión de la proproteína convertasa (PPC) y la secuencia del TGF-beta maduro. La furina hidroliza el lugar de escisión de la PPC, lo que crea homodímeros derivados del propéptido y del TGF-beta separados. Los dos homodímeros permanecen relacionados de forma no covalente y se secretan. Este complejo latente mantiene al TGF-beta en una forma inactiva que no es capaz de unirse a sus receptores (NPL 12, 13). El proceso de activación del TGF-beta implica la liberación del LLC de la ECM, seguida por una proteólisis adicional del LAP para liberar TGF-beta activo a sus receptores (NPL 3). El TGF-beta latente se escinde para liberar el TGF-beta activo mediante un amplio intervalo de peptidasas, incluidas la plasmina (PLN), la calicreína de plasma (PLK), la metaloproteinasa de matriz (MMP) 2 y la MMP9 (NPL 14) y mediante la trombospondina 1 (TSP-1) (NPL 15). Sin desear estar obligados por una teoría, la MMP2, así como la MMP9, escinde de forma proteolítica el TGF-beta 1 latente y libera al TGF-beta 1 maduro de la forma latente. Tanto la MMP2 como la MMP9 se sintetizan como pro-MMP inactiva. La pro-MMP2 se activa mediante un complejo de MMP de tipo 1 de la membrana (MT1-MMP/MMP14) y un inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2 (TIMP-2). La pro-MMP9 se activa mediante una cascada de peptidasa de interacción que implica la plasmina y la estromelina 1 (MMP-3). La plasmina genera MMP-3 activa a partir de su zimógeno. La MMP-3 activa escinde al propéptido de la pro-MMP-9 92 kDa, lo que produce una enzima activa enzimáticamente de 82 kDa. Los lugares de escisión de las MMP no están específicamente determinados; sin embargo, se informa que la MMP3 escinde específicamente el lugar entre 79 Ala y 80 Leu del TGF-beta latente para activar el TGF-beta (WO2005/023870). De forma alternativa, tras el estiramiento mecánico, las integrinas pueden activar el TGF-beta mediante la unión al motivo RGD presente en el LAP para inducir la liberación del TGF-beta maduro de su complejo latente (NPL 16, 17).

[0005]

Después de la activación, el ligando del TGF-beta dimérico se une a los dominios extracelulares de receptores de tipo I y de tipo II e induce una proximidad cercana, al colocar los dominios intracelulares de la serina/treonina cinasa de los receptores en una conformación que facilita la fosforilación y la posterior activación del receptor de tipo I. Esta activación del receptor de tipo I produce la propagación de la señalización mediante al menos dos vías aparentemente independientes: la vía canónica dependiente de SMAD y la vía independiente o no canónica de SMAD. En la vía dependiente de SMAD, la activación del TGFR1 (también conocido como ALK5) produce la fosforilación de las proteínas SMAD. SMAD2 y SMAD3 son sustratos del TGFR1. Tras la fosforilación por parte del receptor, las SMAD, junto con el mediador común SMAD4, se trasladan al núcleo, donde interactúan con otros factores de transcripción para regular las respuestas transcripcionales (NPL 18). En la vía no canónica, el complejo del receptor del TGF-beta activado transmite una señal a través de otros factores, tales como el factor 4 relacionado con el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAF4), el TRAF6, la cinasa activada por el TGF-beta 1 (TAK1, también conocida como MAP3K7), la proteína cinasa activada por el mitógeno p38 (p38 MAPK), RHO, la fosfoinositida 3 cinasa (PI3K), la AKT (también conocida como proteína cinasa B), la cinasa regulada por la señal extracelular (ERK), la cinasa N-terminal JUN (JNK) o el factor kappa B nuclear (NF-kappa B). Por lo tanto, las respuestas celulares a la señalización del TGF-beta resultan de la combinación dinámica de las cascadas de señalización canónicas y no canónicas.

[0006]

La fibrosis, o la acumulación de moléculas ECM que conforman el tejido cicatricial, es una característica frecuente de la lesión tisular crónica. La fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar se encuentran entre las enfermedades fibróticas más frecuentes que, en conjunto, representan una necesidad clínica altamente insatisfecha. El TGF-beta promueve considerablemente la generación de las matrices extracelulares de las células mesenquimales, mientras que, al mismo tiempo, suprime el crecimiento de las células epiteliales, lo que contribuye a la patogenia de las enfermedades escleróticas. La sobreexpresión de la forma activa del TGF-beta 1 en el hígado de ratones transgénicos es suficiente para inducir la enfermedad fibrótica en varios órganos (NPL 19). Por otra parte, el TGF-beta también tiene un papel importante en el mantenimiento de nuestra salud. Por ejemplo, el TGF-beta suprime la generación excesiva de peptidasas en el pulmón y previene la destrucción del tejido pulmonar que ocasiona el enfisema. Además, los ratones con TGF-beta 1 eliminado muestran

mortalidad prenatal (aproximadamente el 50 % a los 10,5 días después del coito) o sus crías mueren poco después del nacimiento, con lesiones inflamatorias masivas observadas en muchos órganos, incluidos los pulmones (vasculitis, infiltrado perivascular y neumonía intersticial) y el corazón (endocarditis y miocarditis), lo que indica que el TGF-beta 1 tiene un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria (NPL 7).

[0007]

Los resultados de los estudios con un anticuerpo neutralizante contra el TGF-beta y los modelos en animales revelaron que las enfermedades escleróticas se pueden prevenir o curar mediante la supresión de la acción del TGF-beta. Ya que el TGF-beta se produce como una proteína precursora, hay varios métodos informados para prevenir la activación a partir de la forma latente. Otro método para prevenir la activación de la forma latente es utilizar un inhibidor o un anticuerpo que se una al TGF-beta latente para bloquear la escisión por parte de las peptidasas, tales como PLK y PLN. Se informó que varios anticuerpos que usan este método de supresión de la activación del TGF-beta previenen o tratan la cirrosis hepática (PTL 1). Además, han existido algunos documentos que mencionan anticuerpos anti LAP para el tratamiento del cáncer (PTL 2) e inmunoglobulinas de unión al TGF beta 1 para el tratamiento de trastornos relacionados con el TGF beta 1 (PTL 3).

Se han descrito algunos anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (PTL 4, PTL 5 y PTL 6).

Lista de citas

Bibliografía de patentes

[0008]

[PTL 1] WO 2011102483

[PTL 2] WO 2016115345

[PTL 3] WO 2017156500

[PTL 4] WO 2018/043734

[PTL 5] WO 2019/163927

[PTL 6] WO 2021/039945

Bibliografía que no es de patentes

[0009]

[NPL 1] McCartney-Francis, N. L. *et al.* Int. Rev. Immunol. 16, 553-580 (1998)

[NPL 2] Massague, J. Annu. Rev. Biochem. 67, 753-791 (1998)

[NPL 3] Derynck, R. & Miyazono, K. Cold Spring Harbor Press (2008)

[NPL 4] Yu, L. *et al.* Kidney Int. 64, 844-856 (2003).

- [NPL 5] Xu, P., Liu, J. & Derynck, R. *et al.* FEBS Lett. 586, 1871-1884 (2012).
- [NPL 6] Millan, F. A. *et al.* Development 111, 131-143 (1991).
- [NPL 7] Kulkarni, A. B. *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU. 90 770-774 (1993).
- [NPL 8] Shull, M. M. *et al.* Nature 359, 693-699 (1992).
- [NPL 9] Dickson, M. C. *et al.* Development 121, 1845-1854 (1995).
- [NPL 10] Sanford, L. P. *et al.* Development 124, 2659-2670 (1997).
- [NPL 11] Proetzel, G. *et al.* Nature Genet. 11, 409-414 (1995).
- [NPL 12] Dubois, C. M. *et al.* J. Biol. Chem. 270, 10618-10624 (1995)
- [NPL 13] Nunes, I. *et al.* J. Am. Optom. Assoc. 69, 643-648 (1998)
- [NPL 14] Annes, J. *et al.* J. Cell Sci. 116, 217-224 (2003).
- [NPL 15] Schultz-Cherry, S. *et al.* J. Biol. Chem. 269, 26775-26782 (1994).
- [NPL 16] Munger, J. S. *et al.* Cell 96, 319-328 (1999).
- [NPL 17] Shi, M. *et al.* Nature 474, 343-349 (2011).
- [NPL 18] Shi, Y. & Massague, *et al.* Cell 113, 685-700 (2003).
- [NPL 19] Sanderson, N. *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU. 92, 2572-2576 (1995).

SUMARIO DE LA INVENCION

Problema técnico

[0010]

Un objeto de la invención es proporcionar anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente entre especies, humanizados y optimizados, que inhiban una activación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 latente sin inhibir la activación mediada por integrina del TGF-beta 1 latente o con inhibición parcial de la activación mediada por integrina del TGF-beta 1 latente, o que inhibe una activación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 latente pero que tiene menos impacto al inhibir la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente. La invención también proporciona anticuerpos anti-TGF-beta 1 que tienen afinidad de unión dependiente de pH hacia TGF-beta 1 latente.

Solución al problema

[0011]

Los presentes inventores han realizado estudios cuidadosos bajo las situaciones conforme se describe arriba y, por consiguiente, han creado anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente entre especies, humanizados y optimizados, que inhiben una activación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 sin inhibir la activación mediada por integrina del TGF-beta 1 latente o con inhibición parcial de la activación mediada por integrina del TGF-beta 1 latente, o que inhibe una activación mediada por peptidasa del TGF-beta 1

latente pero que tiene menos impacto al inhibir la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente. Además, los inventores de la presente crearon anticuerpos anti-TGF-beta 1 que tienen afinidad de unión dependiente de pH hacia TGF-beta 1 latente. [0012]

Más específicamente, la presente invención proporciona:

A1. Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

- (a) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 29, 30 y 36, respectivamente;
- (b) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 28, 32 y 37, respectivamente;
- (c) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 27, 30 y 39, respectivamente; o
- (d) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 27, 33 y 40, respectivamente.

A1-1. Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

- (a) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 29, 30 y 36, respectivamente;
- (b) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 28, 32 y 37, respectivamente;
- (c) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27, 30 y 39, respectivamente; o
- (d) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27, 33 y 40, respectivamente.

A2. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A1 que comprende, además:

- (a) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 49, 52 y 56, respectivamente;
- (b) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 50, 52 y 56, respectivamente;
- (c) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 48, 53 y 56, respectivamente; y
- (d) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 51, 52 y 56, respectivamente.

A2-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de A1-1 que comprende, además:

- (a) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las

SEQ ID NO: 49, 52 y 56, respectivamente;

(b) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 50, 52 y 56, respectivamente;

(c) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 48, 53 y 56, respectivamente; y

(d) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 51, 52 y 56, respectivamente.

A3. Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 29, 30 y 36, respectivamente y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 49, 52 y 56, respectivamente;

(b) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 28, 32 y 37, respectivamente y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 50, 52 y 56, respectivamente;

(c) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 27, 30 y 39, respectivamente y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 48, 53 y 56, respectivamente; o

(d) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 27, 33 y 40, respectivamente y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID n.º: 51, 52 y 56, respectivamente.

A3-1. Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 29, 30 y 36, respectivamente, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 49, 52 y 56, respectivamente;

(b) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 28, 32 y 37, respectivamente, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 50, 52 y 56, respectivamente;

(c) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27, 30 y 39, respectivamente, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las of SEQ ID NO: 48, 53 y 56, respectivamente;

o

(d) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27, 33 y 40, respectivamente, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 51, 52 y 56, respectivamente.

A4. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la

A1 a la A3-1, que comprende:

- (a) (I) una secuencia VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 4, (II) una secuencia VL que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 16 o (III) una secuencia VH como en (I) y una secuencia VL como en (II);
- (b) (I) una secuencia VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 9, (II) una secuencia VL que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 21 o (III) una secuencia VH como en (I) y una secuencia VL como en (II);
- (c) (I) una secuencia VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 11, (II) una secuencia VL que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 17 o (III) una secuencia VH como en (I) y una secuencia VL como en (II); o
- (d) (I) una secuencia VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 10, (II) una secuencia VL que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 20 o (III) una secuencia VH como en (I) y una secuencia VL como en (II).

A4-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualquiera la reivindicación de A1 a A4, que retiene una actividad de unión del anticuerpo al TGF-beta 1 latente humano.

A5. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de las reivindicaciones A4 o A4-1, que comprende una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 4, 9, 11 o 10.

A6. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación de cualquiera de las reivindicaciones A4 a A5, que comprende una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 16, 21, 17 o 20.

A7. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A4 a la A6, que comprende:

- (a) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 4 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 16;
- (b) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 9 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 21;
- (c) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 11 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 17;
- (d) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 10 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 20.

A8. Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

- (a) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 4 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 16;
- (b) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 9 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 21;
- (c) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 11 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 17;
- (d) una secuencia VH de la SEQ ID n.º: 10 y una secuencia VL de la SEQ ID n.º: 20.

A9. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A8, que es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

A9-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A9, que es un anticuerpo humano.

A9-2. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la reivindicación A9, que es un anticuerpo humanizado.

A9-3. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la reivindicación A9, que es un anticuerpo quimérico.

A10. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A9-3, que es un anticuerpo IgG.

A10-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A10, que es un anticuerpo IgG.

A11. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A9-3, que es un anticuerpo biespecífico.

A12. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A11, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una región Fc de IgG1 modificada con una función efectora reducida en comparación con una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.

A13. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A12, donde la región Fc de IgG1 modificada comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 235 y/o 236, según el índice de la EU.

A14. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A12 o A13, donde, en la región Fc de IgG1 modificada, residuos de aminoácidos en las posiciones 235 y 236, según el índice de la EU, son alterados para ser arginina (R).

A14-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualquiera de las reivindicaciones de la A12 a la A14, donde la región Fc de IgG1 modificada comprende sustituciones de aminoácidos de L235R y G236R, según el índice de la EU.

A15. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A12 a la A14-1, donde la región Fc de IgG1 modificada además tiene una actividad de unión mejorada con FcRn, en comparación con una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.

A16. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A15, donde la región Fc de IgG1 modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 428, 434, 438 y 440, según el índice de la EU.

A17. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualquiera de las reivindicaciones A15 o

A16, donde, en la región Fc de IgG1 modificada, los residuos de aminoácidos en las posiciones 428, 434, 438, y 440 son alterados para ser leucina (L), alanina (A), arginina (R), y ácido glutámico (E), respectivamente.

A17-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones A15 o A17, donde la región Fc de IgG1 modificada comprende sustituciones de aminoácidos de M428L, N434A, Q438R y S440E.

A18. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A11, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una región Fc de IgG1 modificada, donde, en la región Fc de IgG1 modificada, los residuos de aminoácidos en las posiciones 214, 235, y 236 son cada uno alterados para ser arginina (R).

A18-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A11, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una región Fc de IgG1 modificada, donde la región Fc de IgG1 modificada comprende sustituciones de aminoácidos de K214R, L235R y G236R.

A19. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualquiera de las reivindicaciones A1 a A11, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una región Fc de IgG1 modificada, donde, en la región Fc de IgG1 modificada, los residuos de aminoácidos en las posiciones 214, 235 236, 428, 434, 438, y 440 son alterados para ser arginina (R), arginina (R), arginina (R), leucina (L), alanina (A), arginina (R), y ácido glutámico (E), respectivamente.

A19-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A11, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una región Fc de IgG1 modificada, donde la región Fc de IgG1 modificada comprende sustituciones de aminoácidos de K214R, L235R, G236R, M428L, N434A, Q438R y S440E.

A20-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a A19-1, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a un TGF-beta 1 latente en una manera dependiente de pH.

A20-2. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-1, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a un TGF-beta 1 latente con una afinidad de unión al antígeno mayor en una condición pH neutral que en una condición pH en ácido.

A20-3. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-2, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a un TGF-beta 1 latente con una afinidad de unión al antígeno mayor a pH 7,4 que a pH 5,8.

A20-4. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-3, donde la relación constante de disociación entre pH 5,8 y pH 7,4 ($[KD(pH 5,8)/KD(pH 7,4)]$) para TGF-beta 1 latente del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente es 5 o más.

A20-5. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-4, donde la relación constante de disociación es 50 o más.

A20-6. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-4, donde la relación constante de disociación es 100 o más.

A20-7. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-4, donde la relación constante de disociación es 120 o más.

A20-8. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-4, donde la relación constante de disociación es 130 o más.

A20-9. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con la reivindicación A20-4, donde la relación constante de disociación es 160 o más.

A20-10. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualquiera de las reivindicaciones A20-4 a A20-9, donde la relación constante de disociación se mide usando un método de resonancia de plasmón superficial.

A21. Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 82 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 83;

(b) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 84 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 85;

(c) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 86 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 87;

(d) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 88 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 89;

(e) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 90 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 83;

(f) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 91 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 85;

(g) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 92 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 87; o

(h) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID n.º: 93 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID n.º: 89.

A22. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A21, donde el TGF beta-1 latente es un TGF beta-1 latente humano, un TGF

beta-1 latente de ratón o un TGF beta-1 latente de macaco.

A23. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A22, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 se une a un TGF-beta 1 latente humano, a un TGF-beta 1 latente de ratón y a un TGF-beta 1 latente de macaco.

A24. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A23, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1 se une a una región del péptido relacionado con la latencia (LAP) de un TGF-beta 1 latente.

A24-1. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24, donde el anticuerpo anti-TGF-beta 1:

- i) inhibe la activación de un TGF-beta 1 latente;
- ii) inhibe la liberación de TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente;
- iii) inhibe la liberación mediada por peptidasa y/o liberación de la integrina mediada del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente;
- iv) inhibe la liberación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente sin inhibir la división mediada de peptidasa de porción LAP del TGF-beta 1 latente;
- v) inhibe la liberación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente y permite una división de la peptidasa de región LAP mientras que el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a la región LAP del TGF-beta 1 latente;
- vi) no bloquea el acceso de una peptidasa a TGF-beta 1 latente;
- vii) no se une a sitios de división de peptidasa de porción LAP de un TGF-beta 1 latente;
- viii) inhibe una activación mediada de peptidasa de TGF-beta 1 latente sin inhibir la activación mediada de integrina de TGF-beta 1 latente o con inhibición parcial de activación mediada de integrina de TGF-beta 1 latente; y/o
- ix) inhibe una activación mediada de peptidasa de TGF-beta 1 latente, pero tiene menos impacto en inhibir la activación mediada de integrina de una activación mediada de peptidasa de TGF-beta 1 latente.

A24-1a. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de A24-1, donde la peptidasa se selecciona del grupo que consiste en plasmina (PLN), calicreína plasmática (PLK), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2) y metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9).

A24-2. Un fragmento de anticuerpo de anti-TGF-beta 1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a.

A25. Un inmunconjugado que comprende el anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación A24-2 y un agente citotóxico.

A26. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de A24-2.

A27. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación A26.

A28. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación A26 o el vector de acuerdo con la reivindicación A27.

A29. Un método para producir un anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente que comprende el cultivo de la célula huésped de acuerdo con la reivindicación A28, de modo que se produzca el anticuerpo.

(a) poner en contacto una muestra biológica que comprende TGF-beta 1 latente y una peptidasa con un anticuerpo de prueba;

(b) detectar (i) si un anticuerpo de prueba inhibe la escisión de la región LAP del TGF-beta 1 latente y (ii) si un anticuerpo de prueba inhibe la activación del TGF-beta 1 latente;

(c) seleccionar el anticuerpo de prueba que inhibe la activación de TGF-beta 1 latente sin inhibir la escisión mediada por peptidasa de la porción LAP de TGF-beta 1 latente.

(d) obtener información de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente seleccionado en la etapa (c); y

(e) introducir un gen que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente en una célula huésped; y

(f) cultivar la célula huésped para que se produzca el anticuerpo.

A30. El método de acuerdo con la reivindicación A29 o A29-2, que además comprende la recuperación del anticuerpo de la célula huésped.

B1. El anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación A24-2 o el inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación A25 para su uso como medicamento.

B1-1. El anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación B1, para uso como un medicamento de administración subcutánea.

B2. El anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de A24-2 o el inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación A25 para su uso en el tratamiento de la fibrosis.

B2a. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de cualquiera de las reivindicaciones A1 a A24-1a o el fragmento de anticuerpo de A24-2 o el inmunoconjugado de A25, para su uso en el tratamiento del cáncer.

B2-1. El anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación B2 o B2a,

para uso al administrar el anticuerpo de forma subcutánea.

B21- El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B2 o B2a, para su uso en la administración subcutánea del anticuerpo.

B2-2. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B2 o B2-1, donde la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar.

B2-3. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B2-2, donde la fibrosis es fibrosis renal.

B2-4. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B2-2, donde la fibrosis es fibrosis hepática.

B2-5. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B2-2, donde la fibrosis es fibrosis pulmonar.

B3. El uso del anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación A24-2 o del inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación A25 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis o del cáncer.

B3a. Uso del anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de cualquiera de las reivindicaciones A1 a A24-1a o el fragmento de anticuerpo de A24-2 o el inmunoconjugado de A25, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

B3-1. El uso de B3 o B3a, el medicamento es para administración subcutánea.

B3-2. El uso de B3 o B3-1, donde la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar.

B3-3. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B3-2, donde la fibrosis es fibrosis renal.

B3-4. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B3-2, donde la fibrosis es fibrosis hepática.

B3-5. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de B3-2, donde la fibrosis es fibrosis pulmonar.

C1. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de A24-2 o el inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación A25 y un portador farmacéuticamente aceptable.

C2. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación C1, donde la viscosidad de la formulación farmacéutica es menos que 70 mPa-s.

C3. La formulación farmacéutica de C1 o C2, donde la concentración del anticuerpo en la formulación farmacéutica es 50 a 350 mg/ml.

C4. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones de C1 a C3, la cual es administrada de forma subcutánea.

C5. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones de C1 a C4, para su uso en el tratamiento de fibrosis.

C5a. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones C1 a C4, para su uso en el tratamiento del cáncer.

C6. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación C5, donde la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar.

C7. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación C6, donde la fibrosis es fibrosis renal.

C8. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación C6, donde la fibrosis es fibrosis hepática.

C9. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación C6, donde la fibrosis es fibrosis pulmonar.

E1. Un método para tratar a un individuo que padece fibrosis que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF-beta-1 latente de cualesquiera de las reivindicaciones de la A1 a la A24-1a o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación A24-2 o el inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación A25.

E1a. Un método para tratar a un individuo que tiene cáncer que comprende administrarle al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF beta 1 latente de cualquiera de las reivindicaciones A1 a A24-1a o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación A24-2 o el inmunoconjugado de A25.

E2. El método de acuerdo con la reivindicación E1 o E1a, el cual comprende la administración subcutánea la cantidad efectiva del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente al individuo.

E3. El método de acuerdo con la reivindicación E1 o E2, donde la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar.

E4. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación E3, donde la fibrosis es fibrosis renal.

E5. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación E3, donde la fibrosis es fibrosis hepática.

E6. El anticuerpo anti-TGF beta-1 latente de acuerdo con la reivindicación E3, donde la fibrosis es fibrosis pulmonar.

Breve descripción de las figuras

[0013]

Figura 1

La FIG. 1 representa una evaluación de la actividad de neutralización del TGF-beta 1 latente humano hacia PLN.

[Fig. 2]

La FIG. 2 representa una evaluación del anticuerpo cinético hacia el TGF-beta 1 latente humano.

[Fig. 3]

La figura 3 representa una evaluación de KD a pH 7,4 y koff a pH 5,8 hacia TGF-beta 1 latente humano para las variantes de anticuerpos generados en el proceso de optimización de anticuerpos.

[Fig. 4]

La figura 4 representa una evaluación de la secreción IL-2 de PBMCs CD8-CD25^{bajo} humano a partir de la incubación del anticuerpo para la evaluación del riesgo de inmunogenicidad.

[Fig. 5]

La figura 5 muestra los valores ka, kd y KD de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente que se unen a TGF-beta 1 latente humano recombinante, de cynomolgus ("cyno"), y de ratón a pH 7,4.

[Fig. 6]

La Figura 6 muestra los valores ka, kd y KD de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente que se unen a TGF-beta 1 latente humano recombinante, de cynomolgus, y de ratón a pH 5,8.

[Fig. 7]

La Figura 7 muestra índices koff y KD (pH 5,8/pH 7,4) de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente según las Figuras 5 y 6.

[Fig. 8]

La Figura 8 representa los resultados de la unión de los anticuerpos a la superficie celular del TGF-beta 1 latente en células FreeStyle™ 293-F y células BaF3.

[Fig. 9]

La Figura 9 representa los resultados de las actividades de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente contra la activación TGF-beta 1 latente espontánea.

[Fig. 10]

La Figura 10 representa los resultados de las actividades de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente contra la activación de TGF-beta 1 latente mediada por la plasmina (PLN).

[Fig. 11]

La FIG. 11 representa los resultados de las actividades de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente contra la activación del plasma calicreína, la metaloproteínasa de matriz (MMP) 2, y el TGF-beta 1 latente humano mediada por la MMP 9.

[Fig. 12]

La FIG. 12 representa los resultados de la actividad de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente contra la activación del TGF-beta 1 de ratón mediada por la integrina en PBMC de ratón.

[Fig. 13]

La Figura 13 representa los resultados de las actividades de contra la activación del TGF-beta 1 humano mediada por integrina avb6 en Detroit562.

[Fig. 14-1]

La FIG.14-1 representa a estudios fármacocinéticos (PK) de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente en monos cynomolgus.

[Fig. 14-2]

La FIG. 14-2 es una continuación de la FIG. 14-1.

[Fig. 14-3]

La FIG. 14-3 es una continuación de la FIG. 14-2.

[Fig. 14-4]

La FIG.14-4 es una continuación de la FIG. 14-3.

[Fig. 14-5]

La FIG.14-5 es una continuación de la FIG. 14-4.

[Fig. 14-6]

La FIG. 14-6 es una continuación de la FIG. 14-5.

[Fig. 14-7]

La FIG. 14-7 representa a estudios PK de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente en ratón.

[Fig. 14-8]

La FIG. 14-8 es una continuación de la FIG. 14-7.

[Fig. 14-9]

La FIG. 14-9 es una continuación de la FIG. 14-8.

[Fig. 14-10]

La FIG. 14-10 es una continuación de la FIG. 14-9.

[Fig. 15]

La Figura 15 muestra el resultado del contenido de hidroxiprolina en el riñón. Se evaluó la eficacia de los anticuerpos en un modelo de fibrosis renal de ratón inducido por obstrucción ureteral unilateral (UUO). El grupo operado de forma simulada representa

un control no inducido por la enfermedad.

[Fig. 16]

La Figura 16 representa los resultados de esclerosis glomerular en riñón. La eficacia de los anticuerpos se evaluó en el modelo de nefritis de ratón inducida por suero anti-GBM (modelo aGBM). El grupo de ratones normal representa un control no inducido por la enfermedad.

[Fig. 17]

La Figura 17 representa los resultados de creatinina en plasma. La eficacia de anticuerpos fue evaluada en ratones COL4A3 KO (modelo de ratón Alport). El grupo de ratones normal representa un control no inducido por la enfermedad [Fig. 18]

La Figura 18 muestra la viscosidad de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente a concentración de anticuerpos de 150 mg/ml en una formula tampón a pH 6,0.

[Fig. 19]

La FIG. 19 muestra un análisis SEC de anticuerpos anti-TGF-beta-1 latente tratado a 40 grados Celsius por 2 y 4 semanas.

[Fig. 20]

La FIG. 20 representa los resultados del ARNm de colágeno tipo 1 alfa 1 (Col1a1) en el hígado. La eficacia de los anticuerpos se evaluó en el modelo de NASH/fibrosis hepática de ratón con deficiencia de colina, definido por L-aminoácidos y alto contenido de grasa (CDAHFD). El grupo de dieta normal representa un control no relacionado con la enfermedad.

[Fig. 21]

La FIG. 21 representa los resultados del contenido de hidroxiprolina, ARNm de colágeno tipo 1 alfa 1 (Col1a1) y ARNm de Serpina 1 en el pulmón. La eficacia de los anticuerpos se evaluó en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. El grupo de solución salina representa un control sin enfermedad.

[Fig. 22]

La FIG. 22 representa secuencias de región Fc de tipo salvaje de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

[Descripción de las realizaciones]

[0014]

Las técnicas y procedimientos descriptos o mencionados en la presente son generalmente entendidos y comúnmente utilizados utilizando la metodología convencional de aquellos expertos en la técnica, como por ejemplo, las metodologías ampliamente que se utilizan descriptas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A

Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

[0015]

I. DEFINICIONES

Para los fines del presente documento, un “sistema humano aceptador” es un sistema que comprende la secuencia de aminoácidos de un sistema de dominio variable de cadena liviana (VL) o un sistema de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un sistema de inmunoglobulina humana o de un sistema de consenso humano, conforme se define a continuación. Un sistema humano aceptador “derivado de” un sistema de inmunoglobulina humana o de un sistema de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, la secuencia del sistema humano aceptador de VL es idéntica a la del sistema de inmunoglobulina humana de VL o del sistema de consenso humano.

[0016]

El término “actividad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un lugar o más lugares de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su parte de unión (p. ej., un antígeno). En el presente documento, la “actividad de unión” no está estrictamente limitada a una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). Por ejemplo, cuando los miembros de un par de unión reflejan una interacción 1:1 monovalente, la actividad de unión se denomina particularmente la afinidad de unión intrínseca (afinidad). Cuando un miembro de un par de unión es capaz de una unión monovalente y una unión multivalente, la actividad de unión es la suma de cada fuerza de unión. La actividad de unión de una molécula X para su compañera Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (KD) o la “cantidad de unión del analito por la cantidad unitaria del ligando” (de aquí en adelante, se puede hacer referencia a esta como “cantidad de unión”). Los expertos en la técnica comprenderían que, generalmente, un valor de la constante de disociación (KD) más bajo significa una actividad de unión más alta y un valor más alto de “cantidad de unión del analito por cantidad unitaria del ligando” o “cantidad de unión” significa una actividad de unión más alta. La actividad de unión se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluidos aquellos que se describen en el presente documento. A continuación, se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la actividad de unión.

[0017]

Una molécula o un anticuerpo de unión al antígeno “madurado por actividad de unión”, “madurado por afinidad”, una molécula o un anticuerpo de unión al antígeno “aumentado por la actividad de unión (mejorado)” o “aumentado por afinidad (mejorado)” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones (p. ej., sustituciones) en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con una molécula de unión al antígeno original o un anticuerpo original que no tiene dichas alteraciones, las cuales dan como resultado una mejora en la actividad de unión de la molécula de unión al antígeno o del anticuerpo para el antígeno.

[0018]

Los términos “anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente” y “un anticuerpo que se puede unir al TGF-beta 1 latente” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse al TGF-beta 1 latente con suficiente actividad de unión de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse al TGF-beta 1 latente. En una realización, “un anticuerpo que se puede unir al TGF-beta 1 latente” es un anticuerpo

que específicamente se une al TGF-beta 1 latente. En una realización, el grado de actividad de unión de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente con una proteína del TGF-beta 1 no latente es menor de aproximadamente el 10 % de la actividad de unión del anticuerpo con el TGF-beta 1 latente según lo medido, p. ej., por un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se puede unir al TGF-beta 1 tiene una constante de disociación (KD) de 1 micromolar o menos, 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 0,1 nM o menos, 0,01 nM o menos o 0,001 nM o menos (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej., de 10^{-8} M a 10^{-13} M, p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a un epítipo de TGF-beta 1 latente que se conserva entre TGF-beta 1 latente de distintas especies.

[0019]

El término “anticuerpo” en el presente documento se utiliza en el más amplio sentido y abarca varias estructuras de anticuerpos, incluidos, a mero título enunciativo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) siempre que exhiban la actividad/afinidad de unión al antígeno deseada. El “anticuerpo” puede ser una molécula de unión al antígeno que comprende estructuras de cadena pesada variables y/o de cadena liviana variables de inmunoglobulina.

[0020]

Un “fragmento del anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una fracción de un anticuerpo intacto que une el antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos del anticuerpo incluyen, a mero título enunciativo, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena única (p. ej., scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos del anticuerpo. El “fragmento anticuerpo” puede ser una molécula de unión al antígeno que comprende estructuras de una cadena pesada variable y/o una cadena liviana variable de inmunoglobulina.

[0021]

Un “anticuerpo que se une al mismo epítipo” como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia por un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia por un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia de ejemplo.

[0022]

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en los mamíferos que generalmente está caracterizada por un crecimiento/una proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, a mero título enunciativo, el carcinoma, el linfoma (p. ej., linfoma de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano), el blastoma, el sarcoma y la leucemia. Los ejemplos más específicos de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervicouterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. En un ejemplo, el cáncer es resistente a los inhibidores de puntos de control inmunitarios y/o muestra una respuesta limitada a los inhibidores de puntos de control inmunitarios.

[0023]

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una fracción de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie diferente.

[0024]

La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de estos pueden dividirse además en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente.

[0025]

El término “agente citotóxico”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la muerte o la destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, a mero título enunciativo, isótopos radiactivos (p. ej., ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (p. ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de estos, tales como enzimas nucleolíticas;

antibióticos, toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de la flora o de la fauna, incluidos fragmentos y/o variantes de estos; y los diversos antineoplásicos que se divulgan a continuación.

[0026]

Las “funciones efectoras” se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; disminución de los receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

[0027]

Una “cantidad eficaz” de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[0028]

El término “región Fc” en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene, al menos, una fracción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226 o de Pro230 al terminal carboxilo de la cadena pesada. No obstante, la lisina C-terminal (Lys447) o la glicina-lisina (residuos 446 a 447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es según el sistema de numeración de la EU, también denominado índice de la EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

[0029]

La región Fc de una IgG de origen natural, también llamada región Fc de tipo salvaje, significa una región Fc que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la región Fc derivada de una IgG que se encuentra en la naturaleza. La región Fc de una IgG de origen natural, también llamada región Fc de IgG1 de tipo salvaje, se muestra en la Figura 22 (SEQ ID NO: 105-108). Por ejemplo, esta figura se refiere a una región Fc derivada de IgG1 humana de origen natural (también llamada región Fc de IgG1

humana de tipo salvaje), región Fc derivada de IgG2 humana de origen natural (también llamada región Fc de IgG2 humana de tipo salvaje), región Fc derivada de IgG3 humana de origen natural (también llamada región Fc de IgG3 humana de tipo salvaje) y región Fc derivada de IgG4 humana de origen natural (también llamada región Fc de IgG4 humana de tipo salvaje). Las regiones Fc de las IgG de origen natural también pueden incluir mutantes producidos espontáneamente a partir de ellas.

[0030]

El término “Sistema” o “FR” se refiere a residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en la VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0031]

En el presente documento, los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se utilizan indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo con una estructura sustancialmente parecida a una estructura de anticuerpos natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc conforme se define en el presente documento.

[0032]

Los términos “célula huésped”, “estirpe de células huésped” y “cultivo de células huésped” se emplean indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de tales células. Las células huésped incluyen “transformantes” y “células transformadas” que incluyen la célula transformada principal y la progenie derivada de esta sin importar el número de pasos. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula transformada original se incluye en el presente documento.

[0033]

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o que deriva de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias de codificación de anticuerpos humanos. La definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humano.

[0034]

Un “sistema de consenso humano” es un sistema que representa los residuos de aminoácidos que se producen con mayor frecuencia en una selección de secuencias de sistemas de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I, como en Kabat *et al.*, supra. En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III, como en Kabat *et al.*, supra.

[0035]

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y, generalmente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las HVR (p. ej., CDR) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano y todos o sustancialmente todos los FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Opcionalmente, un anticuerpo humano puede comprender al menos una fracción de una región constante del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a la humanización.

[0036]

El término “región hipervariable” o “HVR”, como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia (“regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”) y/o forman bucles definidos estructuralmente (“bucles hipervariables”) y/o contienen los residuos de contacto con el antígeno (“contactos con el antígeno”). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR de ejemplo en el presente documento incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 [1987]);

(b) CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD [1991]);

(c) contactos con el antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* J. Mol. Biol. 262: 732-745 [1996]); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluidos los residuos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (p. ej., residuos de FR) se enumeran en el presente documento según Kabat *et al.*, *supra*.

[0037]

Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluido, a mero título enunciativo, un agente citotóxico.

[0038]

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, a mero título enunciativo, animales domesticados (p. ej., vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej., primates humanos y no humanos, tales como monos), conejos y roedores (p. ej., ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

[0039]

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha separado de un componente de su ambiente natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a una pureza superior al 95 % o al 99 % según lo determinado mediante, por ejemplo, electroforesis (p. ej., SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (p. ej., HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para ver la revisión de los métodos para evaluar la pureza del anticuerpo, véase, p. ej., Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

[0040]

Un ácido nucleico “aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que típicamente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es distinta de su ubicación cromosómica natural.

[0041]

“Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente” o “ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente” se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo (o fragmentos de estas), incluidas tales moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados y tales moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

[0042]

El término “anticuerpo monoclonal” según se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, p. ej., que contienen mutaciones de ocurrencia natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, tales variantes generalmente están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal, que generalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre un antígeno. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe interpretar como que necesita la producción del anticuerpo mediante algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de conformidad con la presente invención se pueden crear mediante una variedad de técnicas, incluidos, a mero título enunciativo, el método de hibridoma, métodos de DNA recombinante, métodos de visualización de fago y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, dichos métodos y otros métodos de ejemplo para crear anticuerpos monoclonales se describen en el presente documento.

[0043]

Un “anticuerpo no marcado” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con una porción heteróloga (p. ej., una porción citotóxica) ni radiomarcada. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

[0044]

“Anticuerpos naturales” se refieren a moléculas de inmunoglobulina con estructuras variables que se producen naturalmente. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas

por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. Desde la N-terminal hasta la C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio variable pesado o un dominio variable de cadena pesada, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde la N-terminal hasta la C-terminal, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada un dominio variable ligero o un dominio variable de cadena liviana, seguida por un dominio constante ligero (CL). La cadena liviana de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

[0045]

El término “prospecto” se utiliza para hacer referencia a las instrucciones habitualmente incluidas en los empaques comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el consumo, la dosis, la administración, el tratamiento combinado, las contraindicaciones y/o las advertencias respecto de la administración de tales productos terapéuticos.

[0046]

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” respecto de una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin tener en cuenta las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que forman parte de la experiencia en la materia, por ejemplo, mediante programas informáticos de acceso público tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR), o GENETYX (marca registrada) (Genetyx Co., Ltd.). Las personas expertas en la materia pueden determinar parámetros adecuados para la alineación de las secuencias, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0047]

Genentech Inc. fue el autor del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 y el código fuente se ha presentado con documentación de usuario ante el Departamento de Derechos de Autor de los EE. UU., Washington D.C., 20559, donde

está registrado bajo el n.º de registro de derechos de autor de los EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluido UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 configura todos los parámetros de comparación de secuencias y no varían. En situaciones donde ALIGN-2 se emplea para las comparaciones de secuencia de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada respecto de, con o frente a una secuencia de aminoácidos B determinada (que se puede expresar de manera alternativa como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o que comprende un determinado % identidad de secuencia de aminoácidos respecto de, con o frente a una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos que el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 marcó como coincidencias idénticas en la alineación de A y B de ese programa y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que, donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto de B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto de A. A menos que específicamente se estipule lo contrario, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos que se utilizan en el presente documento se obtienen conforme se describe en el párrafo inmediatamente anterior con el programa informático ALIGN-2.

[0048]

El término “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que tiene una forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en esta sea eficaz y que no contiene otros componentes que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto a quien se le administraría la fórmula.

[0049]

Un “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, a mero título enunciativo, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

[0050]

El término “TGF-beta 1”, conforme se utiliza en el presente documento, se refiere a un TGF-beta 1 natural de cualquier fuente vertebrada, incluidos mamíferos, tales como primates (p. ej., humanos) y roedores (p. ej., ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca TGF-beta 1 no procesado “de longitud completa”, así como cualquier forma de TGF-beta 1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes del TGF-beta 1 que se producen de manera natural, p. ej., variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una preproteína del TGF-beta 1 humana de ejemplo se muestra en la SEQ ID n.º: 94 (NCBI RefSeq: NP_000651.3) y la secuencia de ácido nucleico que codifica un TGF-beta 1 humano de ejemplo se muestra en la SEQ ID n.º: 95 (NCBI RefSeq: NM_000660.6 La secuencia de aminoácidos de una preproteína del TGF-beta 1 de ratón de ejemplo se muestra en la SEQ ID n.º: 96 (NCBI RefSeq: NP_035707.1) y la secuencia de ácido nucleico que codifica un TGF-beta 1 de ratón de ejemplo se muestra en la SEQ ID n.º: 97 (NCBI RefSeq: NM_011577.2 La secuencia de aminoácidos de una preproteína del TGF-beta 1 de macaco de ejemplo se muestra en la SEQ ID n.º: 98 (NCBI RefSeq: XP_005589396.1) y la secuencia de ácido nucleico que codifica un TGF-beta 1 de macaco de ejemplo se muestra en la SEQ ID n.º: 99 (NCBI RefSeq: XM_005589339.2 El término “TGF-beta 1” abarca tanto al TGF-beta 1 latente como al TGF-beta 1 maduro.

[0051]

El término “TGF-beta 1 latente”, conforme se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier TGF-beta 1 que forma un complejo TGF-beta 1 latente (“TGF-beta 1 latente de superficie celular”, LLC o SLC [véase a continuación]) y/o que no es capaz de unirse a sus receptores. El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1) es un miembro del TGF-beta, que es un miembro de la superfamilia del TGF-beta. Como otros miembros de la superfamilia del TGF-beta, el TGF-beta se sintetiza como una proteína precursora, la cual forma un homodímero que interactúa con su péptido relacionado con la latencia (LAP) y con una proteína de unión al TGF-beta latente (LTBP) y forma un complejo más grande denominado complejo latente grande (LLC). La secuencia de aminoácidos de un TGF-beta 1 latente de humano de ejemplo (homodímero de TGF-beta y su LAP) son los aminoácidos 30-390 de la SEQ ID n.º: 94. La secuencia de aminoácidos de un TGF-beta 1 latente de ratón de ejemplo (homodímero de TGF-beta y su LAP) son los aminoácidos 30-390 de la SEQ ID n.º: 96. La secuencia de aminoácidos de un TGF-beta 1 latente de macaco (homodímero de TGF-beta y su LAP) son los aminoácidos 30-390 de la SEQ ID n.º: 98.

[0052]

Un complejo formado a partir del homodímero del TGF-beta y su LAP se denomina complejo latente pequeño (SLC). Este complejo latente mantiene al TGF-beta en una forma inactiva que no es capaz de unirse a sus receptores. El SLC puede estar unido de manera covalente a otra proteína, la proteína de unión al TGF-beta latente (LTBP), que forma el complejo latente grande (LLC). Se conocen cuatro isoformas de LTBP diferentes, LTBP-1, LTBP-2, LTBP-3 y LTBP-4. Se ha informado que LTBP-1, LTBP-3 y LTBP-4 se unen al SLC (véase, p. ej., Rifkin *et al.*, J Biol Chem. 2005 Mar 4;280(9):7409-12). El SLC también puede estar unido de manera covalente a otras proteínas, tales como las repeticiones predominantes de glucoproteína A (GARP) o la proteína que contiene repetición rica en leucina 33 (LRRC33). La GARP y la LRRC tienen un dominio transmembrana y se relacionan con el LAP sobre la superficie celular (véase, p. ej., Wang *et al.*, Mol Biol Cell. 2012 Mar;23(6):1129-39). Con respecto a los LLC, se informa que los LLC se relacionan de manera covalente con la matriz extracelular (ECM) mediante las N-terminales de las LTBP (véase, p. ej., Saharinen *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev. 1999 Jun;10(2):99-117.). En algunas realizaciones, el TGF-beta 1 latente relacionado con la ECM sobre una superficie celular se denomina "TGF-beta 1 latente de superficie celular".

[0053]

El término "TGF-beta 1 activo", "TGF-beta 1 maduro" o "TGF-beta 1 maduro activo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier homodímero del TGF-beta 1 que no forma un complejo del TGF-beta 1 latente (LLC o SLC) y que es capaz de unirse a sus receptores. El proceso de activación del TGF-beta 1 implica la liberación del LLC de la ECM, seguida por una proteólisis adicional del LAP para liberar TGF-beta activo a sus receptores. Se conoce que un amplio intervalo de peptidasas, incluidas la plasmina (PLN), la plasma calicreína (PLK), la metaloproteinasa de matriz (MMP) 2, MMP9, MMP13, MMP14, la trombina, la triptasa y la calpaína escinden al TGF-beta latente y liberan TGF-beta activo. En conjunto, estas peptidasas se pueden denominar "peptidasas de escisión de TGF-beta (latente)" o "peptidasas de escisión de TGF-beta 1 (latente)" en el contexto de la presente invención. Además de las peptidasas, trombospondina 1 (TSP-1), neuropilina-1 (Nrp1), ADAMSTS1 y F-spondina activan el TGF-beta latente. De forma alternativa, tras el estiramiento mecánico, las integrinas (preferentemente, la integrina alfa V beta 8 y/o la integrina alfa V beta 6) pueden activar el TGF-beta mediante la unión al motivo RGD presente en el LAP y la inducción de la liberación del TGF-beta maduro de su forma de complejo latente.

[0054]

Como se utiliza en el presente documento, el término “tratamiento” (y las variaciones gramáticas de este, tales como “tratar” o “en tratamiento”) se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo en tratamiento y se puede realizar mediante profilaxis o durante el ciclo de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, a mero título enunciativo, la prevención de la ocurrencia o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de la enfermedad y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar la aparición de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

[0055]

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana del anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural generalmente tienen estructuras parecidas y cada dominio comprende cuatro regiones variables (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, p. ej., Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., página 91 [2007]). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar mediante un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, p. ej., Portolano, *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

[0056]

El término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unida. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

[0057]

II COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente y los usos de estos. En determinadas realizaciones, se proporcionan los anticuerpos que se unen al TGF-beta 1. Los anticuerpos de la invención son útiles, p. ej., para el diagnóstico o el tratamiento de la fibrosis, preferentemente de la fibrosis miocárdica, la fibrosis renal, la fibrosis ocular, mielofibrosis, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar. Los anticuerpos de la invención también son útiles, p. ej., para el diagnóstico o el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de cáncer incluyen, a mero título enunciativo, el carcinoma, el linfoma (p. ej., linfoma de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano), el blastoma, el sarcoma y la leucemia. Los ejemplos más específicos de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervicouterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0058]

En el contexto de diagnóstico y tratamiento, la fibrosis renal incluye, pero no se limita a los siguientes: enfermedades renales progresivas, nefropatía IgA, nefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis mesangiocapilar, lupus eritematoso sistémico, nefritis glomerular, fibrosis intersticial renal, falla renal, nefropatía diabética, enfermedad de riñón poliquístico, síndrome alport, esclerosis glomerular segmental, o nefropatía membranosa.

[0059]

A. Anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente de ejemplo

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen al TGF-beta 1 latente. En más realizaciones, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a la región de proteína relacionada latente (LAP) del TGF-beta 1 latente. Un ejemplo de región de LAP comprende a los aminoácidos 30-278 de una preproteína del TGF-beta 1 humano (SEQ ID n.º: 1). La LAP es un componente del TGF-beta 1 latente, conforme se describe arriba. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une al TGF-beta 1 latente con una constante de disociación (KD) de 10^{-8} nM o menos, de 10^{-9} nM o menos o de 10^{-10} nM o menos.

[0060]

En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a un TGF-beta 1 latente y forma un LLC y/o a un TGF-beta 1 latente que forma complejos con GARP o LRRC33. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une al TGF-beta 1 latente de superficie celular que es un TGF-beta 1 latente relacionado con la matriz extracelular (ECM) sobre una superficie celular. En otro aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a un TGF-beta 1 latente, donde la región de LAP del TGF-beta 1 latente no está unida a LTBP y forma el complejo latente pequeño (SLC). En determinadas realizaciones, los SLC existen en forma soluble. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une al TGF-beta 1 latente (TGF-beta 1 latente de superficie celular, LLC o SLC) con una constante de disociación (KD) de 10^{-8} nM o menos, de 10^{-9} nM o menos o de 10^{-10} nM o menos.

[0061]

En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la activación de un TGF-beta 1 latente. El término "activación" del TGF-beta 1 latente, como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier proceso en el cual el TGF-beta 1 maduro se libera del LAP, el cual es un componente del TGF-beta 1 latente. La activación del TGF-beta 1 latente se puede detectar, por ejemplo, mediante la medición del TGF-beta 1 maduro y/o la medición de la actividad del TGF-beta 1 maduro con diversas técnicas conocidas en la técnica o que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la liberación del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente. Conforme se describe arriba, se ha informado que el TGF-beta 1 maduro se libera del TGF-beta 1 latente mediante activadores, tales como las peptidasas, las integrinas y otros activadores distintos de la peptidasa. Los ejemplos a mero título enunciativo de las peptidasas que activan el TGF-beta 1 latente incluyen la plasmina (PLN), el plasma calicreína (PLK), la metaloproteínasa de matriz (MMP) 2 y la MMP9. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la liberación del TGF-beta 1 maduro mediada por la peptidasa y/o mediada por la integrina del TGF-beta 1 latente. Conforme se describe arriba, las peptidasas escinden la región de LAP del TGF-beta 1 latente, lo que ocasiona la liberación del TGF-beta 1 maduro. En algunas realizaciones, los lugares de escisión mediante PLN y/o PLK están ubicados dentro de un fragmento que consiste en los aminoácidos 56-59 del polipéptido de LAP. En realizaciones preferidas, la peptidasa se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

(i) plasmina (PLN), por ejemplo, Sigma-Aldrich Cat. #527624

(https://www.merckmillipore.com/JP/ja/product/Plasmin-EACA-and-Lysine-Free-Human-Plasma,EMD_BIO-527624);

(ii) calicreína plasmática (PLK), por ejemplo, Enzyme Research Laboratories Cat. #HPKa 1303 (<https://enzymeresearch.com/product/human-calicreina/>);

(iii) metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), por ejemplo, R&D Systems Cat. #902-MP (https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-mmp-2-protein-cf_902-mp#product-datasheets); y

(iv) metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9), por ejemplo, R&D Systems Cat. #909-MM (https://www.rndsystems.com/products/recombinant-mouse-mmp-9-protein-cf_909-mm).

[0062]

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe una activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente sin inhibir la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente o con inhibición parcial de la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe una activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente, pero tiene menos impacto en la inhibición de la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente.

[0063]

En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente sin inhibir la escisión mediada por peptidasa de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente o parcialmente al inhibir la escisión mediada por peptidasa de la porción LAP de TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe una liberación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 maduro de TGF-beta 1 latente, pero tiene menos impacto en la inhibición de la escisión mediada por peptidasa de la porción LAP de TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la liberación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 maduro de TGF-beta 1 latente y permite que una peptidasa se separe de la región LAP mientras que el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a la región LAP de la TGF-beta 1 latente.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la liberación mediada por la peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente y permite que una peptidasa escinda la región de LAP mientras el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a la región de LAP del TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente no bloquea el acceso de una peptidasa al TGF-beta

1 latente, especialmente a los lugares de escisión mediante PLN y/o PLK. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente no se une a los lugares de escisión de la peptidasa de la fracción de LAP de un TGF-beta 1 latente, especialmente a los lugares de escisión mediante PLN y/o PLK.

[0064]

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que inhibe la liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente es un anticuerpo que (I) inhibe la escisión de la región de LAP mediada por una o más peptidasas, pero (II) no inhibe la escisión de la región de LAP mediada por otras peptidasas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente (1-I) inhibe la liberación mediada por MMP2 y/o MMP9 del TGF-beta 1 maduro mediante la inhibición de la escisión mediada por MMP2 y/o MMP9 de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente y (1-II) inhibe la liberación mediada por PLN y/o PLK del TGF-beta 1 maduro sin inhibir la escisión mediada por PLN y/o PLK de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente. De manera alternativa, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente (2-I) inhibe la liberación mediada por PLN y/o PLK del TGF-beta 1 maduro mediante la inhibición de la escisión mediada por PLN y/o PLK de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente y (2-II) inhibe la liberación mediada por MMP2 y/o MMP9 del TGF-beta 1 maduro sin inhibir la escisión mediada por MMP2 y/o MMP9 de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente. De manera alternativa, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente (3-I) inhibe la liberación mediada por PLN y/o PLK del TGF-beta 1 maduro sin inhibir la escisión mediada por PLN y/o PLK de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente y (3-II) inhibe la liberación mediada por MMP2 y/o MMP9 del TGF-beta 1 maduro sin inhibir la escisión mediada por MMP2 y/o MMP9 de la fracción de LAP del TGF-beta 1 latente.

[0065]

En algunas realizaciones, los anticuerpos “que inhiben la activación de un TGF-beta 1 latente” incluyen anticuerpos que ocasionan una disminución de al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % o más de la activación del TGF-beta 1. En otras realizaciones, los anticuerpos “que inhiben la liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente” incluyen anticuerpos que ocasionan una disminución de al menos el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % o más de la liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente. En más realizaciones, los anticuerpos que inhiben la liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente “sin inhibir la escisión mediada por peptidasa de la región de LAP del TGF-beta 1 latente”

incluyen anticuerpos que ocasionan una disminución del 50 % o menos, del 45 % o menos, del 40 % o menos, del 35 % o menos, del 30 % o menos, del 25 % o menos, del 20 % o menos, del 15 % o menos, del 10 % o menos, del 5 % o menos de la escisión mediada por peptidasa de la región de LAP del TGF-beta 1 latente.

[0066]

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente estabiliza la estructura de la región de LAP del TGF-beta 1 latente sin inhibir la escisión mediada por peptidasa de la región de LAP del TGF-beta 1 latente. Cuando un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente “estabiliza” la estructura de la región de LAP, como se utiliza en el presente documento, la región de LAP unida por el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se mantiene en una determinada estructura desde la cual no se puede liberar el TGF-beta 1 maduro. En más realizaciones, el TGF-beta 1 latente estabilizado por un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se puede activar mediante la integrina (preferentemente, la integrina alfa V beta 8 y/o la integrina alfa V beta 6). En determinadas realizaciones, una peptidasa ha escindido o no ha escindido la región de LAP estabilizada por un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente estabiliza la estructura de la región de LAP del TGF-beta 1 latente y permite que una peptidasa escinda la región de LAP mientras el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une a la región de LAP del TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente estabiliza la estructura de la región de LAP del TGF-beta 1 latente sin bloquear el acceso de una peptidasa al TGF-beta 1 latente, especialmente a los lugares de escisión mediante PLN y/o PLK. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente estabiliza la estructura de la región de LAP del TGF-beta 1 latente sin bloquear el acceso de una peptidasa al TGF-beta 1 latente, especialmente a los lugares de escisión mediante MMP2 y/o MMP9.

[0067]

En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente no se une al TGF-beta 1 maduro. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se une al TGF-beta 1 latente con una actividad de unión más alta que el TGF-beta 1 maduro. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se unen al TGF-beta 1 latente con al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10.000 o más veces de actividad de unión superior que al TGF-beta 1 maduro.

[0068]

En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente no inhibe o no inhibe de manera

significativa la activación del TGF-beta 1 mediada por integrina, es decir, la liberación mediada por integrina del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente. En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente pero que tiene menos impacto al inhibir la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente, es decir, la liberación mediada por integrina del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente.

Preferentemente, la integrina aquí es la integrina alfa V beta 8 y/o la integrina alfa V beta 6. En algunas realizaciones, los anticuerpos "que no inhiben o no inhiben de manera significativa la activación del TGF-beta 1 mediada por integrina" o "que tiene menos impacto al inhibir la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente" incluyen anticuerpos que ocasionan una disminución del 50 % o menos, del 45 % o menos, del 40 % o menos, del 35 % o menos, del 30 % o menos, del 25 % o menos, del 20 % o menos, del 15 % o menos, del 10 % o menos, del 5 % o menos de la activación del TGF-beta 1 mediada por integrina, es decir, la liberación mediada por integrina del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente.

[0069]

En un aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente ocasiona una disminución de las toxicidades o menos toxicidades y/o efectos adversos relacionados con los antagonistas anti-TGF-beta. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente, tales como los que se describen en el presente documento, tienen un perfil de seguridad y eficacia superior en comparación con los agentes que provocan actividades hacia el TGF-beta 1 maduro o el agente que provoca actividades hacia el TGF-beta 1 latente, pero inhibe la activación mediada por peptidasa y por integrina del TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tiene disminución de la cardiotoxicidad mientras que tiene una mejor eficacia o una eficacia similar que el anticuerpo anti-TGF-beta 1 maduro. Sin estar limitados por alguna teoría, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación no inhibe o no inhibe de manera significativa la activación del TGF-beta 1 mediada por integrina, o que tiene menos impacto en la inhibición la activación mediada por integrina del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente, y, por lo tanto, tiene una disminución de las toxicidades o menos toxicidades y/o efectos adversos ocasionados por: (I) activación del TGF-beta 1 mediada por integrina o (II) inhibición de la señalización del TGF-beta 1 en lugares donde la integrina activa el TGF-beta 1. Por lo tanto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación se puede administrar a los sujetos que lo necesitan a una dosis terapéuticamente eficaz sin ocasionar efectos adversos, especialmente la cardiotoxicidad. Por consiguiente, dicho método ampliaría el intervalo

de dosis en el cual se puede lograr tanto la eficacia como la seguridad/tolerabilidad en los pacientes. Por ende, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad relacionada con la señalización del TGF-beta 1 mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que no inhibe o no inhibe de manera significativa la activación del TGF-beta 1 mediada por integrina o que tiene menos impacto en inhibir la activación del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente. La presente invención abarca el uso de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para disminuir las toxicidades y/o los efectos adversos relacionados con la inhibición del TGF-beta 1 en un sujeto. En algunas realizaciones, la toxicidad y/o los efectos adversos pueden incluir toxicidades cardiovasculares, toxicidades gastrointestinales, toxicidades inmunitarias, toxicidades del hueso/cartílago, toxicidades reproductivas y toxicidades renales. En algunas realizaciones, las toxicidades cardiovasculares incluyen, a mero título enunciativo: lesiones en la válvula cardíaca, p. ej., hemorragia, inflamación, degeneración y proliferación de células intersticiales valvulares. En algunas realizaciones, las toxicidades y/o los efectos adversos pueden incluir hemorragias. En algunas realizaciones, las toxicidades y/o los efectos adversos pueden incluir lesiones o tumores cutáneos. En algunas realizaciones, las toxicidades y/o los efectos adversos pueden incluir la progresión del tumor.

[0070]

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente invención:

se une al TGF-beta 1 latente;

se une al SLC que forma el TGF-beta 1 latente;

se une al LLC que forma el TGF-beta 1 latente;

se une al TGF-beta 1 latente que forma un complejo con GARP o LRRC33;

se une al TGF-beta 1 latente de superficie celular;

se une a la región de LAP del TGF-beta 1 latente;

se une a LAP;

se une al TGF-beta 1 latente con una constante de disociación (KD) de 10^{-8} nM o menos, de 10^{-9} nM o menos o de 10^{-10} nM o menos;

inhibe la liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente;

no inhibe la escisión mediada por peptidasa de la región de LAP del TGF-beta 1 latente;

inhibe parcialmente la activación del TGF-beta 1.

Inhibe la activación mediada por integrina del TGF-beta 1;

Tiene menos impacto en la inhibición de la activación mediada por integrina del TGF-beta 1;

no inhibe o no inhibe de manera significativa la liberación mediada por integrina del TGF-beta 1 maduro del TGF-beta 1 latente; y/u

ocasiona una disminución de las toxicidades o menos toxicidades y/o efectos adversos relacionados con los antagonistas anti-TGF-beta 1, por ejemplo, el anticuerpo anti-TGF-beta maduro.

En más realizaciones, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente invención es: un anticuerpo monoclonal;

un anticuerpo humano, humanizado o quimérico; y/o

un anticuerpo IgG.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionados de:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 29;

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30;

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 36;

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 49;

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56.

[0071]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) una HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 27, 28 y 29;

(b) una HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 30-32 y 33;

(c) una HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 34-39 y 40;

(d) una HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos

seleccionada de las SEQ ID NO: 48-50 y 51;

(e) una HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 52, 53 y 54; y

(f) una HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 55-58 y 59,

en donde el anticuerpo no comprende una HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que comprenden las SEQ ID NO: 27, 30, 34, 48, 52 y 55, respectivamente.

[0072]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29;

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30;

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0073]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0074]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30;

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39;

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0075]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0076]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

- (a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29;
- (b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30;
- (c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;
- (d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49
- (e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y
- (f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0077]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

- (a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;
- (b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32
- (c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- (d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50
- (e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y
- (f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0078]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

- (a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;
- (b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30;
- (c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 39;

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0079]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

[0080]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende (o consiste en) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de la secuencia de VH expuesta en SEQ ID NO: 1-10 y 11, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de la secuencia de VL expuesta en SEQ ID NO: 12-20 y 21, en donde las HVR se definen por (a) Chothia; (b) Kabat; (c) MacCallum; o (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), en donde HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 no comprenden SEQ ID NO: 27, 30, 34, 48, 52 y 55, respectivamente.

[0081]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende (o consiste de) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de la secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 4, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de la secuencia VL establecida en la SEQ ID NO: 16, donde las HVR se definen por (a) Chothia, (b) Kabat, (c) MacCallum, o

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c).

[0082]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende (o consiste en) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de la secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 9, y HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de la secuencia VL establecida en la SEQ ID NO: 21, donde las HVR se definen por (a) Chothia, (b) Kabat, (c) MacCallum, o (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c).

[0083]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende (las regiones) o consiste en HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de la secuencia VH establecida en la SEQ ID N.º: 11, y (las regiones) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de la secuencia VL establecida en la SEQ ID n.º: 17, donde las HVR se definen por (a) Chothia, (b) Kabat, (c) MacCallum, o (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c).

[0084]

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende o consiste en (las regiones) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de la secuencia VH establecida en la SEQ ID N.º: 10, y (las regiones) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de la secuencia VL establecida en la SEQ ID n.º: 20, donde las HVR se definen por (a) Chothia, (b) Kabat, (c) MacCallum, o (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c).

[0085]

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente está humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende regiones HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y, además, comprende una estructura humana aceptora, p. ej., una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana.

[0086]

En otro aspecto, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 9, 11 o 10. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2-10 u 11. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad

contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 4, 9, 11 o 10. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 2-10 u 11. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende la secuencia VH en SEQ ID NO: 4, 9, 11 o 10, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende la secuencia VH en SEQ ID NO: 2-10 u 11, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 28 o 27, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 32 o 33, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37, 39 o 40. En una realización particular, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 28 o 27, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30-32 o 33, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34-39 o 40. En una realización particular, la VH comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 28 o 27, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30-32 o 33, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34-39 o 40. Las modificaciones postraduccionales incluyen, de modo no taxativo, una modificación de glutamina o glutamato en el extremo N de la cadena pesada o cadena liviana a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación.

[0087]

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, 21, 17 o 20. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de

identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13-20 o 21. En determinadas realizaciones, una secuencia VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 16, 21, 17 o 20. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 13-20 o 21. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende la secuencia VL en SEQ ID NO: 16, 21, 17 o 20, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, 50, 48 o 51; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 o 53; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56. En una realización particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, 50, 48 o 51; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 o 54; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55-58 o 59. En una realización particular, la VL comprende (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, 50, 48 o 51; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 o 54; y (c) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55-58 o 59. Las modificaciones postraduccionales incluyen, de modo no taxativo, una modificación de glutamina o glutamato en el extremo N de la cadena pesada o cadena liviana a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación.

[0088]

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL establecidas en SEQ ID NO: 1-11 y SEQ ID NO: 12-21, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias, en donde el anticuerpo no

comprende una VH y VL de SEQ ID NO: 1 y 12, respectivamente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL establecidas en SEQ ID NO: 2-11 y SEQ ID NO: 13-21, respectivamente. Las modificaciones postraduccionales incluyen, de modo no taxativo, una modificación de glutamina o glutamato en el extremo N de la cadena pesada o cadena liviana a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL establecidas en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 16, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. Las modificaciones postraduccionales incluyen, de modo no taxativo, una modificación de glutamina o glutamato en el extremo N de la cadena pesada o cadena liviana a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación.

[0089]

En alguna realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL establecidas en las SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 21, respectivamente, incluyen modificaciones postraduccionales de aquellas secuencias. Las modificaciones postraduccionales incluyen, a mero título enunciativo, una modificación de glutamina o glutamato en la posición N-terminal de la cadena pesada o la cadena liviana para formar ácido piroglutámico por piroglutamilación.

[0090]

En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL establecidas en la SEQ ID n.º: 11 y la SEQ ID n.º: 17, respectivamente, incluidas las modificaciones postraduccionales de estas secuencias. Las modificaciones postraduccionales incluyen, a mero título enunciativo, una modificación de glutamina o glutamato en la posición N-terminal de la cadena pesada o la cadena liviana para formar ácido piroglutámico por piroglutamilación.

[0091]

En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL establecidas en la SEQ ID n.º: 10 y la SEQ ID n.º: 20, respectivamente, incluidas las modificaciones postraduccionales de estas secuencias. Las modificaciones postraduccionales incluyen, a mero título enunciativo, una modificación de glutamina o glutamato en la posición N-terminal de la cadena pesada o la cadena liviana para formar ácido piroglutámico por piroglutamilación.

[0092]

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende cualquiera de (a)-(h) de más abajo, incluidas las modificaciones postraduccionales de estas secuencias:

(a) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 82 y una secuencia de cadena

liviana de la SEQ ID NO: 83;

(b) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 84 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 85;

(c) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 86 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 87;

(d) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 88 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 89;

(e) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 90 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 83;

(f) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 91 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 85;

(g) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 92 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 87; o

(h) una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 93 y una secuencia de cadena liviana de la SEQ ID NO: 89.

Las modificaciones postraduccionales incluyen, a mero título enunciativo, una modificación de glutamina o glutamato en la posición N-terminal de la cadena pesada o la cadena liviana para formar ácido piroglutámico por piroglutamilación.

[0093]

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena liviana la cual se divulga en la presente.

La secuencia de cadena pesada de cada anticuerpo consiste en (es decir, es la combinación de) la secuencia (SEQ ID NO) de "VH" (lado terminal N) y la secuencia (SEQ ID NO) de "CH" (lado terminal C) los cuales se muestran en las Tablas 1 y 3.

Que es, la secuencia (SEQ ID NO) de la secuencia de cadena pesada puede deducirse al

Enlazar la secuencia (SEQ ID NO) de "VH" y la secuencia (SEQ ID NO) de "CH".

La secuencia de cadena liviana de cada anticuerpo consiste en (es decir, es la combinación de) la secuencia (SEQ ID NO) de "VL" (lado terminal N) y la secuencia (SEQ ID NO) de "CL" (lado terminal C) el cual se muestra en la Tabla 1 y 3.

Es decir, la secuencia (SEQ ID NO) de la secuencia de la cadena liviana se puede deducir vinculando la secuencia (SEQ ID NO) de "VL" y la secuencia (SEQ ID NO) de "CL".

Ejemplos de dichas combinaciones se muestran en la Tabla 1.

[0094]

Tabla 1

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada SEQ ID NO:	VH SEQ ID NO:	CH SEQ ID NO:	Cadena liviana SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	CL SEQ ID NO:
hT0947AE20-SG181	82	4	22 (SG181)	83	16	25 (SK1)
hT0947AE27-SG181	84	9	22	85	21	25
hT0947AE34-SG181	86	11	22	87	17	25
hT0947AE37-SG181	88	10	22	89	20	25
hT0947AE20-SG191	90	4	23 (SG191)	83	16	25
hT0947AE27-SG191	91	9	23	85	21	25
hT0947AE34-SG191	92	11	23	87	17	25
hT0947AE37-SG191	93	10	23	89	20	25

[0095]

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de los que se indica en el presente documento. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se indica un anticuerpo que se une al mismo epítipo de las siguientes maneras:

(1) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 29,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 36,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 49,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56;

(2) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

n.º: 28,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 32,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 37,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 50,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56;

(3) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 27,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 39,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 48,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 53 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56, o bien

(4) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 27,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 33,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 40,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 51,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56.

[0096]

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que une el mismo epítopo que un anticuerpo que comprende cualquiera de (a)-(h) a continuación:

A) Una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 82 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 83;

b) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 84 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 85;

c) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 86 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 87;

d) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 88 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 89;

e) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 90 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 83;

f) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 91 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 85;

g) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 92 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 87; o

h) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 93 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 89.

[0097]

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente de humano, mono, ratón y/o rata. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente de humano, mono y ratón. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente que forma un SLC de humano, mono y ratón. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente que forma un LLC de humano, mono y ratón. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente que forma un LLC de humano, mono y ratón. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente que forma un complejo con GARP o LRRC33 de humano, mono y ratón. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une a un TGF-beta 1 latente de superficie celular de humano, mono y ratón.

[0098]

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente que se indican en el presente documento. El epítipo puede estar presente en el TGF-beta 1 de humano, mono, ratón y/o rata. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia, donde el anticuerpo de referencia es:

(1) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 29,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 36,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 49,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56;

(2) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 28,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 32,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 37,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 50,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56;

(3) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

n.º: 27,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 39,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 48,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 53 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56, o bien

(4) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 27,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 33,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 40,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 51,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56.

[0099]

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que une el mismo epítipo que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende cualquiera de (a)-(h) a continuación:

A) Una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 82 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 83;

b) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 84 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 85;

c) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 86 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 87;

d) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 88 y una secuencia de

cadena liviana de SEQ ID NO: 89;

e) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 90 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 83;

f) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 91 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 85;

g) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 92 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 87; o

h) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 93 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 89.

[0100]

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que se indica en el presente documento con el objeto de unirse a un TGF-beta 1 de humano, mono, ratón y/o rata. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se indica un anticuerpo que compite con el objeto de unirse al TGF-beta 1 de humano, mono, ratón y/o rata con lo siguiente:

(1) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 29,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 36,

(d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 49,

(e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y

(f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56;

(2) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:

(a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 28,

(b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 32,

(c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 37,

- (d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 50,
- (e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y
- (f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56;
- (3) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:
 - (a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 27,
 - (b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 30,
 - (c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 39,
 - (d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 48,
 - (e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 53 y
 - (f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56, o bien
- (4) un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende:
 - (a) HVR-H1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 27,
 - (b) HVR-H2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 33,
 - (c) HVR-H3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 40,
 - (d) HVR-L1 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 51,
 - (e) HVR-L2 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 52 y
 - (f) HVR-L3 que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º: 56.

[0101]

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que compite por la unión a TGF-beta 1 de humanos, monos, ratones y/o ratas con un anticuerpo que

comprende cualquiera de (a)-(h) a continuación:

- A) Una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 82 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 83;
- b) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 84 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 85;
- c) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 86 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 87;
- d) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 88 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 89;
- e) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 90 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 83;
- f) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 91 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 85;
- g) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 92 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 87; o
- h) una secuencia de cadena pesada del NÚMERO SEQ ID: 93 y una secuencia de cadena liviana de SEQ ID NO: 89.

[0102]

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente según cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo quimérico. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal quimérico. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de extensión completa, p. ej., un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un anticuerpo intacto de otra clase o isotipo como se define en la presente. En otra realización, el anticuerpo es, por ejemplo, un IgG1, IgG2, anticuerpo IgG3 o IgG4 o un

anticuerpo de otra clase o isotipo según se define aquí.

[0103]

En una realización, un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo anti- TGF-beta 1 latente es, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diabody, o fragmento de F(ab')₂. En una realización, un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente incluye cualquier molécula de unión a un antígeno que comprenda una estructura variable de cadena pesada y/o de cadena liviana de la inmunoglobulina.

[0104]

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente según cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, según se describe en las secciones 1-7 a continuación:

[0105]

1. Actividad de unión a anticuerpos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo como se indica en el presente documento posee una constante de disociación (KD) de 1 micromolar o menos, 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 0,1 nM o menos, 0,01 nM o menos o 0,001 nM o menos (p. ej. 10⁻⁸ M o menos, p. ej. de 10⁻⁸ M a 10⁻¹³ M, p. ej., de 10⁻⁹ M a 10⁻¹³ M).

[0106]

En una realización, la actividad de unión de un anticuerpo se mide a través de un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) y se representa mediante la KD. En una realización, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la actividad de unión en solución de los Fab para un antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulación de antígenos no marcados y luego se captura el antígeno unido con una placa con recubrimiento de anticuerpo anti Fab (véase, p. ej., Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 [1999]). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de varios pocillos MICROTITER (marca comercial registrada) (Thermo Scientific) se recubren durante toda una noche con 5 microgramos/ml de un anticuerpo capturante anti Fab (Cappel Labs) en (solución de) carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y luego se bloquean con albúmina sérica bovina al 2 % (peso en volumen) en PBS de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [¹²⁵I] con diluciones seriadas de un Fab de interés (p. ej., congruente con la evaluación del anticuerpo anti VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, Cancer Res. 57:4593-

4599 [1997]). El Fab de interés luego se incuba toda una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período prolongado (p. ej., aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. A partir de entonces, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (p. ej., durante una hora). Luego se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20 [marca comercial registrada]) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas están secas, se agregan 150 microlitros/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20 TM; Packard) y se las cuenta en un contador gamma TOPCOUNTTM (Packard) durante 10 minutos. Para usar en ensayos de unión competitiva, se eligen las concentraciones de cada Fab que resulten menores o iguales al 20 % de la unión máxima.

[0107]

En una realización, para medir la actividad de unión de un anticuerpo se utilizan métodos de captura de ligandos, por ejemplo, BIACORE (marca comercial registrada) T200 o BIACORE (marca comercial registrada) 4000 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), que están basados en métodos de análisis de resonancia plasmónica de superficie como principio de medición. Para operar los dispositivos se utiliza el software de control BIACORE (marca comercial registrada). En una realización, se usa un equipo de acoplamiento de aminas (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante, a fin de liberar una molécula para captura de ligandos, por ejemplo, un anticuerpo anti IgG, una proteína A, etc., fijada sobre un chip sensor (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) recubierto con carboximetildextrano. La molécula capturadora de ligandos se diluye con una solución de acetato de sodio 10 mM a un pH apropiado y se inyecta a un flujo apropiado durante un tiempo de inyección apropiado. Las mediciones de actividad de unión se llevan a cabo usando un tampón que contiene polisorbato 20 (Tween 20 [marca comercial registrada]) al 0,05 % como tampón de medición, a un flujo de 10-30 microlitros/minuto y a una temperatura de medición preferible de 25 °C o de 37 °C. Para la medición que se lleva a cabo con un anticuerpo capturado por la molécula capturadora de ligandos como ligando, se inyecta un anticuerpo para liberar una cantidad diana del anticuerpo capturado, y luego se inyecta una dilución seriada de un antígeno y/o un receptor Fc (analito) preparado con el tampón de medición. Para la medición llevada a cabo con un antígeno y/o un receptor Fc capturado por la molécula capturadora de ligandos como ligando, se inyecta un antígeno y/o un receptor Fc para liberar una cantidad diana de la captura de estos, y luego se inyecta una dilución seriada de un anticuerpo (analito) preparado con el tampón de medición.

[0108]

En una realización, los resultados de la medición se analizan con el software de evaluación BIACORE (marca comercial registrada). El cálculo de parámetros cinéticos se realiza mediante una correspondencia de sensogramas de asociación y disociación al mismo tiempo con un modelo de unión 1:1, lo que permite calcular un índice de asociación (k_{on} o k_a), un índice de disociación (k_{off} o k_d) y una constante de disociación en equilibrio (KD). En el caso de la actividad de unión débil, en particular cuando la disociación es rápida y los parámetros cinéticos son difíciles de calcular, puede usarse el modelo de equilibrio estacionario para calcular la constante de disociación en equilibrio (KD). Como otro parámetro en relación con la actividad de unión, se puede calcular la "cantidad de unión al analito por cantidad unitaria de ligando" al dividir una cantidad de unión al analito (unidad de resonancia: RU) a una concentración específica por una cantidad de ligando capturado.

[0109]

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo incluyen, a mero título enunciativo, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, y scFv, además de otros tipos de fragmentos que se describen a continuación. Para una reseña de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson *et al.* Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una reseña de fragmentos scFv, véase, p. ej., Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); véanse también WO 93/16185; y las patentes de los EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden residuos de epítomos de unión a receptores de rescate y que presentan mayor semividua *in vivo*, véase la patente de los EE. UU. n.º 5.869.046.

[0110]

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90 6444-6448 (1993). Triacuerpos y tetracuerpos se describen, además, en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

[0111]

Los anticuerpos de dominio simple son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción de un dominio variable de cadena liviana o de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de

dominio simple es un anticuerpo de dominio simple humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

[0112]

Los fragmentos de anticuerpos pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluidas, a mero título enunciativo, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como también la producción mediante células huésped recombinantes (p. ej., *E. coli* o fagos), según se describe en el presente documento.

[0113]

La presente invención también se refiere a moléculas de unión a antígenos que se unen a TGF-beta 1, que incluyen, a mero título enunciativo, por ejemplo, minicuerpos (anticuerpos de bajo peso molecular) y proteínas de andamiaje. En la presente invención, cualquier proteína de andamiaje es aceptable siempre que sea un péptido con una estructura tridimensional estable y que sea capaz de unirse a, al menos, un antígeno. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, fragmentos de regiones variables de anticuerpos, fibronectina, dominios A de proteínas, dominios A de receptores LDL, lipocalina y otras moléculas descritas en Nygren *et al.* (Current Opinion in Structural Biology, [1997] 7:463-469; Journal of Immunol Methods, [2004] 290:3-28), Binz *et al.* (Nature Biotech. [2005] 23:1257-1266), y Hosse *et al.* (Protein Science, [2006] 15:14-27). Al referirse a un anticuerpo de tal tipo, p. ej., (el término) "anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente" debería reemplazarse por "molécula de unión al antígeno anti-TGF-beta 1 latente" en el contexto de la presente memoria.

[0114]

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de los que se indica en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, p. ej., en la patente de los EE. UU. n.º 4.816.567 y en Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 [1984]). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (p. ej., una región variable proveniente de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de clase conmutada" en el que la clase o la subclase se modificaron respecto de la del anticuerpo original. Los fragmentos de unión a un antígeno de anticuerpos quiméricos también son proporcionados.

[0115]

En determinadas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado.

Por lo general, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenia en humanos y que, al mismo tiempo, retenga la especificidad y la actividad de unión del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., CDR (o porciones de estas) provienen de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de estas) provienen de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado comprenderá, opcionalmente, al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que provienen los residuos de HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad del anticuerpo o su actividad de unión.

[0116]

Los anticuerpos humanizados y sus métodos de preparación se reseñan, p. ej., en Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, p. ej., en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (descripción del injerto de la región de determinación de especificidad [SDR]); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (descripción de "recubrimiento"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (descripción de "barajado de FR"), Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (descripción del enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

[0117]

Las regiones variables humanas que pueden emplearse para la humanización incluyen, a mero título enunciativo: regiones de entramado seleccionadas mediante el método de "ajuste óptimo" (véase, p. ej., Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 [1993]); regiones variables provenientes de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (véase, p. ej., Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992) y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 [1993]); regiones variables maduras humanas (con mutaciones somáticas) o regiones de entramado de estirpe germinal humana (véase, p. ej., Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 [2008]) y regiones variables provenientes del cribado de colecciones de FR (véanse, p. ej., Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 [1997] y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 [1996]).

[0118]

4. Anticuerpos humanos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de los que se indica en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante diversas técnicas conocidas. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

[0119]

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico modificado para que produzca anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición al antígeno. Tales animales, por lo general, contienen la totalidad o una porción del locus de inmunoglobulina del humano, que reemplaza el locus de inmunoglobulina endógeno o que está presente de manera extracromosómica o integrado aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, el locus inmunoglobulina endógeno por lo general ha sido inactivado. Para una reseña de los métodos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Véanse también, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™, la patente de los EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB (marca comercial registrada), la patente de los EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE (marca comercial registrada) y la publicación de la solicitud de patente de los EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE (marca comercial registrada). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse adicionalmente, p. ej., mediante combinación con una región constante humana diferente.

[0120]

Los anticuerpos humanos también pueden prepararse a través de métodos con base en hibridoma. Se han descrito estirpes celulares del mieloma humano y del heteromieloma murino-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, p. ej., Kozbor J. Immunol., 133: 3001 [1984]; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 [Marcel Dekker, Inc., New York, 1987] y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147: 86 [1991]). Los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de linfocito B humano también se describen en Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen los descritos en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 7.189.826

(descripción de la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de estirpes celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (descripción de hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

[0121]

Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante aislamiento de secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas a partir de genotecas de expresión de fagos derivados de humanos. Tales secuencias de dominio variables pueden, por consiguiente, combinarse con el dominio constante humano que se desee. Las técnicas de selección de anticuerpos humanos para las colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

[0122]

5. Anticuerpos provenientes de colecciones o genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse mediante el cribado de genotecas combinatorias en búsqueda de anticuerpos que tengan la actividad o las actividades que se deseen. Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de métodos para la generación de genotecas de expresión de fagos y para el cribado de tales bibliotecas en busca de anticuerpos que exhiban las características de unión que se deseen. Tales métodos se reseñan, p. ej., en Hoogenboom *et al.* en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y adicionalmente se describen en, p. ej., McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554; Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004) y en Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004).

[0123]

En ciertos métodos de expresión de fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan por separado mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, las que pueden cribarse en busca de fagos de unión a antígenos, según se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Por lo general, los fagos expresan fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las

colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos con alto grado de actividad de unión al inmunógeno, sin necesidad de generar hibridomas. Como alternativa, el repertorio indiferenciado puede clonarse (p. ej., a partir de humanos) para proporcionar una fuente única de anticuerpos para un amplio intervalo de no autoantígenos y también autoantígenos sin inmunización alguna, según se describe en Griffiths *et al.*, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Por último, las colecciones indiferenciadas también pueden prepararse sintéticamente mediante la clonación de segmentos de gen V no reordenados provenientes de células madre, y mediante el uso de cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, según se describe en Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y publicación de patentes de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

[0124]

En el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados a partir de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

[0125]

6. Anticuerpos multiespecíficos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de los que se indica en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, p. ej., un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por TGF-beta 1 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de TGF-beta 1. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos de células que expresan TGF-beta 1. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de extensión completa. Los fragmentos de anticuerpos de anticuerpos biespecíficos también pueden proporcionarse.

[0126]

Las técnicas de preparación de anticuerpos multiespecíficos incluyen, a mero título enunciativo, la coexpresión recombinante de dos pares inmunoglobulínicos de cadena

pesada-liviana con diferentes especificidades (véase Milstein and Cuello, Nature 305: 537 [1983]), WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, EMBO J. 10: 3655 (1991)), y la ingeniería "botón en ojal" (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden prepararse mediante el diseño de los efectos de direccionamiento electrostático para generar moléculas de anticuerpo Fc heterodiméricas (WO 2009/089004A1), por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 [1985]); usando cierres de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase p. ej., Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5):1547-1553 [1992]); mediante tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, p. ej., Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 [1993]) y usando dímeros de Fv monocatenario (scFv) (véase, p. ej., Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 [1994]) y mediante la preparación de anticuerpos triespecíficos según se describe en, p. ej., Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

[0127]

Los anticuerpos diseñados con tres o más sitios de unión a antígenos funcionales, incluidos los "anticuerpos multivalentes", también se incluyen en el presente documento (véase, p. ej., US 2006/0025576A1).

[0128]

El fragmento de anticuerpo que se indican en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígenos que se une a un TGF-beta 1 además de a otro antígeno diferente (véase US 2008/0069820, por ejemplo).

[0129]

7. Variantes de anticuerpos

En determinadas realizaciones, se contemplan las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que se indican en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la actividad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifican el anticuerpo, o bien mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de residuos y/o inserciones en residuos y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede hacer que cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución concluya en un constructo final, siempre que este posea las características que se deseen, p. ej.,

unión al antígeno.

[0130]

a) Variantes por sustitución, inserción y delección

En determinadas realizaciones, se indican variantes de anticuerpos que presentan una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen las (regiones) HVR y FR. En la Tabla 1 se presentan las sustituciones conservativas bajo el encabezado "sustituciones preferidas". Más cambios sustanciales se presentan en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ilustrativas" y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de los aminoácidos. Las sustituciones en aminoácido pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos pueden cribarse en busca de una actividad deseada, p. ej., mejoramiento/retención de la unión a antígenos, disminución de la inmunogenia, ADCC o CDC mejoradas.

[0131]

(Tabla 2)

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[0132]

Los aminoácidos pueden agruparse según las propiedades comunes de cadena lateral:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutrales: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por el de otra clase.

[0133]

Un tipo de variante sustitutiva involucra la sustitución de uno o más residuos de una región hipervariable de un anticuerpo original (p. ej., un anticuerpo humano o humanizado). Por lo general, las variantes resultantes seleccionadas para estudios adicionales presentarán modificaciones (p. ej., mejoras) en determinadas propiedades biológicas (p. ej., mayor actividad de unión, menor inmunogenia) en comparación con el anticuerpo original y/o habrán retenido de manera sustancial determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante sustitutiva ilustrativa es un anticuerpo con actividad de unión madurada que pueda generarse con facilidad, p. ej., mediante técnicas de maduración de la actividad de unión con base en la expresión de fagos, tales como las que se describen en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se expresan en el fago y se criban en busca de una actividad biológica en particular (p. ej., actividad de unión).

[0134]

Pueden hacerse alteraciones (p. ej., sustituciones) en las HVR, p. ej., para mejorar la actividad de unión del anticuerpo. Tales alteraciones pueden hacerse en los "puntos críticos" de HVR, es decir, los residuos codificados por codones que experimentan mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, p. ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 [2008]) y/o residuos que entran en contacto con antígenos, con la actividad de unión de la variante VH o VL resultante sometida a prueba. La maduración de la actividad de unión mediante construcción y reelección a partir de colecciones secundarias fue descrita, p. ej., en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, [2001]). En algunas realizaciones de maduración de la actividad de unión, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración por medio de cualquier método de entre una variable de ellos (p. ej., PCR proclive al error, barajado de cadena, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Luego, se crea una colección secundaria. Entonces, la colección se criba para identificar cualquier variante de anticuerpo que presente la actividad de unión deseada. Otro método de introducción de diversidad involucra enfoques dirigidos por HVR, en los que varios residuos de HVR (p. ej., 4 a 6

residuos a la vez) se aleatorizan. Los residuos de HVR involucrados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, p. ej., mediante la mutagénesis o el modelado por barrido de alanina. En particular, a menudo se selecciona a CDR-H3 y CDR-L3.

[0135]

En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ocurrir en una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Por ejemplo, en las HVR pueden hacerse alteraciones conservativas (p. ej., sustituciones conservativas como se indican en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la actividad de unión. Tales alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los residuos que entran en contacto con el antígeno en las HVR. En determinadas realizaciones de las secuencias variantes VH y VL indicadas anteriormente, cada HVR puede no tener alteraciones o contener no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

[0136]

Un método útil de identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser seleccionados para mutagénesis es el denominado "mutagénesis por barrido de alanina" según se describe en Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, un residuo o un grupo de residuos diana (p. ej., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y reemplazan con un aminoácido de carga neutra o negativa (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se ve afectada la interacción del anticuerpo con el antígeno. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, se puede analizar una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre ambos. Tales residuos de contacto y residuos vecinales pueden ser seleccionados o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden cribarse a fin de determinar si contienen las propiedades deseadas.

[0137]

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de terminales amino y/o carboxilo cuya longitud varía de un residuo a polipéptidos que contienen un centenar de residuos o más, además de inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones de terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo (en posición) N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión de una enzima (p. ej., para

ADEPT) o de un polipéptido que aumenta la semivida plasmática del anticuerpo en la posición N-terminal o C-terminal de este.

[0138]

b) Variantes por glucosilación

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de los que se indica en el presente documento está alterado para aumentar o disminuir el grado al cual el anticuerpo está glucosilado. La adición o la delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo pueden lograrse con facilidad por alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o eliminen uno o más sitios de glucosilación.

[0139]

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, es posible alterar el carbohidrato acoplado allí. Los anticuerpos de origen natural producidos por células de mamíferos por lo general comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que suele estar unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, p. ej., Wright *et al.* TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, p. ej., manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el “tallo” de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden hacerse modificaciones al oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el objeto de crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

[0140]

En una realización, se indican variantes de anticuerpos que presentan una estructura de carbohidrato que carece de unión a fucosa (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede variar del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa en la cadena de hidratos de carbono en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) de acuerdo con una medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, según se describe en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 hace referencia al residuo de asparagina ubicado en la posición aproximada 297 en la región Fc (numeración de la Unión Europea [EU] para residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente +/- 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia de menor importancia en los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación

pueden tener una función ADCC mejorada. Véanse, p. ej., los n.º de publicación de patente de EE. UU. 2003/0157108 (Presta, L.) y US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "defucosilados" o "hipofucosilados" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lec13 CHO con insuficiencia de fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 [1986]; solicitud de patente de los EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L, y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, en especial en el ejemplo 11), y estirpes celulares de desactivación de genes tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO de inactivación (véase, p. ej., Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 [2004]; Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 [2006] y WO2003/085107).

[0141]

Se indican otras variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, p. ej., en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se encuentra bisecado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Ejemplos de tales variantes de anticuerpos se describen, p. ej., en WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); en la patente de los EE. UU. 6.602.684 (Umana *et al.*) y en US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se indican variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpos se describen, p. ej., en WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

[0142]

c) Variantes de región Fc

En determinadas realizaciones, es posible introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo indicado en el presente documento, lo que de esa manera genera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (p. ej., una

sustitución) en una o más posiciones de aminoácido. En otra realización, una variante Fc humana puede comprender una secuencia de región Fc humana quimérica (p. ej., una región Fc de IgG1/4 humana o IgG2/4 humana) o una secuencia de región Fc humana quimérica que además comprenda una modificación de aminoácidos (p. ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

[0143]

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posea algunas de las funciones efectoras, pero no todas, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante aun cuando ciertas funciones de efector (tales como complemento y ADCC) sean innecesarias o nocivas. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/depleción de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden efectuarse ensayos de unión del receptor Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carezca de unión a un receptor gamma (gamma R) (por lo tanto, probablemente carezca de actividad ADCC), pero que retenga la capacidad de unirse a FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, los linfocitos NK, solo expresan Fc gamma RIII, mientras que los monocitos expresan Fc gamma RI, Fc gamma RII y Fc gamma RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se describen en la patente de los EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, p. ej., Hellstrom, I. *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 [1986]) y en Hellstrom, I *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361 [1987]). Como alternativa, pueden usarse métodos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo [CellTechnology, Inc. Mountain View, CA] y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 [marca comercial registrada] [Promega, Madison, WI]). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no sea capaz de unirse a C1q y, por lo tanto, carezca de actividad CDC. Véase, p. ej., ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la

activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, p. ej., Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 [1996], Cragg, M.S. *et al.*, Blood 101:1045-1052 [2003] y Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 [2004]). Las determinaciones de unión a FcRn y depuración *in vivo*/semivida también pueden llevarse a cabo mediante el empleo de métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., Petkova, S.B. *et al.*, Int'l. Immunol. 18[12]:1759-1769 [2006]).

[0144]

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen a aquellos que presentan sustitución de uno o más residuos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (patente de los EE. UU. n.º 6.737.056). Tales mutaciones de Fc incluyen mutaciones de Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluidas la denominada mutación de Fc "DANA" con sustituciones de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de los EE. UU. n.º 7.332.581).

[0145]

La función efectora reducida se refiere a la reducción de una función efectora de la región Fc de un anticuerpo, que varía con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras reducidas incluyen: reducción de la unión a C1q; reducción de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); reducción de la unión al receptor Fc (por ejemplo, reducción de la unión al receptor Fc gamma); reducción de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); reducción de la fagocitosis; reducción de la regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y reducción de la activación de células B.

La reducción de una función/actividad efectora se refiere a una función/actividad efectora que es 95 % o menos, preferentemente 90 % o menos, 85 % o menos, 80 % o menos, 75 % o menos, más preferentemente 70 % o menos, 65 % o menos, 60 % o menos, 55 % o menos, 50 % o menos, 45 % o menos, 40 % o menos, 35 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, 9 % o menos, 8 % o menos, 7 % o menos, 6 % o menos, 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos de la función/actividad de una IgG intacta (o un anticuerpo que comprende una región Fc intacta). Por ejemplo, la función/actividad de la IgG (por ejemplo, actividad de unión al receptor Fc gamma) se reduce preferentemente en un factor de al menos aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, aproximadamente 100 veces o más en comparación con la función/actividad (por ejemplo, actividad de unión al receptor Fc gamma) de la IgG intacta (o un anticuerpo que comprende una región Fc intacta).

[0146]

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con mayor o menor grado de unión a FcR. (Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6.737.056, WO 2004/056312 y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 [2001]).

[0147]

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, p. ej., sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

[0148]

En algunas realizaciones, se hacen alteraciones en la región Fc que dan como resultado la alteración (es decir, el aumento o la disminución) de la unión a C1q y/o de la citotoxicidad dependiente complementaria (CDC), p. ej., según se describe en la patente de los EE. UU. n.º 6.194.551, WO 99/51642 y en Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[0149]

Los anticuerpos con mayor semivida y mayor unión al receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 [1976] y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 [1994]), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Tales anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ellas, lo que aumenta la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p. ej., sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de los EE. UU. n.º 7.371.826).

[0150]

Véase también Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); la patente de los EE. UU. n.º 5.648.260, la patente de los EE. UU. n.º 5.624.821 y WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de región Fc.

[0151]

d) Variantes de anticuerpos diseñados por cisteína

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos diseñados por cisteína, p. ej., los "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos cisteínicos. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir dichos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan en sitios accesibles del anticuerpo

y se pueden emplear para conjugar el anticuerpo con otras fracciones, tales como fracciones del fármaco o fracciones conector-fármaco, por ejemplo, para crear un inmunoconjugado, según se describe más adelante en el presente documento. En determinadas realizaciones, uno o más de los siguientes residuos pueden estar sustituidos con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana, A118 (numeración EU) de la cadena pesada y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden generarse según se describe, p. ej., en la patente de los EE. UU. n.º 7.521.541.

[0152]

e) Derivados de anticuerpos

En determinadas realizaciones, uno de los anticuerpos que se indican en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga otras fracciones no proteináceas que sean conocidas en la técnica y estén fácilmente disponibles. Las fracciones aptas para la obtención de derivados del anticuerpo incluyen, a mero título enunciativo, polímeros hidrosolubles. Algunos ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, a mero título enunciativo, polietilenglicol (PEG), copolímeros etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si hay más de un polímero unido a él, las moléculas pueden ser iguales o diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros usados para la obtención de derivados puede determinarse según consideraciones que incluyen, a mero título enunciativo, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se deba mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

[0153]

En otra realización, se indican conjugados de un anticuerpo y una porción no proteinácea que pueden calentarse selectivamente por exposición a la radiación. En una realización, la porción no proteinácea es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 102 11600-11605 (2005)). La radiación puede tener cualquier

longitud de onda e incluye, a mero título enunciativo, longitudes de onda que no dañan células comunes, pero que calientan la porción no proteinácea a una temperatura a la que las células próximas a la porción no proteinácea del anticuerpo mueren.

[0154]

B. Métodos y composiciones recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse mediante métodos y composiciones recombinantes, p. ej., según se describe en la patente de los EE. UU. n.º 4.816.567. En una realización, se indica ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (p. ej., las cadenas livianas y/o pesadas del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (p. ej., vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de tales realizaciones, una célula huésped comprende (p. ej., se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariota, p. ej. una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (p. ej., células Y0, NS0, Sp2/0). En una realización, se indica un método de fabricación de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se indicó anteriormente, en condiciones aptas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, la recuperación del anticuerpo desde la célula huésped (o el medio de cultivo de células huésped).

[0155]

Para la producción recombinante del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, p. ej., conforme se describe arriba, se aísla y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (p. ej., con sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y livianas del

anticuerpo).

[0156]

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesita glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, descripción de la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse aún más.

[0157]

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o la levadura, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores codificadores de anticuerpos, incluidos los hongos y las cepas de levadura cuyas vías de glucosilación se han “humanizado”, lo que da lugar a la producción de un anticuerpo con patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), and Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[0158]

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse junto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0159]

Los cultivos de células vegetales también se pueden utilizar como hospedadores. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

[0160]

Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos que están adaptadas para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son

la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 [1980]); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervicouterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, según se describe, p. ej., en Mather *et al.*, Annals NY Acad. Sci. 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras estirpes de células huésped de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas las células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para consulta una revisión de ciertas líneas de células huésped de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

[0161]

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente indicados en el presente documento pueden identificarse, cribarse o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

[0162]

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su afinidad/actividad de unión a un antígeno, p. ej., mediante métodos conocidos tales como ELISA, inmunotransferencia, resonancia plasmónica de superficie (p. ej., BIACORE [marca comercial registrada]) o una técnica parecida (p. ej., KinExa u OCTET [marca comercial registrada]), etc.

[0163]

En otro aspecto, se pueden emplear ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente descritos en el presente documento, preferiblemente hT0947AE20-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181, hT0947AE37-SG181, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, o hT0947AE37-SG191, para unirse a un TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo competidor

se une al mismo epítipo (p. ej., un epítipo lineal o conformacional) que está unido mediante cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente descritos en el presente documento, preferiblemente, hT0947AE20-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181, hT0947AE37-SG181, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, o hT0947AE37-SG191. Se indican métodos ilustrativos detallados para identificar un epítipo al cual un anticuerpo se une en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Los métodos para identificar un epítipo incluyen, a mero título enunciativo, cristalografía de rayos X y mutagénesis por barrido de alanina.

[0164]

En determinadas realizaciones, cuando dicho anticuerpo competidor se encuentra presente en exceso, bloquea (p. ej., reduce) la unión de un anticuerpo de referencia al TGF-beta 1 latente en al menos un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 % o más. En ciertas instancias, la unión se inhibe en, al menos, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o más. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (p. ej., un epítipo lineal o conformacional) que está unido mediante un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente descrito en el presente documento. En otros aspectos, el anticuerpo de referencia es hT0947AE20-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181, hT0947AE37-SG181, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, o hT0947AE37-SG191.

[0165]

En un ensayo de competencia ilustrativo, el TGF-beta 1 latente inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado (un anticuerpo de referencia) que se une al TGF-beta 1 latente (por ejemplo, hT0947AE20-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181, hT0947AE37-SG181, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, o hT0947AE37-SG191) y un segundo anticuerpo no marcado al que se lo somete a prueba para determinar su capacidad de competencia con el primer anticuerpo para unirse al TGF-beta 1 latente. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba TGF-beta 1 latente inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Tras la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo al TGF-beta 1 latente, se elimina el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con el TGF-beta 1 latente inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado

con el TGF-beta 1 latente inmovilizado está sustancialmente reducida en la muestra de la prueba en comparación con la muestra de control, eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primero para unirse al TGF-beta 1 latente. Véase Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0166]

En determinadas realizaciones, la unión de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente a un TGF-beta 1 latente de superficie celular puede someterse a prueba mediante métodos conocidos tales como ELISA, inmunotransferencia, Biacore, citometría de flujo, etc. Por ejemplo, las células que expresan TGF-beta 1 latente pueden ser puestas en contacto con anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente directamente conjugados con PE- o APC-, o anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente no conjugados seguidos por anticuerpos secundarios conjugados con PE- o APC-, y luego puede detectarse la tinción del TGF-beta 1 latente de superficie celular. Véase, p. ej., Oida *et al.*, PLoS One. 2010 Nov 24;5(11):e15523; Su *et al.*, Hum Mol Genet. 2015 Jul 15;24(14):4024-36.

[0167]

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se indican ensayos para la identificación de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente de estos que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, p. ej., inhibir la activación de TGF-beta 1 latente, inhibir la liberación de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente, inhibir la liberación mediada por peptidasas de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente, inhibir la liberación mediada por peptidasas de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente sin inhibir la escisión mediada por peptidasas de la región LAP del TGF-beta 1 latente, inhibir la liberación mediada por peptidasas de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente sin bloquear el acceso de una peptidasa a TGF-beta 1 latente, inhibir la liberación mediada por peptidasas de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente y al mismo tiempo permitir que una peptidasa escinda la región LAP del TGF-beta 1 latente, inhibir la liberación mediada por peptidasas de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente sin inhibir o con inhibición parcial de la activación de TGF-beta 1 mediada por integrina, etc. Se indican, además, los anticuerpos con tal actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

[0168]

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar tal actividad biológica.

[0169]

En algunas realizaciones, se determina si un anticuerpo de prueba inhibe la activación de TGF-beta 1 latente (es decir, si inhibe la liberación de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente) por detección de TGF-beta 1 maduro mediante un método conocido en la técnica, tal como electroforesis, cromatografía, análisis de inmunotransferencia, un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o espectrometría de masas, después de que un activador de TGF-beta 1 latente (p. ej., peptidasa, integrina, otro activador no peptidasa, etc.) entre en contacto con el TGF-beta 1 latente en presencia o ausencia del anticuerpo de prueba. En un ejemplo, un activador puede estar aislado (p. ej., una peptidasa o integrina aisladas) y/o no aislado (p. ej., integrina que comprenda PBMC de ratón, rata o humano). También se sabe que la activación de TGF-beta 1 latente, es decir, la liberación de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente, también ocurre en ausencia de un activador (la activación espontánea de TGF-beta 1 latente). En algunas realizaciones, se determina si un anticuerpo de prueba inhibe la activación espontánea de TGF-beta 1 latente mediante la detección de TGF-beta 1 maduro a través del método descrito anteriormente una vez que TGF-beta 1 latente es incubado con o sin el anticuerpo de prueba. En algunas realizaciones, donde se detecta menor cantidad de TGF-beta 1 maduro en presencia de (o luego del contacto con) el anticuerpo de prueba en comparación con la cantidad detectada en ausencia del anticuerpo de prueba, este anticuerpo se identifica como un anticuerpo que puede inhibir la activación del TGF-beta 1 latente. En un ejemplo, la cantidad de TGF-beta 1 maduro, ya sea menor o mayor, puede medirse en función de la concentración de TGF-beta 1 maduro (por ejemplo, g/ml, mg/ml, microgramos/ml, ng/ml o pg/ml, etc.). En otro ejemplo, la cantidad de TGF-beta maduro, ya sea menor o mayor, puede medirse en función de la densidad óptica (OD) (por ejemplo, a una longitud de onda en nm, etc.) de un marcador directa o indirectamente asociado con TGF-beta maduro.

[0170]

En determinadas realizaciones, la inhibición de la activación de TGF-beta 1 incluye, al menos, una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más en la cantidad de TGF-beta 1 maduro en el ensayo en comparación con un control negativo en condiciones parecidas. En algunas realizaciones, esto hace referencia a la inhibición de la activación de TGF-beta 1, es decir, la inhibición de la liberación de TGF-beta 1 maduro de, al menos, un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

[0171]

En algunas realizaciones, también se determina si un anticuerpo de prueba inhibe la

activación de TGF-beta 1 latente, es decir, inhibe la liberación de TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente, mediante la detección de la actividad de TGF-beta 1 maduro, por ejemplo, la actividad de unión al receptor de TGF-beta 1 o la actividad de mediación de la transducción de la señal en una célula que expresa el receptor de TGF-beta 1, etc. En algunas realizaciones, la unión de TGF-beta 1 maduro al receptor de TGF-beta 1 puede detectarse mediante un ensayo de unión al receptor. En algunas realizaciones, la actividad de mediación de la transducción de la señal de TGF-beta 1 puede determinarse mediante la detección de la activación de la vía TGF-beta 1/Smad. Las células útiles para dicho ensayo pueden ser aquellas que expresan el receptor de TGF-beta 1 endógeno o que fueron generadas por transfección de células con un gen receptor de TGF-beta 1. Por ejemplo, puede usarse la célula TGF-beta HEK-Blue™ que se usó en los ejemplos de trabajo descritos en el presente documento o las que están modificadas genéticamente, de forma transitoria o estable, para expresar un transgén que codifica el receptor de TGF-beta 1. La transducción de la señal mediada por TGF-beta 1 puede detectarse en cualquier grado en la vía de transducción de la señal, por ejemplo, mediante el examen de la fosforilación del polipéptido Smad, el examen de la expresión de un gen regulado por TGF-beta 1 que incluye un gen indicador, o por medición de la proliferación de una célula dependiente de TGF-beta 1.

[0172]

En algunas realizaciones, la actividad de mediación de la transducción de la señal de TGF-beta 1 también puede determinarse mediante la detección de la activación de la vía TGF-beta 1/Smad, mediante el examen de la fosforilación del polipéptido Smad (véase, p. ej., Fukasawa *et. al.*, *Kidney International*. 65(1):63-74 [2004], y Ganapathy *et al.*, *Molecular Cancer* 26;9:122 [2010]). En otras realizaciones, la actividad de mediación de la transducción de la señal de TGF-beta 1 puede determinarse mediante el examen de la capacidad de TGF-beta de inhibir la migración celular en cultivos monocapa "lesionados" de células BAE, el examen de la capacidad de TGF-beta de inhibir la proliferación celular, el examen de la capacidad de TGF-beta de suprimir la actividad del activador del plasminógeno (PA), examinar la capacidad de TGF-beta de regular al alza el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1), etc. (véase Mazzieri *et. al.*, *Methods in Molecular Biology* 142:13-27 [2000]).

[0173]

La inhibición de la activación de TGF-beta 1 también puede detectarse y/o medirse a través de los métodos expuestos en los ejemplos de trabajo. Por medio de ensayos de estos tipos o de otros tipos adecuados, los anticuerpos de prueba pueden cribarse en

busca de aquellos que sean capaces de inhibir la activación de TGF-beta 1. En determinadas realizaciones, la inhibición de la activación de TGF-beta 1 incluye, al menos, una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más en la activación de TGF-beta 1 en el ensayo en comparación con un control negativo en condiciones parecidas. En algunas realizaciones, esto hace referencia a una inhibición de la activación de TGF-beta 1 de, al menos, un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En determinadas realizaciones, la inhibición de la activación de TGF-beta 1 incluye, al menos, una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más en la cantidad de TGF-beta 1 maduro detectado en el ensayo en comparación con un control negativo en condiciones parecidas. En algunas realizaciones, esto hace referencia a una disminución en la cantidad TGF-beta 1 maduro de, al menos, un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

[0174]

En algunas realizaciones, se determina si un anticuerpo de prueba inhibe la escisión de la porción LAP de TGF-beta 1 latente mediante la detección del producto de escisión de TGF-beta 1 latente y/o TGF-beta 1 latente no escindido mediante diversos métodos conocidos en la técnica tales como electroforesis, cromatografía, análisis de inmunotransferencia, un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o espectrometría de masas, después de que una peptidasa entre en contacto con el TGF-beta 1 latente en presencia o ausencia del anticuerpo de prueba. Por ejemplo, cuando una secuencia de identificación de proteínas (p. ej., una secuencia de identificación FLAG) se agrega a la posición N-terminal de la región LAP de un TGF-beta 1 latente, la porción a la cual se agrega la secuencia de identificación de proteínas se divide cuando se presenta la escisión mediada por peptidasa. Por consiguiente, el producto de escisión de TGF-beta 1 latente puede detectarse a través de TGF-beta 1 latente (o la región LAP de TGF-beta 1 latente) sin la secuencia de identificación de proteínas, y/o el TGF-beta 1 latente no escindido puede detectarse a través del TGF-beta 1 latente con la secuencia de identificación de proteínas.

[0175]

En otro ejemplo, cuando una secuencia de identificación de proteínas (p. ej., una secuencia de identificación FLAG) se agrega a la posición N-terminal de la región LAP del TGF-beta 1 latente y cuando la ubicación del sitio de escisión debido a una peptidasa no está cerca de la posición N-terminal de la región LAP del TGF-beta 1 latente, la región LAP que tiene la secuencia de identificación de proteínas se acorta cuando se presenta

la escisión mediada por peptidasa. Por consiguiente, el producto de escisión de TGF-beta 1 latente puede detectarse a través de TGF-beta 1 latente que tenga una región LAP acortada (o la región LAP acortada de TGF-beta 1 latente) con la secuencia de identificación de proteínas.

[0176]

En algunas realizaciones, donde se detecta menor cantidad del producto de escisión de TGF-beta 1 latente en presencia de (o luego del contacto con) el anticuerpo de prueba en comparación con la cantidad detectada en ausencia del anticuerpo de prueba, este anticuerpo se identifica como un anticuerpo que puede inhibir la escisión del TGF-beta 1 latente. A la inversa, donde la cantidad del producto de escisión de TGF-beta 1 latente no disminuye significativamente en presencia de (o luego del contacto con) el anticuerpo de prueba en comparación con la cantidad detectada en ausencia del anticuerpo de prueba, este anticuerpo se identifica como un anticuerpo que no inhibe la escisión del TGF-beta 1 latente. En algunas realizaciones, donde se detecta mayor cantidad de TGF-beta 1 latente no escindido en presencia de (o luego del contacto con) el anticuerpo de prueba en comparación con la cantidad detectada en ausencia del anticuerpo de prueba, este anticuerpo se identifica como un anticuerpo que puede inhibir la escisión del TGF-beta 1 latente. A la inversa, donde la cantidad del TGF-beta 1 latente no escindido no aumenta significativamente en presencia de (o luego del contacto con) el anticuerpo de prueba en comparación con la cantidad detectada en ausencia del anticuerpo de prueba, este anticuerpo se identifica como un anticuerpo que no inhibe la escisión del TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, se determina si un anticuerpo de prueba bloquea el acceso de una peptidasa al TGF-beta 1 latente a través de métodos de detección de interacciones proteínicas entre la peptidasa y el TGF-beta 1 latente, p. ej., ELISA o resonancia plasmónica de superficie (p. ej., BIACORE [marca comercial registrada]) o una técnica parecida (p. ej., KinExa u OCTET [marca comercial registrada]). Donde se detecta una menor interacción entre la peptidasa y el TGF-beta 1 latente en presencia de (o luego del contacto con) el anticuerpo de prueba en comparación con la cantidad detectada en ausencia del anticuerpo de prueba, este anticuerpo se identifica como un anticuerpo que puede bloquear el acceso de la peptidasa al TGF-beta 1 latente.

[0177]

En determinadas realizaciones, la no inhibición de la escisión de TGF-beta 1 latente incluye, al menos, un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más en la cantidad del producto de escisión de TGF-beta 1 latente en el ensayo en

comparación con un control negativo en condiciones parecidas. En algunas realizaciones, la no inhibición de la escisión de TGF-beta 1 latente incluye, un al menos, un aumento del 50 % o menos, 45 % o menos, 40 % o menos, 35 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, o del 5 % o menos en la cantidad de TGF-beta 1 latente no escindido en el ensayo en comparación con un control negativo en condiciones parecidas.

[0178]

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente puede ser objeto de otros ensayos de actividad biológica, p. ej., para evaluar su eficacia como medicamento. Tales ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y el uso previsto del anticuerpo. Por ejemplo, los efectos biológicos del bloqueo de TGF-beta 1 a cargo del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente pueden evaluarse en un modelo de fibrosis renal murina inducido por una obstrucción ureteral unilateral (UUO) (p. ej., según se describe en Chevalier RL *et al.*, Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy, *Kidney Int.* 2009 Jun;75[11]:1145-1152), y/o un modelo de tumor singénico (p. ej., según se describe en Mariathasan S *et al.*, TGF-beta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018 Feb 22;554[7693]:544-548). En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente puede ser objeto de ensayos de actividad biológica descritos en el presente documento.

[0179]

3. Métodos de cribado

En un aspecto, un método para el cribado de un anticuerpo de la invención comprende diversos ensayos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método para el cribado de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende:

- (a) poner en contacto una muestra biológica que comprenda TGF-beta 1 latente y una peptidasa con un anticuerpo de prueba;
- (b) detectar (I) si un anticuerpo de prueba inhibe la escisión de la región LAP del TGF-beta 1 latente, y (II) si un anticuerpo de prueba inhibe la activación del TGF-beta 1 latente, y
- (c) seleccionar el anticuerpo de prueba que inhibe la activación del TGF-beta 1 latente sin inhibir la escisión mediada por peptidasa de la porción LAP del TGF-beta 1 latente.

[0180]

Como alternativa, en lugar de los pasos (b) y (c) anteriores, el método de cribado de un

anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende, p. ej., los pasos (b) y (c) siguientes:

(b) medir (I) la cantidad de TGF-beta 1 latente no escindido y (II) la cantidad de TGF-beta 1 maduro, y

(c) seleccionar el anticuerpo de prueba que inhibe una liberación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 maduro a partir de TGF-beta 1 latente sin inhibir una escisión mediada por peptidasa de la región LAP del TGF-beta 1 latente, si la cantidad de TGF-beta 1 latente no escindido no aumenta significativamente y la cantidad de TGF-beta 1 maduro disminuye en comparación con la ausencia del anticuerpo de prueba.

Como alternativa, en lugar de los pasos (b) y (c) anteriores, el método de cribado de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende, p. ej., los pasos (b) y (c) siguientes:

(b) medir (I) la cantidad de producto de escisión de TGF-beta 1 latente y (II) el grado de actividad de TGF-beta 1 maduro, y

(c) seleccionar el anticuerpo de prueba que inhibe una activación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 latente sin inhibir una escisión mediada por peptidasa de la región LAP del TGF-beta 1 latente, si la cantidad de producto de escisión no disminuye significativamente y el grado de actividad de TGF-beta 1 maduro disminuye en comparación con la ausencia del anticuerpo de prueba.

Más aún, la presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que comprende, p. ej., los pasos (d) y (e) a continuación además de los pasos (a) a (c) anteriores:

(d) obtener información de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente seleccionado en el paso (c) y

(e) introducir un gen que codifique el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente en una célula huésped.

En una realización, el método para producir un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente comprende además, después de (e) anterior: (f) cultivar la célula huésped de modo que se produzca el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente.

[0181]

En este contexto, la frase "no disminuye/aumenta significativamente", p. ej., en las frases "la cantidad de TGF-beta 1 latente no escindido no aumenta significativamente" y "la cantidad de producto de escisión (de TGF-beta 1 latente) no disminuye significativamente" implica que el grado del aumento/disminución puede ser cero o puede no ser cero pero estar cerca de cero, o puede ser suficientemente bajo como para que se lo pueda ignorar desde el punto de vista técnico, o que de manera realista o sustancial puede ser considerado cero por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en

un análisis de inmunotransferencia, cuando un investigador no puede detectar ni observar ninguna señal/banda significativa (o una señal relativamente alta o fuerte) para el TGF-beta 1 latente no escindido, se considera que la cantidad del TGF-beta 1 latente no escindido "no aumentó significativamente" o que la cantidad del producto de escisión (del TGF-beta 1 latente) "no disminuyó significativamente". Además, la frase "no disminuye/aumenta significativamente" puede usarse como sinónimo de "no disminuyó/aumentó sustancialmente".

[0182]

En algunas realizaciones, se puede determinar si un anticuerpo de prueba inhibe la escisión de la región LAP del TGF-beta 1 latente y si un anticuerpo de prueba inhibe la activación del TGF-beta 1 latente mediante diversos ensayos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica.

[0183]

D. Inmunoconjugados

La invención también indica inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente del presente documento conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos antineoplásicos, inhibidores de la proliferación celular, toxinas (p. ej., toxinas proteínicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas) o isótopos radiactivos.

[0184]

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo está conjugado con uno o más fármacos, los que incluyen, a mero título enunciativo, un maitansinoide (véanse las patentes de los EE. UU. n.º 5.208.020 y 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como las fracciones DE y DF del fármaco monometil auristatina (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de los EE. UU. n.º 5.635.483, 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o sus derivados (véanse las patentes de los EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al.*, Cancer Res. 53:3336-3342 [1993] y Lode *et al.*, Cancer Res. 58:2925-2928 [1998]); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz *et al.*, Current Med. Chem. 13:477-523 [2006]; Jeffrey *et al.*, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 [2006]; Torgov *et al.*, Bioconj. Chem. 16:717-721 [2005]; Nagy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 [2000]; Dubowchik *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 [2002]; King *et al.*, J. Med. Chem. 45:4336-4343 [2002]; y la patente de

los EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno y CC1065.

[0185]

En otra realización, un inmunconjugado comprende un anticuerpo, según lo descrito en el presente documento, conjugado con una toxina enzimáticamente activa o un fragmento de esta, incluso, a mero título ilustrativo, la cadena A de difteria, fragmentos activos no vinculantes de toxina difteria, cadena A de exotoxina (de *pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de *modeccina*, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

[0186]

En otra realización, un inmunconjugado comprende un anticuerpo, según lo descrito en el presente documento, conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Se dispone de una serie de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para los estudios scintigráficos, por ejemplo, Tc-99m o ^{123}I , o un marcador espín para imagen de resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como imagen por resonancia magnética, MRI), tales como yodina-123 nuevamente, yodina-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0187]

Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico pueden prepararse si se emplea una serie de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometilo) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoilo) hexanediamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse según lo describe Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). El ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobencil-3- metildietileno

marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un quelante ejemplar para la conjugación de radionucleido con el anticuerpo. Consulte WO94/11026. El enlace puede ser un “enlace escindible”, lo cual facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlace lábil al ácido, un enlace sensible a peptidasa, un enlace fotolábil, un enlace dimetilo o un enlace con disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131 (1992); Patente de los EE. UU. n.º 5.208.020).

[0188]

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a dichos conjugados preparados con reactivos entrecruzados, incluso, a mero título enunciativo, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), que están comercialmente disponibles (p. ej., en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE. UU.).

[0189]

E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente contenido en el presente documento es útil para detectar la presencia del TGF-beta 1, p. ej., TGF-beta 1 latente en una muestra biológica. El término “detectar”, tal y como se utiliza en el presente documento, incluye detección/medición cuantitativa o cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tales como suero, sangre total, plasma, muestra de biopsia, muestra de tejido, suspensión celular, saliva, esputo, fluidos orales, fluido cerebroespinal, fluido amniótico, líquido ascítico, leche, calostro, secreción de la glándula mamaria, linfa, orina, sudor, fluido lagrimal, fluido gástrico, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido ocular y moco.

[0190]

En una realización, se da a conocer el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método de diagnóstico o detección. En otros aspectos, se da a conocer un método para detectar la presencia de TGF-beta 1, p. ej., TGF-beta 1 latente en una muestra biológica. Por ejemplo, el método para detectar la presencia de TGF-beta 1 latente comprende:

- (a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente invención descrito en el presente documento bajo condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente con el TGF-beta 1; y
- (b) detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente y el

TGF-beta 1 latente.

[0191]

Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente se usa para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, p. ej., donde un TGF-beta 1, p. ej., TGF-beta 1 latente, es un biomarcador para la selección de pacientes. Es decir, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente es útil como agente diagnóstico con TGF-beta 1 como blanco.

[0192]

De manera más específica, el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente es útil para el diagnóstico de fibrosis, preferentemente fibrosis de miocardio, fibrosis renal, fibrosis ocular, mielofibrosis, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar. Los anti anticuerpos TGF-beta 1 latente de la invención también son útiles para el diagnóstico del cáncer.

[0193]

En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un método para inhibir la liberación de TGF-beta 1 maduro a partir del TGF-beta 1 latente sin inhibir la escisión de la región LAP de TGF-beta 1 latente mediado por la peptidasa en una muestra biológica, que comprende el contacto entre la muestra biológica que contiene TGF-beta 1 latente con el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente invención bajo condiciones que permitan la unión del anticuerpo con TGF-beta 1 latente.

[0194]

En determinadas realizaciones, p. ej., para la detección/el diagnóstico, se dan a conocer los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente marcados. Las marcas incluyen, a mero título enunciativo, marcas o porciones que se detectan directamente (tales como marcas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimiluminiscentes y radiactivas), así como también porciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej., mediante una reacción enzimática o una interacción molecular. Algunos ejemplos de marcas incluyen, a mero título enunciativo, los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I, fluoróforos tales como quelantes de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de los EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa del rábano (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como urato oxidasa y xantina oxidasa, emparejadas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor seco tales como HRP, lactoperoxidasa

o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores espín, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

[0195]

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, según lo descrito en el presente documento, se preparan mezclando dicho anticuerpo con el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son, generalmente, no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y composiciones empleadas, e incluyen, a mero título enunciativo, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidas glucosa, manosa o dextrinas; quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de la proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen, además, agentes de dispersión de fármaco intersticial, tales como glucoproteínas hialuronidasa neutral-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tal como rHuPH20 (HYLENEX (marca registrada), Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP de ejemplo y métodos de uso, incluso rHuPH20, se describen en la publicación de la patente de los EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

[0196]

Las formulaciones de anticuerpos liofilizados de ejemplo se describen en la Patente de los EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen aquellas descritas en la Patente de los EE. UU. n.º 6.171.586 y WO2006/044908. En las últimas

formulaciones se incluye un tampón de histidina-acetato.

[0197]

En un aspecto, la invención da a conocer formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para el tratamiento de fibrosis, preferentemente fibrosis de miocardio, fibrosis renal, fibrosis ocular, mielofibrosis, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar. La invención también da a conocer formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para el tratamiento contra el cáncer.

[0198]

La fórmula en el presente documento también puede contener más de un ingrediente según sea necesario para la indicación concreta que se trate, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser preferible que se den a conocer además inhibidores de puntos de control inmunitario.

[0199]

Los ingredientes activos pueden contenerse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, como las microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina, y las microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (como los liposomas, las microesferas de albúmina, las microemulsiones, las nanopartículas y las nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, Osol, A. Ed. (1980).

[0200]

Se pueden preparar preparados de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, y cuyas matrices se presentan en forma de medicamentos con forma específica, p. ej., películas o microcápsulas.

[0201]

Las formulaciones que deben usarse para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede ya haber sido lograda, p. ej., mediante filtración por medio de membranas de filtración de esterilidad.

[0202]

G. Métodos terapéuticos y composiciones

Cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente contenidos en el presente documento pueden usarse en métodos terapéuticos. En un aspecto, se da a conocer el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso como medicamento. En otros aspectos,

se da a conocer un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso como tratamiento contra el cáncer o la (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en el tratamiento de la fibrosis. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en el tratamiento de la fibrosis renal. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en el tratamiento de la fibrosis hepática. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en el tratamiento de la fibrosis pulmonar/pulmonar. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método de tratamiento. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene cáncer o fibrosis (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc., que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene fibrosis, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene fibrosis renal, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene fibrosis hepática, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene fibrosis pulmonar/pulmonar, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En una de estas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, tal como se proporciona a más adelante. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en la inhibición de la activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para su uso en un método para inhibir la activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente en un individuo que comprende administrar al individuo un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente eficaz para inhibir la

activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente. Un “individuo” de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es preferiblemente un humano.

[0203]

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de cáncer o fibrosis (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de la fibrosis. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de la fibrosis renal. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de la fibrosis hepática. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de la fibrosis pulmonar/pulmonar. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar cáncer o fibrosis (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc., que comprende administrar a un individuo que tiene cáncer o fibrosis (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc., una cantidad eficaz del medicamento. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar la fibrosis, que comprende administrar a un individuo que tiene fibrosis, una cantidad eficaz del medicamento. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar la fibrosis renal, que comprende administrar a un individuo que tiene fibrosis renal, una cantidad eficaz del medicamento. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar la fibrosis hepática, que comprende administrar a un individuo que tiene fibrosis hepática, una cantidad eficaz del medicamento. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar la fibrosis pulmonar/pulmonar, que comprende administrar a un individuo que tiene fibrosis pulmonar/pulmonar, una cantidad eficaz del medicamento. En una de estas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, tal como se proporciona a más adelante. En una realización adicional, el medicamento es para inhibir la activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para inhibir la activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inhibir la activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente. Un “individuo” de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un humano.

[0204]

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar un cáncer o

fibrosis (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la fibrosis. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la fibrosis renal. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la fibrosis hepática. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la fibrosis pulmonar/pulmonar. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicho cáncer o fibrosis (tal como fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar/pulmonar), etc., una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha fibrosis, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha fibrosis renal, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha fibrosis hepática, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha fibrosis pulmonar/pulmonar, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente. En una de estas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, tal como se proporciona a más adelante. En algunas realizaciones, la administración del anticuerpo y el agente es concomitante. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un humano.

[0205]

En otro aspecto, la invención da a conocer un método para inhibir la activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente en un individuo. En una realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente para inhibir la activación mediada por peptidasa del TGF-beta 1 latente. En una realización, el "individuo" es un humano.

[0206]

En otro aspecto, la invención da a conocer formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente contenidos en el presente documento, p. ej., para ser empleados en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos TGF-beta 1 contenidos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 contenidos en

el presente documento y, al menos, un otro agente terapéutico, p. ej., según lo descrito a continuación.

[0207]

Un anticuerpo de la invención (y cualquier otro agente terapéutico) puede administrarse mediante cualquier vía apropiada, incluso parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía apropiada, p. ej., mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica. En el presente documento, se contemplan varios cronogramas de dosificación, incluso, a mero título ilustrativo, administraciones simples o múltiples en varios puntos temporales, dosis en bolo e infusión de pulso.

[0208]

Los anticuerpos de la invención serían formulados, dosificados y administrados de manera congruente con la buena práctica médica. Los factores que deben considerarse en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero en particular que se trata, la afección clínica de cada paciente, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo se formula opcionalmente, aunque no es necesario, con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes depende de la cantidad de anticuerpos presentes en la fórmula, del tipo de trastorno o de tratamiento, y de otros factores descritos previamente.

[0209]

Para prevenir o tratar una enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o combinado con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se trata, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra como prevención o con objetivos terapéuticos, la terapia previa, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico a cargo. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente una sola vez o durante una serie de tratamientos.

[0210]

Una fórmula (es decir, formulación farmacéutica) que contiene un anticuerpo de la

presente divulgación puede ser administrado por vías de administración parental, por ejemplo, inyección como una inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, etc., transdérmica, vías transmucosas, nasal, y pulmonares. En algunas formas de realización, la fórmula se administra por inyección subcutánea. En algunas formas de realización, la fórmula se usa para administración subcutánea, por ejemplo, inyección subcutánea.

[0211]

En algunas realizaciones, la fórmula de la presente descripción tiene una viscosidad de menos de 70 mPa-s (milipascal segundo), menos de 60 mPa-s, menos de 50 mPa-s, menos de 40 mPa-s, menos de 30 mPa-s, menos de 20 mPa-s, menos de 15 mPa-s. En algunas realizaciones, la viscosidad es de 3 mPa-s a 8 mPa-s. En algunas realizaciones, la viscosidad es de 3 mPa-s a 7 mPa-s. En algunas realizaciones, la viscosidad es de 3 mPa-s a 6 mPa-s. En algunas realizaciones, la viscosidad es de 3 mPa-s a 5 mPa-s. En algunas realizaciones, la viscosidad es de 3 mPa-s a 4 mPa-s. En algunas realizaciones, la viscosidad es de 3 mPa-s a 3,5 mPa-s. La viscosidad de la fórmula se puede medir mediante un método de viscosímetro rotacional utilizando un viscosímetro de tipo cono-placa, por ejemplo, de acuerdo con la Farmacopea Japonesa, General Tests, 2.53 Determinación de Viscosidad.

[0212]

En algunas realizaciones, la concentración de un anticuerpo en la fórmula es de 50 a 350 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de un anticuerpo en la fórmula es de 100 a 300 mg/ml. En algunas formas de realización, la concentración de un anticuerpo en la fórmula es 100 a 250 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de un anticuerpo en la fórmula es 100 a 200 mg/ml.

[0213]

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación descritos en el presente documento puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente.

[0214]

IV. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN, EQUIPOS

A. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se da a conocer un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de cualquiera de los trastornos descritos previamente (p. ej., fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o cáncer). El artículo de fabricación comprende un recipiente

y una etiqueta, o un prospecto asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, sachets de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar hechos de una serie de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o combinada con otra composición, eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la afección (p. ej., fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o cáncer), y puede tener un puerto de acceso esterilizado (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un ingrediente activo en la composición es un anticuerpo o un inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección que se elija (p. ej., fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o cáncer). Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en este, donde la composición comprende un anticuerpo o un inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en este, donde la composición comprende otro citotóxico u agente terapéutico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención además puede comprender un prospecto que indica que las composiciones se pueden utilizar para tratar una afección en particular (p. ej., fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar o cáncer). Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectable (BWFI), una solución salina amortiguadora de fosfato, una solución de Ringer o una solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0215]

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación descritos previamente puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente.

[0216]

B. Equipos

La presente divulgación da a conocer equipos para usar en un método para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos en el presente documento, en particular, el tratamiento de un individuo con fibrosis (fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar) o cáncer, que contienen un anticuerpo

anti-TGF-beta 1 latente, un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente, un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente o un vector que comprende el ácido nucleico de la presente divulgación o producido mediante un método de la presente divulgación. Los equipos pueden contener, adicionalmente, cualquiera de los agentes, tal como un inhibidor de puntos de control inmunitario que incluya un anticuerpo anti PD-L1. Los equipos pueden estar empaquetados con un otro vehículo o medio farmacéuticamente aceptable divulgado en el presente documento, o un manual de instrucciones que describa como usar los equipos, etc. Con respecto al artículo de fabricación descrito en el presente documento, el equipo puede contener materiales útiles para el tratamiento de fibrosis (fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar) o cáncer; un recipiente y una etiqueta, o un prospecto asociado con el recipiente; una composición que, por sí misma o combinada con otra composición, sea eficaz para tratar la fibrosis (fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar) o el cáncer; un puerto de acceso esterilizado, etc. Los equipos pueden comprender además una etiqueta o un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar fibrosis (fibrosis, como fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar) o cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el equipo puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectable (BWI), una solución salina amortiguadora de fosfato, una solución de Ringer o una solución de dextrosa. Además, el equipo puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0217]

< Unión dependiente del pH de anticuerpos anti- TGF-beta 1 latente >

Aquí, "pH ácido" se refiere al pH que puede seleccionarse, por ejemplo, de pH 4,0 a pH 6,5. En una realización, el pH ácido se refiere, pero no se limita a, pH 4,0, pH 4,1, pH 4,2, pH 4,3, pH 4,4, pH 4,5, pH 4,6, pH 4,7, pH 4,8, pH 4,9, pH 5,0, pH 5,1, pH 5,2, pH 5,3, pH 5,4, pH 5,5, pH 5,6, pH 5,7, pH 5,8, pH 5,9, pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, o pH 6,5. En una realización específica, el término pH ácido se refiere al pH 5,8.

[0218]

Aquí, "pH neutro" se refiere al pH seleccionado, por ejemplo, de 6,7 a pH 10,0. En una realización, el pH neutro se refiere, pero no se limita a, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9, pH 9,0, pH 9,5, o pH

10,0. En una realización específica, el término pH neutro se refiere al pH 7,4.

[0219]

En el aspecto alternativo, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación es un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que se une a TGF-beta 1 latente de una manera dependiente del pH. En el contexto de la presente divulgación, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que se une a TGF-beta 1 latente de una manera dependiente del pH se refiere a un anticuerpo cuya afinidad de unión para TGF-beta 1 latente a un pH ácido se ha reducido en comparación con la afinidad de unión para TGF-beta 1 latente a un pH neutro. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente dependiente del pH incluyen anticuerpos que tienen una afinidad más alta por TGF-beta 1 latente a un pH neutro que a un pH ácido. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente revelación tiene una afinidad por TGF-beta 1 latente a un pH neutro que es al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, y un valor de la prueba. 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 55 veces, 60 veces, 65 veces, 70 veces, 75 veces, 80 veces, 85 veces, 90 veces, 95 veces, 100 veces, 200 veces, 400 veces, 1000 veces, 10000 veces o más que la afinidad a un pH ácido.

En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente que se une a TGF-beta 1 latente de una manera dependiente del pH se refiere a un anticuerpo cuya afinidad de unión por TGF-beta 1 latente a pH 5,8 se ha reducido en comparación con la afinidad de unión por TGF-beta 1 latente a pH 7,4. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente dependientes del pH incluyen anticuerpos que tienen una mayor afinidad por el TGF-beta 1 latente a pH 7,4 que a pH 5,8. En una realización, un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente descripción tiene una afinidad por el TGF-beta 1 latente a pH 7,4 que es al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 55 veces, 60 veces, 65 veces, 70 veces, 75 veces, 80 veces, 85 veces, 90 veces, 95 veces, 100 veces, 200 veces, 400 veces, 1000 veces, 10000 veces o más mayor que la afinidad a pH 5,8.

La afinidad de unión se puede medir usando, sin limitaciones particulares, métodos de resonancia de plasmón superficial (tales como BIACORE (marca registrada)). Cuando se utiliza la medición de BIACORE (marca registrada), en algunas realizaciones, se utilizan preferentemente las siguientes condiciones de amortiguación y temperatura: ACES 20 mM, NaCl 150 mM, 0,05 % de Tween-20 y 0,005 % de NaN₃. La constante de velocidad de asociación (kon) y la constante de velocidad de disociación (koff) se pueden calcular utilizando el software de evaluación BIACORE (marca registrada) T200

(GE Healthcare) basado en un modelo simple de unión Langmuir uno a uno mediante el ajuste de los sensogramas de asociación y disociación simultáneamente. La constante de disociación en equilibrio (KD) se calcula como una relación de koff/kon. Para detectar anticuerpos cuya afinidad de unión varía dependiendo del pH, sin limitaciones particulares, se pueden utilizar ELISA, ensayo de exclusión cinética (KinExA™) y otros, así como métodos de resonancia de plasmón superficial (como BIACORE (marca registrada)). La capacidad de unión a TGF-beta 1 latente dependiente del pH se refiere a la propiedad de unirse a TGF-beta 1 latente de una manera dependiente del pH. Mientras tanto, se puede evaluar si un anticuerpo es capaz de unirse a TGF-beta 1 latente varias veces mediante los métodos descritos, por ejemplo, en WO2009/125825.

[0220]

En una realización, es preferible que un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tenga una pequeña constante de disociación (KD) para TGF-beta 1 latente a un pH neutro. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a un pH neutro es, por ejemplo, 0,3 Nm o menos, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a un pH neutro es, por ejemplo, 0,1 Nm o menos, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a un pH neutro es, por ejemplo, 0,03 Nm o menos, pero no está limitada a ello.

[0221]

En una realización, es preferible que un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tenga una pequeña constante de disociación (KD) para TGF-beta 1 latente a pH 7,4. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a pH 7,4 es, por ejemplo, 0,3 Nm o menos, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a pH 7,4 es, por ejemplo, 0,1 Nm o menos, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a pH 7,4 es, por ejemplo, 0,03 Nm o menos, pero no está limitada a ello.

[0222]

En una realización, es preferible que un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tenga una gran constante de disociación (KD) para TGF-beta 1 latente a un pH ácido. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo

de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a un pH ácido es, por ejemplo, 3 Nm o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a un pH ácido es, por ejemplo, 10 Nm o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a un pH ácido es, por ejemplo, 30 Nm o más, pero no está limitada a ello.

[0223]

En una realización, es preferible que un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tenga una gran constante de disociación (KD) para TGF-beta 1 latente a pH 5,8. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a pH 5,8 es, por ejemplo, 3 Nm o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a pH 5,8 es, por ejemplo, 10 Nm o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de disociación de un anticuerpo de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente a pH 5,8 es, por ejemplo, 30 Nm o más, pero no está limitada a ello.

[0224]

En algunas realizaciones, la constante de disociación (KD) para TGF-beta latente humano 1 a pH 5,8 es $2,0 \times 10^{-7}$ M o más, $3,0 \times 10^{-7}$ M o más, $4,0 \times 10^{-7}$ M o más, $5,0 \times 10^{-7}$ M o más.

En algunas realizaciones, la constante de disociación (KD) para TGF-beta latente humano 1 a pH 5,8 es $2,0 \times 10^{-7}$ M a $3,0 \times 10^{-7}$ M, $2,0 \times 10^{-7}$ M a $4,0 \times 10^{-7}$ M, o $2,0 \times 10^{-7}$ M a $5,0 \times 10^{-7}$ M.

[0225]

En una realización, es preferible que la afinidad de unión de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación para TGF-beta 1 latente sea mayor a un pH neutro que a un pH ácido.

[0226]

En una realización, la relación constante de disociación entre el pH ácido y el pH neutro, $[KD(\text{pH ácido})/KD(\text{pH neutro})]$, de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación es, por ejemplo, 30 o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la relación constante de disociación entre pH ácido y pH neutro, $[KD(\text{pH ácido})/KD(\text{pH neutro})]$, de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación es, por ejemplo, 3 o más, 5 o más, 10 o más, 50 o más, 90 o más, 100 o más, 150 o más, 200 o más, por ejemplo, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500,

2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, o 9500, pero no se limita a ello.

[0227]

En una realización, la relación constante de disociación entre pH 5,8 y pH 7,4, $[KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)]$, de un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación es de 30 o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la relación constante de disociación entre pH 5,8 y pH 7,4, $[KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)]$, de un anticuerpo de la presente divulgación es, por ejemplo, 3 o más, 5 o más, 10 o más, 50 o más, 90 o más, 100 o más, 150 o más, 200 o más, por ejemplo, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, o 9500, pero no se limita a ello.

En algunas realizaciones, la relación constante de disociación entre pH 5,8 y pH 7,4, $[KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)]$, de un anticuerpo de la presente descripción para TGF-beta-1 latente humano es, por ejemplo, 100 o más, 120 o más, 130 o más, o 160 o más.

En algunas realizaciones, la relación constante de disociación entre pH 5,8 y pH 7,4, $[KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)]$, de un anticuerpo de la presente descripción para TGF-beta-1 latente humano es, por ejemplo, 100 a 170, 120 a 170, 130 a 170 o 160 a 170.

[0228]

En una realización, es preferible que un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tenga una gran tasa de disociación constante (k_{off}) a un pH ácido. En una realización, la constante de la tasa de disociación de un anticuerpo de la divulgación presente a un pH ácido es, por ejemplo, 0,003 (1/s) o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de la tasa de disociación de un anticuerpo de la divulgación presente a un pH ácido es, por ejemplo, 0,005 (1/s) o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de la tasa de disociación de un anticuerpo de la divulgación presente a un pH ácido es, por ejemplo, 0,01 (1/s) o más, pero no está limitada a ello.

[0229]

En una realización, es preferible que un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente de la presente divulgación tenga una gran tasa de disociación constante (k_{off}) a pH 5,8. En una realización, la constante de la tasa de disociación de un anticuerpo de la divulgación actual a pH 5,8 es, por ejemplo, 0,003 (1/s) o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de la tasa de disociación de un anticuerpo de la divulgación actual a pH 5,8 es, por ejemplo, 0,005 (1/s) o más, pero no está limitada a ello. En una realización, la constante de la tasa de disociación de un anticuerpo de la divulgación

actual a pH 5,8 es, por ejemplo, 0,01 (1/s) o más, pero no está limitada a ello.

[Ejemplo]

[0230]

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se comprende que se pueden practicar varias otras realizaciones, debido a la descripción general que se proporciona previamente.

[0231]

EJEMPLO 1: expresión y purificación TGF-beta 1 latente

Las secuencias usadas para la expresión y purificación fueron: TGF-beta 1 latente humano etiquetado Flag (marca registrada) (SEQ ID n.º: 64) y TGF-beta 1 latente de ratón etiquetado Flag (marca registrada) (SEQ ID n.º: 65) y TGF-beta 1 latente de macaco etiquetado Flag (marca registrada) (SEQ ID n.º: 66). Cada uno de estos TGF-beta 1 latentes etiquetados Flag (marca registrada) tiene, de su N-terminal a su C-terminal, una secuencia señalizadora derivada de la albúmina sérica de rata (SEQ ID n.º: 67), una etiqueta Flag (marca registrada) y una secuencia de TGF-beta 1 latente. El residuo de cisteína en la posición treinta (30) en cada uno de estos TGF-beta 1 latentes etiquetados Flag (marca registrada) se sustituyó con serina, que corresponde a la "mutación C33S" (véase, p. ej., Yoshinaga K, *et al.* Perturbation of transforming growth factor (TGF) beta 1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(48):18758-18763).

El TGF-beta 1 latente humano etiquetado Flag (de aquí en adelante llamado "TGF-beta 1 latente humano (SLC)" o "TGF-beta 1 latente humano"), el TGF-beta 1 latente de ratón etiquetado Flag (marca registrada) (de aquí en adelante denominado TGF-beta 1 latente de ratón (SLC)" o "TGF-beta 1 latente de ratón"), o TGF-beta 1 latente de macaco etiquetado Flag (marca registrada) (de aquí en adelante denominado TGF-beta 1 latente de macaco (SLC)" o "TGF-beta 1 latente de macaco") se expresó de forma transitoria mediante estirpe celular FreeStyle293-F o Expi293F (Thermo Fisher Scientific) junto con plásmido que expresa Furin humano. Los medios condicionados que expresan TGF-beta 1 latente humano, de ratón o de macaco (SLC) se aplicaron a una columna empaquetada con resina de afinidad M2 anti Flag (Sigma), y el TGF-beta 1 latente (SLC) se eluyó con un péptido Flag (marca registrada) (Sigma). Las fracciones que contienen TGF-beta 1 latente humano, de ratón o de macaco (SLC) se recolectaron y se sometieron a una columna de filtración de gel SUPERDEX (marca registrada) 200 (GE healthcare) equilibrada con 1x PBS. Las fracciones que contienen TGF-beta 1 latente humano, de ratón o de macaco (SLC) luego se juntaron y se almacenaron a -80 °C.

[0232]

Ejemplo 2. humanización y optimización del anticuerpo anti-TGF-beta 1

(2-1) Humanización

Un anticuerpo anti-TGF-beta padre TBA0947, anticuerpo quimérico, se humanizó de la siguiente manera. Primero, se diseñaron regiones variables de las cadenas livianas y pesadas de anticuerpos humanizados usando regiones variables de TBA0947 y marcos de líneas germinales humanas. Luego, los polinucleótidos de cada región variable de cadena pesada y de cada región variable de cadena liviana diseñadas se clonaron como vectores de expresión que contenían la secuencia SG181 de región constante de cadena pesada (SEQ ID n.º: 22) y la secuencia SK1 de región constante de cadena liviana (SEQ ID n.º: 25), respectivamente. Los anticuerpos humanizados se expresaron de forma transitoria en las células FreeStyle 293-F (Thermo Fisher Scientific), y se llevó a cabo el análisis Biacore (marca registrada). Se seleccionó un anticuerpo humanizado que mostró, al menos, actividad de unión de Biacore (marca registrada) parecida al anticuerpo parental.

[0233]

(2-2) Optimización

Un anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente humano hT0947AE07-SG191 se desarrolló a partir de TBA0947 mejorando la afinidad/actividad de unión del antígeno. Aunque su afinidad/actividad de unión preferible al antígeno, el hT0947AE07-SG191 mostró una aclaración rápida en el estudio de PK del mono cinomolgo (Figs. 14-1 y 14-6). Para el estudio de PK en mono cinomolgo, se utilizó la región constante de cadena pesada basada en IgG1 humana llamada SG191 (SEQ ID NO 23), ya que muestra una mejor unión a FcRn humana para mejorar el perfil de PK.

Para mejorar aún más su perfil farmacocinético, el anticuerpo dependiente del pH T0947H0053H0156-SG181/T0947L001L0049-SK1 se desarrolló a partir del hT0947AE07-SG181 mediante la exploración de histidina de sus CDR de cadena pesada y CDR de cadena liviana. La unión dependiente del pH fue evaluada por el análisis de Biacore (marca registrada). En el análisis de Biacore (marca registrada), la región constante de cadena pesada basada en IgG1 humana llamada SG181 (SEQ ID NO 22) se utilizó para la captura estable en el chip del sensor Biacore (marca registrada). Mientras que el anticuerpo dependiente del pH mostró disociación del TGF-beta 1 latente humano en pH 5,8 en el análisis de Biacore (marca registrada), la afinidad de unión al TGF-beta 1 latente humano en pH 7,4 no es lo suficientemente fuerte con K_D 1,34E-08 M (Fig. 2). Por lo tanto, las variantes de anticuerpos se diseñaron para mejorar

la afinidad hacia el TGF-beta 1 humano, manteniendo las características dependientes del pH.

[0234]

En primer lugar, T0947H0053H0156-SG181/T0947L001L0049-SK1 fue sometido a una mutagénesis completa de todos los residuos en sus CDR de cadena pesada. Cada aminoácido fue sustituido por otros 18 aminoácidos naturales, excluyendo el aminoácido original y la cisteína. En total, se diseñaron 648 variantes de anticuerpos a través de la mutagénesis integral. Las variantes de anticuerpos diseñados se expresaron transitoriamente en células Expi293 (marca) (Thermo Fisher Scientific) y se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo. Todos los anticuerpos producidos fueron evaluados en el análisis de Biacore (marca registrada) hacia el TGF-beta 1 latente en humanos y ratones y el ensayo de neutralización in vitro del TGF-beta 1 latente en humanos y ratones contra la plasmina (PLN), así como el título de expresión de anticuerpos.

[0235]

Se llevaron a cabo sucesivas rondas de diseño de combinaciones de mutaciones en CDR para identificar las secuencias preferibles de aminoácidos en CDR utilizando datos para cada variante evaluada in vitro experimentos por el Biacore (marca registrada) y el ensayo de neutralización para TGF-beta latente 1 como se mencionó anteriormente. Todos los anticuerpos diseñados fueron producidos por expresión transitoria en células Expi293 y evaluados en el análisis de Biacore (marca registrada) hacia el TGF-beta 1 latente en humanos y ratones y el ensayo de neutralización del TGF-beta 1 latente en humanos y el TGF-beta 1 latente en ratones contra PLN, así como el título de expresión de anticuerpos.

[0236]

En la primera ronda, se diseñaron y generaron 40 variantes de anticuerpos. Para cada anticuerpo generado, Biacore (marca registrada) evaluó la unión dependiente del pH al TGF-beta 1 latente humano y al TGF-beta 1 latente del ratón. Con base en los resultados de Biacore (marca registrada) y la actividad de neutralización, se diseñaron anticuerpos con mutaciones combinadas para la segunda ronda.

[0237]

De las rondas 2 a 6, se diseñaron y probaron 80 variantes de anticuerpos en cada ronda. Aunque se evaluaron 480 variantes de anticuerpos en total, la KD a pH 7,4 para el TGF-beta 1 latente humano no pudo mejorarse lo suficiente, manteniendo las características de unión dependientes del pH. Así, para explorar más mutaciones de anticuerpos, se seleccionó T0947H0053H1184-SG181/T0947L001L0083-SK1 de todas las variantes de

anticuerpos evaluadas a través de 1st a 6 rondas de diseño de anticuerpos, y se realizó otra mutagénesis integral de sus CDR de cadena pesada. Luego, se evaluaron 450 variantes de anticuerpos con mutación única de T0947H0053H1184-SG181/T0947L001L0083-SK1 mediante el ensayo de neutralización de Biacore (marca registrada) e in vitro TGF-beta 1. Las posibles mutaciones de anticuerpos se utilizaron para combinarse en las rondas posteriores de diseño de anticuerpos.

[0238]

En las rondas 7^a y 8^a, se diseñaron 80 anticuerpos en cada ronda y se probaron para la actividad de Biacore (marca registrada) y neutralización. En las rondas 9^a y 10^a, se diseñaron 120 anticuerpos en cada ronda y se probaron para la actividad de Biacore (marca registrada) y neutralización. En las rondas 11^a a 13^a, se diseñaron 80 anticuerpos en cada ronda y se probaron para la actividad de Biacore (marca registrada) y neutralización.

[0239]

Después de la 13^a ronda, hT0947AE20-SG181, hT0947AE22-SG181, hT0947AE23-SG181, hT0947AE24-SG181, hT0947AE24-SG181, se seleccionaron hT0947AE25-SG181 y hT0947AE26-SG181 de todas las variantes de anticuerpos diseñadas y probadas minuciosamente rondas de 1 a 13^a y una mutagénesis completa basada en las características de unión de Biacore (marca registrada) y la actividad de neutralización. A través del proceso de optimización de anticuerpos, la KD de esos anticuerpos se mejoró claramente con respecto al anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente humano dependiente del pH T0947H0053H0156-SG181/T0947L001L0049-SK1, y esos anticuerpos mostraron una fuerte actividad de neutralización hacia el TGF-beta-1 latente humano contra PLN (Fig. 1). Estos resultados sugieren que los anticuerpos potencialmente con eficacia in vivo podrían generarse a través de la optimización de anticuerpos. Sin embargo, la KD de esos anticuerpos para el TGF-beta 1 latente humano en pH 7,4 fue 2,5 - 5 veces mayor que el anticuerpo TGF-beta 1 latente no dependiente del pH hT0947AE07-SG181 (Figs. 2 y 3) lo que sugiere que la afinidad de esos anticuerpos todavía puede mejorarse. Por lo tanto, se aplicaron rondas adicionales de ingeniería de anticuerpos.

[0240]

Como un esfuerzo por diseñar anticuerpos que tengan mejor afinidad/actividad de unión de antígenos hacia el TGF-beta 1 latente humano, se modificó el método para evaluar los resultados de Biacore (marca registrada) utilizado para las siguientes rondas de diseño de anticuerpos. Para los anticuerpos diseñados en las rondas 1 a 13, los

resultados de Biacore (marca registrada) fueron evaluados en base tanto a KD a pH neutro como a la dependencia del pH a TGF-beta 1 latente humano. Mientras que, para los anticuerpos diseñados en las rondas 14^a a 17^a, los resultados de Biacore (marca registrada) se evaluaron con base en KD a pH neutro hacia el TGF-beta 1 latente humano.

[0241]

Después de las 13^a rondas, hT0947AE22-SG181 que mostró una rápida disociación del TGF-beta 1 latente humano en pH 5,8 fue seleccionado para otra mutagénesis completa en sus CDR de cadena pesada y liviana. se produjeron 1134 variantes para la caracterización in vitro. Mediante el uso de los resultados de caracterización in vitro para anticuerpos generados a través de mutagénesis integral, se realizaron rondas adicionales de diseño y caracterización de anticuerpos hasta la 17^a ronda. En las rondas 14^a a 17^a, se diseñaron y produjeron 150, 96, 160 y 180 variantes de anticuerpos, respectivamente. En estas rondas 14^a a 17^a, se realizó la optimización de anticuerpos para mejorar la afinidad en los valores de KD evaluados en Biacore (marca registrada) en lugar de las propiedades de unión dependientes del pH. Además, se realizaron AC-SINS y PEG-SPR para todas las variantes de anticuerpos diseñadas en las rondas 14 a 17 para encontrar variantes de anticuerpos con propiedades fisicoquímicas preferidas porque los anticuerpos en rondas anteriores obtuvieron un aumento de hidrofobicidad. Los anticuerpos fueron diseñados para mantener los datos de AC-SINS y PEG-SPR al nivel similar al de los anticuerpos clínicos que ya están aprobados por la FDA. Como se muestra en la Fig. 3, de las rondas 14 a 17, KD para el TGF-beta 1 latente humano podría mejorarse mientras se mantienen las características de unión dependientes del pH. De todos los anticuerpos generados a través de las sucesivas rondas de diseño de anticuerpos y proceso de caracterización in vitro, anticuerpos anti- TGF-beta 1 latentes dependientes del pH de hT0947AE20-SG181, hT0947AE22-SG181, hT0947AE23-SG181, hT0947AE24-SG181, hT0947AE25-SG181, se seleccionaron hT0947AE26-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181 y hT0947AE37-SG181 de todas las variantes de anticuerpos evaluadas a través de todas las rondas de diseño de anticuerpos.

[0242]

(2-3) Secuencia de aminoácidos de anticuerpo optimizado

Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente se enumeran en la Tabla 3.

[0243]

[Tabla 3]

Nombre del anticuerpo	Nombre VH	VH SEQ ID NO	Nombre CH	CH SEQ ID NO	Nombre VL	VL SEQ ID NO	Nombre CL	CL SEQ ID NO	Remarca
hT0947AE07-SG181	T0947H0 053H0066	1	SG181	22	T0947L00 1L0049	12	SK1	25	IgG1 humana -
T0947H0053H0 156-SG181/T0947L 001L0049-SK1	T0947H0 053H0156	2	SG181	22	T0947L00 1L0049	12	SK1	25	IgG1 humana
T0947H0053H1 184-SG181/T0947L 001L0083-SK1	T0947H0 053H1184	3	SG181	22	T0947L00 1L0083	13	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE20-SG181	T0947H0 053H1185	4	SG181	22	T0947L00 1L0127	16	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE22-SG181	T0947H0 053H1222	5	SG181	22	T0947L00 1L0109	15	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE23-SG181	T0947H0 053H2151	7	SG181	22	T0947L00 1L0226	18	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE24-SG181	T0947H0 053H2158	8	SG181	22	T0947L00 1L0096	14	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE25-SG181	T0947H0 053H1890	6	SG181	22	T0947L00 1L0083	13	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE26-SG181	T0947H0 053H1890	6	SG181	22	T0947L00 1L0290	19	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE27-SG181	T0947H0 053H3061	9	SG181	22	T0947L00 1L0936	21	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE34-SG181	T0947H0 053H3306	11	SG181	22	T0947L00 1L0215	17	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE37-SG181	T0947H0 053H3254	10	SG181	22	T0947L00 1L0386	20	SK1	25	IgG1 humana

hT0947AE07-SG191	T0947H0053H0066	1	SG191	23	T0947L001L0049	12	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE20-SG191	T0947H0053H1185	4	SG191	23	T0947L001L0127	16	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE22-SG191	T0947H0053H1222	5	SG191	23	T0947L001L0109	15	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE23-SG191	T0947H0053H2151	7	SG191	23	T0947L001L0226	18	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE24-SG191	T0947H0053H2158	8	SG191	23	T0947L001L0096	14	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE25-SG191	T0947H0053H1890	6	SG191	23	T0947L001L0083	13	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE26-SG191	T0947H0053H1890	6	SG191	23	T0947L001L0290	19	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE27-SG191	T0947H0053H3061	9	SG191	23	T0947L001L0936	21	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE34-SG191	T0947H0053H3306	11	SG191	23	T0947L001L0215	17	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE37-SG191	T0947H0053H3254	10	SG191	23	T0947L001L0386	20	SK1	25	IgG1 humana
hT0947AE07-mF18	T0947H0053H0066	1	mF18	24	T0947L001L0049	12	mk1	26	IgG1 de ratón
hT0947AE20-mF18	T0947H0053H1185	4	mF18	24	T0947L001L0127	16	mk1	26	IgG1 de ratón
hT0947AE22-mF18	T0947H0053H1222	5	mF18	24	T0947L001L0109	15	mk1	26	IgG1 de ratón
hT0947AE27-mF18	T0947H0053H3061	9	mF18	24	T0947L001L0936	21	mk1	26	IgG1 de ratón
hT0947AE34-mF18	T0947H0053H3306	11	mF18	24	T0947L001L0215	17	mk1	26	IgG1 de ratón
hT0947AE37-mF18	T0947H0053H3254	10	mF18	24	T0947L001L0386	20	mk1	26	IgG1 de ratón

[0244]

Las secuencias de HVR de cadena pesada (CDR) y las secuencias de marco (FR) de cada anticuerpo se muestran en la Tabla 4-1.

[0245]

[Tabla 4-1]

Nombre anticuerpo	Nombre VH	HVR1	HVR2	HVR3	FR1	FR2	FR3	FR4
		SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO
hT0947AE07	T0947H0053H0066	27	30	34	41	44	45	46
T0947H0053H0156/ T0947L001L0049	T0947H0053H0156	27	30	35	41	44	45	47
T0947H0053H1184/ T0947L001L0083	T0947H0053H1184	28	30	36	41	44	45	47
hT0947AE20	T0947H0053H1185	29	30	36	42	44	45	47
hT0947AE22	T0947H0053H1222	29	30	37	43	44	45	47
hT0947AE23	T0947H0053H2151	29	30	38	43	44	45	47
hT0947AE24	T0947H0053H2158	27	30	37	43	44	45	47
hT0947AE25	T0947H0053H1890	28	31	36	43	44	45	47
hT0947AE26	T0947H0053H1890	28	31	36	43	44	45	47
hT0947AE27	T0947H0053H3061	28	32	37	43	44	45	47
hT0947AE34	T0947H0053H3306	27	30	39	43	44	45	47
hT0947AE37	T0947H0053H3254	27	33	40	43	44	45	47

[0246]

La secuencia de cadena liviana HVR (CDR) y estructura de secuencias (FR) de cada anticuerpo se muestran en la Tabla 4-2.

[0247][Tabla 4-2]

Nombre anticuerpo	Nombre VL	HVR1	HVR2	HVR3	FR1	FR2	FR3	FR4
		SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ
		ID NO	ID NO	ID NO	ID NO	ID NO	ID NO	ID NO
hT0947AE07	T0947L001L0049	48	52	55	60	61	62	63
T0947H0053H0156/ T0947L001L0049	T0947L001L0049	48	52	55	60	61	62	63
T0947H0053H1184/ T0947L001L0083	T0947L001L0083	49	52	55	60	61	62	63
hT0947AE20	T0947L001L0127	49	52	56	60	61	62	63
hT0947AE22	T0947L001L0109	48	52	56	60	61	62	63
hT0947AE23	T0947L001L0226	48	53	58	60	61	62	63
hT0947AE24	T0947L001L0096	48	54	55	60	61	62	63
hT0947AE25	T0947L001L0083	49	52	55	60	61	62	63
hT0947AE26	T0947L001L0290	49	52	59	60	61	62	63
hT0947AE27	T0947L001L0936	50	52	56	60	61	62	63
hT0947AE34	T0947L001L0215	48	53	56	60	61	62	63
hT0947AE37	T0947L001L0386	51	52	56	60	61	62	63

[0248]

(2-4) Caracterización in vitro para la detección de anticuerpos durante la optimización de anticuerpos

Ensayo de detección de Biacore (marca registrada) para la afinidad de unión y las interacciones dependientes del pH del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente hacia el TGF-beta 1 humano latente recombinante.

Se midió la afinidad de unión del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente hacia el TGF-beta 1 latente humano recombinante usando el instrumento Biacore (marca registrada) T200 (GE Healthcare). Para la detección de Biacore (marca registrada), anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humana (SG181, SEQ ID NO: 22 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. Un FC de ratón anti-humano (GE Healthcare) fue inmovilizado en todas las células de flujo de un chip de sensor CM4 usando un kit de acoplamiento de aminos (GE Healthcare). Los anticuerpos fueron capturados en las superficies del sensor FC anti-humano a un nivel de captura de alrededor de 20RU, luego se inyectó TGF-beta 1 latente humano recombinante sobre la célula de flujo. Todos los anticuerpos y analitos fueron preparados en ACES pH 7,4 conteniendo 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,005 % NaN₃. La superficie del sensor se regeneró cada ciclo con 3M MgCl₂. La afinidad de unión se determinó procesando y ajustando los datos al modelo de unión 1:1 utilizando el software de evaluación Biacore (marca registrada),

versión 3,0 (GE Healthcare).

[0249]

El análisis de interacción dependiente del pH de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente hacia TGF-beta 1 humano latente recombinante se determinó mediante un ensayo Biacore (marca registrada) modificado descrito anteriormente. Brevemente, una fase de disociación adicional a pH 5,8 se integró en el ensayo Biacore (marca registrada) inmediatamente después de la fase de disociación a pH 7,4. La tasa de disociación al buffer de pH 5,8 se determinó mediante el procesamiento y ajuste de datos utilizando el software de ajuste de curvas Scrubber 2,0 (Biologic Software).

[0250]

Espectroscopía de nanopartículas de auto-interacción de la afinidad-captura (AC-SINS) Para el ensayo AC-SINS, anticuerpos con regiones constantes IgG1 humanas (SG181, SEQ ID NO: 22 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. En el ensayo AC-SINS, se agregaron 0,025 mg/ml de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente a las nanopartículas de oro (Ted Pella Inc. #15705) pre-recubierto con 80 % de IgG policlonal anti-humano de cabra FC (Jackson ImmunoResearch #109-005-098) como captura y 20 % de anticuerpos no específicos de cabra (Jackson ImmunoResearch #005-000-003). Los anticuerpos se incubaron con las nanopartículas de oro prereducidas durante 2 horas a temperatura ambiente y el cambio de longitud de onda se midió utilizando SpectraMax (marca registrada) M2 (dispositivos moleculares).

[0251]

Ensayo de precipitación de anticuerpos inducido por polietilenglicol (PEG)

Para el ensayo PEGSPR, anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humana (SG181, SEQ ID NO 22: Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. En el ensayo PEG-SPR, se añadió un volumen igual de 0,05 mg/ml de concentración de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente a la solución PEG al 25 %. Las mezclas se mezclaron en la coctelera a 700 rpm durante 1 min, luego se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras fueron transferidas a la Placa de Filtro MultiScreenHTS GV y centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min. El flujo que contiene muestras solubles se analizó con el instrumento Biacore (marca registrada) 8K+ (GE Healthcare). La proteína A/G se inmovilizó en todas las células de flujo de un chip sensor CM5 usando un kit de acoplamiento de aminas (GE Healthcare). La temperatura de ensayo se fijó en 25 grados C, y el amortiguador de funcionamiento consiste en ACES pH 7,4 conteniendo 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,005 % NaN₃. Las muestras se inyectaron en las superficies del sensor de proteína A/G a 10uL/min durante 30 s. La

superficie del sensor fue regenerada cada ciclo con 10mM glicina-HCl pH 1,5. La respuesta de unión de cada muestra se analizó utilizando el software de evaluación Biacore (marca registrada) 8K, versión 1.1.1.7442 (GE Healthcare).

La solubilidad de cada muestra se analizó normalizando la respuesta de unión en PEG al PBS.

[0252]

Ensayo latente de neutralización de TGF-beta 1 contra plasmina (PLN)

Para el ensayo latente de neutralización de TGF-beta 1, anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humanas (SG181, SEQ ID NO: 22 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. Los ratones TGF-beta 1 latentes (mSLC) y los TGF-beta 1 latentes humanos (hSLC), preparados en el ejemplo 1, fueron incubados con plasmina humana (Calbiochem), con o sin presencia de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente a 37 grados C durante 1 hora. Los anticuerpos fueron pre-incubados con TGF-beta 1 latente (SLC) de ratón o humano durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de incubar con plasmina. Anticuerpo anti-KLH IC17-hIgG1 (cadena pesada SEQ ID NO: 68, Cadena liviana SEQ ID NO: 69) se utilizó como control negativo. La activación de TGF-beta 1 latente mediada por plasmina y la inhibición mediada por anticuerpos se analizaron mediante ELISA TGF-beta 1 maduro (Kit ELISA humano TGF-beta 1 Quantikine (marca registrada), sistemas de I+D) según el procedimiento del fabricante.

[0253]

Ejemplo 3. Evaluación de inmunogenicidad de anticuerpos anti- TGF-beta 1 latente

El potencial inmunogénico de los anticuerpos se evaluó utilizando como indicador la proporción de células T CD4 + IL-2 que segregan antes de la proliferación activa, como se describe en WO2018/124005 (Kubo C. et al). Específicamente, las células mononucleares CD8⁺CD25⁺ de sangre periférica baja (PBMC) fueron preparadas a partir de PBMC humanos, y las células fueron cultivadas durante 67 horas en presencia de los anticuerpos.

[0254]

Fig. 4 muestra los resultados de determinar las proporciones de células secretoras de IL-2 en las poblaciones de células cultivadas. Las frecuencias de donantes positivos para hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191 y hT0947AE37-SG191 fueron similares o ligeramente superiores a las del control negativo. Por otro lado, las frecuencias de donantes positivos para hT0947AE22-SG191, hT0947AE23-SG191, hT0947AE24-SG191, hT0947AE25-SG191 y hT0947AE26-SG191 fueron superiores a las del control negativo. Estos resultados sugirieron que hT0947AE20-

SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191 y hT0947AE37-SG191 se consideraron con bajo potencial inmunogénico.

[0255]

Ejemplo 4. Evaluación de la afinidad de unión de Biacore (marca registrada) de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente hacia el TGF-beta 1 recombinante humano, cyno y ratón latente

Para la evaluación de la afinidad de Biacore (marca registrada), anticuerpos con regiones constantes IgG1 humanas (SG191, SEQ ID NO: 23 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. La afinidad de unión de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0497AE20-SG191, hT0497AE27-SG191, hT0497AE34-SG191 y hT0497AE37-SG191) hacia TGF-beta 1 latentes humanos, cyno y ratones se midió utilizando el instrumento Biacore (marca registrada) 8K Healthcare. Un FC de ratón anti-humano (GE Healthcare) fue inmovilizado en todas las células de flujo de un chip de sensor CM5 usando un kit de acoplamiento de aminos (GE Healthcare). Los anticuerpos fueron capturados en las superficies del sensor FC anti-humano a un nivel de captura de alrededor de 20RU, luego se inyectó TGF-beta 1 latente recombinante 1 de humanos, cyno y ratones sobre la célula de flujo. Todos los anticuerpos y analitos fueron preparados en ACES pH 7,4 conteniendo 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,005 % NaN₃. La superficie del sensor se regeneró cada ciclo con 3 M MgCl₂. La afinidad de unión se determinó procesando y ajustando los datos al modelo de enlace 1:1 utilizando el software de evaluación Biacore (marca registrada) 8K, versión 1.1.1.7442 (GE Healthcare).

[0256]

La afinidad de unión de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente hacia TGF-beta 1 latente de humanos, cyno y ratones en pH 7,4 y pH 5,8 se muestra en las Figuras. 5 y 6, respectivamente. Los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente dependientes del pH mostraron disociación a pH ácido 5,8 con kd 3,93E-02 a 6,54E-02 como se muestra en la fig. 6 mientras que el anticuerpo hT0947AE07-SG191 mostró disociación más lenta con kd 1,49E-03 a pH 5,8.

[0257]

La Fig. 7 muestra las proporciones (pH 5,8/pH 7,4) de koff y KD (que se calcularon a partir de los resultados de Figs. 5 y 6) para hT0947AE07-SG191, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191 y hT0947AE37-SG191.

[0258]

Ejemplo 5. Caracterización del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente

(5-1) Anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente unido a la superficie celular TGF-beta 1 latente Para el ensayo FACS, anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humana (SG191, SEQ ID NO: 23 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. Las actividades de unión de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0497AE20-SG191, hT0497AE27-SG191, hT0497AE34-SG191 y hT0497AE37-SG191) a la superficie celular latente TGF-beta 293 Los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (10 microgramos/ml cada uno) fueron incubados con cada línea celular durante 30 minutos a 4 grados C y lavados con tampón FACS (2 % PBS, 2mM EDTA en PBS). Anticuerpo anti-KLH con región humana IgG1 FC, IC17dK-SG181 (cadena pesada SEQ ID NO: 70, Cadena liviana SEQ ID NO: 71), que no se une al TGF-beta 1 latente del ratón ni al TGF-beta 1 latente humano, se utilizó como un anticuerpo control negativo. Se agregó anti IgG humano F(ab')₂ de cabra, PE-ads de ratón (Southern Biotech, Cat. 2043-09) e incubó durante 30 minutos a 4 grados C y se lavó con tampón FACS. La adquisición de datos se realizó en un verso FACS (Becton Dickinson), seguido del análisis y cálculo de la intensidad de fluorescencia media (MFI), utilizando el software FlowJo (marca registrada) (Tree Star) y el software GraphPad Prism (GraphPad). Como se muestra en la Fig. 8, todos los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente unidos a la superficie de la célula de ratón latente TGF-beta 1 expresada en las células Ba/F3 y la superficie de la célula humana latente TGF-beta 1 expresada en las células FreeStyle™ 293-F

[0259]

(5-2) El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibió la activación espontánea de TGF-beta 1 latente.

Para el ensayo latente de neutralización de TGF-beta 1, anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humanas (SG191, SEQ ID NO: 23 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. El ratón latente TGF-beta 1 (mSLC) y el humano latente TGF-beta 1 (hSLC), que fueron preparados en el ejemplo 1, fueron incubados con o sin la presencia de uno de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0497AE20-SG191, hT0497AE27-SG191, h0471-SG191 y AE37-SG71 grado AE71 37). El anticuerpo anti-KLH, IC17dk-SG181 (cadena pesada SEQ ID NO: 70, Cadena liviana SEQ ID NO: 71), se utilizó como control negativo. La activación espontánea de TGF-beta 1 latente y la inhibición mediada por anticuerpos de la activación espontánea de TGF-beta 1 latente se analizaron mediante ELISA de TGF-beta 1 maduro (kit de ELISA Quantikine (marca registrada) humano TGF-beta 1, sistemas de I+D) según el procedimiento del fabricante.

Como se muestra en la Fig. 9, la activación espontánea de TGF-beta 1 latente fue

suprimida por anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente.

[0260](5-3) Anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibida por la plasmina (PLN) mediada por la activación TGF-beta 1 latente

Para el ensayo latente de neutralización de TGF-beta 1, anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humanas (SG191, SEQ ID NO: 23 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. Los TGF-beta 1 latentes de ratones (mSLC) y los TGF-beta 1 latentes humanos (hSLC), que fueron preparados en el ejemplo 1, fueron incubados con plasmina humana (Calbiochem), con o sin la presencia de uno de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT049734-SG191, AE71-SG971 y AE71-37-SG71). Los anticuerpos fueron pre-incubados con TGF-beta 1 (SLC) latente de ratón o humano durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de incubar con plasmina. Anticuerpo anti-KLH, IC17dk-SG181 (cadena pesada SEQ ID NO: 70, Cadena liviana SEQ ID NO: 71), se utilizó como control negativo. La activación de TGF-beta 1 latente mediada por plasmina y la inhibición mediada por anticuerpos se analizaron mediante ELISA TGF-beta 1 maduro (Kit ELISA humano TGF-beta 1 Quantikine (marca registrada), sistemas de I+D) según el procedimiento del fabricante. Como se muestra en la Fig. 10, la activación de TGF-beta 1 latente mediada por plasmina fue suprimida por anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente.

[0261]

(5-4) El anticuerpo anti TGF-beta 1 latente inhibió la activación TGF-beta 1 latente mediada por la calicreína plasmática (PLK)

Para el ensayo de neutralización de anticuerpos TGF-beta 1 latente con regiones constantes de IgG1 humanas (SG191, SEQ ID NO: 23 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. Ratón latente TGF-beta 1 (mSLC) y humano latente TGF-beta 1 (hSLC), los cuales fueron preparados en el Ejemplo 1, fueron incubados cada uno con calicreína humana (Laboratorios de Investigación Enzimática), con o sin la presencia de uno de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0497AE20-SG191, hT0497AE27-SG191, hT0497AE34-SG191 y hT049737-SG191) a 37 horas AEC. Los anticuerpos fueron pre-incubados con TGF-beta 1 (SLC) latente de ratón o humano durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de incubar con calicreína. El anticuerpo anti-KLH, IC17dk-SG181 (cadena pesada SEQ ID NO 70, cadena liviana SEQ ID NO 71), se utilizó como control negativo. La activación de TGF-beta 1 latente mediada por calicreína y la inhibición mediada por anticuerpos se analizaron mediante ELISA de TGF-beta 1 maduro (Kit ELISA de TGF-beta 1 humano Quantikine (marca registrada) ELISA, sistemas de I+D) según el procedimiento del fabricante. Como se

muestra en la Fig. 11, la activación TGF-beta 1 latente mediada por calicreína fue suprimida por anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente.

[0262]

(5-5) Anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente inhibe la activación de TGF-beta 1 latente mediado por MMP2 y MMP9

Para el ensayo de neutralización de TGF-beta 1 latente, anticuerpos con regiones constantes de IgG1 humanas (SG191, SEQ ID NO: 23 y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. TGF-beta 1 latente humano (SLC), que se preparó en el ejemplo 1, se incubó con metaloproteinasa activada 2 (MMP2) o MMP9 (R&D systems), con o sin la presencia de uno de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0497AE20-SG191, hT0497AE27-SG191, hT0497AE34-SG191 y hT0497AE37-SG191) a 37 °C durante 2 horas. Los anticuerpos se preincubaron con TGF-beta 1 latente humano (SLC) durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de incubarlo con MMP2 o MMP9. El anticuerpo anti KLH IC17dk-SG181 (Cadena pesada de la SEQ ID NO: 70, Cadena liviana de la SEQ ID NO: 71), se usó como control negativo. La activación de TGF-beta 1 latente humano mediado por MMP2 y MMP9, y la inhibición mediada por anticuerpo se analizaron mediante ELISA de TGF-beta 1 maduro (TGF-beta 1 humano Quantikine (marca registrada) ELISA Kit, R&D systems) según el procedimiento del fabricante. Como se muestra en la Figura 11, la activación de ambos TGF-beta 1 latente humano mediado por MMP2 y el TGF-beta 1 latente mediado por MMP9 se suprimieron mediante anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente.

[0263]

(5-6) Anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente tiene menos impacto en la inhibición en la activación de TGF-beta 1 latente mediado por integrina en ratones PBMC

El ensayo de cocultivo celular TGF-beta PBMC de ratón y HEK-Blue™ se llevó a cabo para detectar la activación de TGF-beta 1 latente mediado por integrina. El PBMC de ratón se aisló de la sangre de ratón con un medio gradiente de densidad Histopaque-1083 (Sigma-Aldrich). Las células TGF-beta HEK-Blue™ (Invivogen), que expresa genes reporteros SEAP inducibles por (SBE) de elementos de unión Smad3/4, permite la detección de TGF-beta 1 bioactivo (tanto TGF-beta 1 de ratón como TGF-beta 1 humano) al monitorear la activación de Smad3/4. TGF-beta 1 activo estimula la producción de SEAP y su secreción en el sobrenadante celular. La cantidad de SEAP secretada se evaluó usando el reactivo QUANTI-Blue™ (Invivogen).

[0264]

Las células TGF-beta de HEK-Blue™ se mantuvieron en el medio DMEM (Gibco)

complementadas con suero bovino fetal al 10 %, estreptomicina 50 U/ml, penicilina 50 microgramos/ml, Normocina (marca registrada) 100 microgramos/ml, Blastidina 30 microgramos/ml, HygroGold (marca registrada) 200 microgramos/ml y Zeocin (marca registrada) 100 microgramos/ml. Durante el ensayo funcional, el medio para las células se cambió a medio de ensayo (RPMI1640 con 10 % de FBS) y se sembró a placa de 96 pozos. Luego, uno de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0947AE20-SG191, hT0947AE34-SG191 o hT0947AE37-SG191) y PBMC de ratón se aplicaron a los pozos e incubaron junto con células TGF-beta HEK-Blue™ durante la noche. Luego se mezcló el sobrenadante celular con QUANTI-Blue™ y se midió la densidad óptica (DO) a 620 nm en un lector de placas colorimétricas. PÉPTIDO RGD (GRRGDLATIH) (SEQ ID NO: 101), GenScript) es conocido por unirse a las integrinas y servir como un ligando de la integrina señuelo para suprimir la activación de TGF-beta 1 mediada por integrinas. Por lo tanto, el péptido RGD fue utilizado como un control positivo. Además, el péptido de control RGE (GRRGELATIH (SEQ ID NO: 102), GenScript), que se sabe que no sirve como un señuelo de ligando de integrina, se utilizó como un control negativo. Anticuerpo anti-KLH, IC17dk-SG181 (cadena pesada SEQ ID NO: 70, Cadena liviana SEQ ID NO: 71), se utilizó como control negativo. Anticuerpo anti-TGF-beta maduro, GC1008-F1332m (cadena pesada SEQ ID NO: 76, Cadena liviana SEQ ID NO: 77), se utilizó como control positivo. F1332m es una región constante de cadena pesada IgG1 humana que incluye sustituciones de aminoácidos para reducir la función del efector.

[0265]

Como se muestra en la Fig. 12, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente tuvieron menos impacto sobre la inhibición de la activación de TGF-beta 1 mediada por integrina en PBMC de ratón en comparación con los de los controles positivos.

[0266]

(5-7) El anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente tuvo menos impacto en la inhibición de la activación TGF-beta 1 latente mediada por integrina en Detroit 562

Detroit 562 y HEK-Blue™ TGF-beta ensayo de cocultivo celular se llevó a cabo para detectar la activación de TGF-beta 1 latente mediada por integrinas. Detroit 562 fue comprado a ATCC (Virginia, EE.UU.). Las células TGF-beta (Invivogen) de HEK-Blue™, que expresan los genes de los reporteros SEAP inducibles por los elementos de unión Smad3/4 (SBE), permiten la detección de TGF-beta 1 bioactivo (TGF-beta 1 del ratón y TGF-beta 1 humana) mediante el monitoreo de la activación de Smad3/4. El TGF-beta 1 activa estimula la producción de SEAP y su secreción en sobrenadante celular. La

cantidad de SEAP secretada se evaluó utilizando el reactivo QUANTI-Blue™ (Invivogen).

[0267]

Las células TGF-beta HEK-Blue™ se mantuvieron en medio DMEM (Gibco), con un complemento de 10 % de suero bovino fetal, 50 U/ml de estreptomicina, 50 microgramos/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de Normocin (marca registrada), 30 microgramos/ml de blasticidina, 200 microgramos/ml de HygroGold (marca registrada) y 100 microgramos/ml de Zeocina (marca registrada). Durante el ensayo funcional, el medio para las células se cambió a medio de ensayo (RPMI1640 con 10 % FBS) y se sembró en placas de 96 pocillos. Luego, uno de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0947AE07-SG191, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, o hT0947AE37-SG191) y el Detroit 562 se aplicó a los pocillos y se incubaron junto con las células TGF-beta HEK-Blue™ durante toda la noche. Luego, el sobrenadante celular se mezcló con QUANTI-Blue™ y se midió la densidad óptica (OD) a 620 nm en un lector de placa colorimétrico. El péptido RGD (GRRGDLATIH (SEQ ID NO: 101), GenScript) es conocido por unirse a integrinas y sirve como ligando de integrina señuelo para suprimir la activación de TGF-beta 1 mediada por integrina. Por lo tanto, el péptido RGD se usó como control positivo. Además, el péptido de control RGE (GRRGELATIH, (SEQ ID NO: 102), GenScript), conocido por no servir como ligando de integrina señuelo, se usó como control negativo. El anticuerpo anti KLH IC17-SG105 (Cadena pesada de la SEQ ID NO: 74, Cadena liviana de la SEQ ID NO: 75), se usó como control negativo. El anticuerpo anti-TGF-beta 1 maduro 21D1-F1332m (Cadena pesada de la SEQ ID NO: 78, Cadena liviana de la SEQ ID NO: 79), y anticuerpo Anti-integrina avb6, 3G9-mF18 (Cadena pesada de la SEQ ID NO: 80, Cadena liviana de la SEQ ID NO: 81), se usaron como control positivo. F1332m es una región constante de cadena pesada IgG1 humana que incluye sustituciones de aminoácidos para reducir la función de efector.

Como se muestra en la Figura 13, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente tiene menos impacto al inhibir la activación de TGF-beta 1 mediada por integrina en Detroit 562 en comparación con los de los controles positivos.

[0268]

Ejemplo 6. Farmacocinética del anticuerpo anti-TGF-beta 1 latente

(6-1) Prueba PK de anticuerpos pH-dependientes usando monos Cynomolgus

Se evaluó la farmacocinética en monos cinomolgus para anticuerpos anti-TGF-beta 1 humanos latentes (hT0947AE07-SG191, hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191,

hT0947AE34-SG191 y hT0947AE37-SG191). HT0947AE07-SG191 se administró a monos cinomolgos por administración intravenosa de dosis única a 0,4 y 2 mg/kg el día 0. Los otros anticuerpos se administraron a monos cinomolgos por administración intravenosa a dosis única a 0,8 y 2 o 4 mg/kg el día 0. Se administró anticuerpo anti-CD40 a monos cinomolgos por administración intravenosa a 5, 0,5, 0,5, 0,5 y 5 mg/kg los días 0, 7, 14 21 y 29, respectivamente. Las muestras de sangre se recogieron con el tiempo. Y la sangre recolectada se centrifugó inmediatamente durante 5 minutos a 1700 xg y 4 grados C para obtener plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador a -70 grados C o menos hasta que se realizaron las mediciones.

La medición de la concentración en el plasma de monos cinomolgos fue realizada por ELISA.

[0269]

Como se muestra en Figs. 14-1 a 14-6, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente humanos dependientes del pH hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191 y hT0947AE37-SG191 mostraron un aclaramiento más lento en comparación con hT0947AE07-SG191 no dependiente del pH.

[0270]

(6-2) Prueba de PK de Anticuerpo Dependiente de pH usando ratones

La farmacocinética en ratones se evaluó para anticuerpos anti-TGF-beta 1 (hT0947AE04-SG181) (cadena pesada SEQ ID NO: 103, Cadena liviana SEQ ID NO: 104), hT0947AE07-SG191, hT0947AE20-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181 y hT0947AE37-SG181). Los anticuerpos se administraron a ratones mediante la administración de una sola dosis de vena caudal a 2 y 10 mg/kg, y las muestras de sangre se recogieron con el tiempo. La sangre recolectada se centrifugó inmediatamente durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4 °C para obtener plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador a -20 °C o menos hasta que se realizaron las mediciones.

La medición de la concentración en el plasma de ratones fue realizada por ELISA.

[0271]

Como se muestra en la Fig. 14-7 a 14-10, los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente humanos dependientes del pH hT0947AE20-SG181, hT0947AE27-SG181, hT0947AE34-SG181y hT0947AE37-SG181 mostraron un aclaramiento más lento en comparación con los anticuerpos no dependientes del pH, hT0947AE04-SG181 y hT0947AE07-SG191.

[0272]

Ejemplo 7. eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente en modelo de fibrosis renal de ratón inducida por UUO

La eficacia *in vivo* de los anticuerpos monoclonales hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191 y hT0947AE37-SG191 se evaluaron en modelo de ratón de obstrucción ureteral unilateral (UUO), conocida por inducir una fibrosis renal progresiva.

[0273]

(7-1) Establecimiento del modelo de fibrosis renal de ratón inducida por UUO

Las eficacias *in vivo* de los anticuerpos monoclonales hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, y hT0947AE37-SG191 se evaluaron en modelo de ratón de obstrucción ureteral unilateral (UUO), que induce una fibrosis renal progresiva.

Se compraron ratones macho C57BL/6J ratones de 7 semanas de edad de Charles river (Kanagawa, Japón) y se aclimataron durante 1 semana antes de comenzar con el tratamiento. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de iluminación diurna regular (12:12 luz: Oscuridad) con libre acceso a alimentos (CE-2, CLEA Japón, Tokio, Japón) y agua.

[0274]

La cirugía de UUO se llevó a cabo bajo condiciones de anestesia con isoflurano. El lado izquierdo del abdomen se afeitó y se hizo una incisión vertical en la piel. Se hizo una segunda incisión en el peritoneo y esa piel también se retrajo para mostrar el riñón. Con fórceps, el riñón se trajo a superficie, y la uretra izquierda se ató con sutura quirúrgica de seda, dos veces, por debajo del riñón. El riñón ligado se volvió a colocar en la posición anatómica correcta, y se suturaron el peritoneo y la piel. Se agregó agente analgésico para reducir el malestar del animal. En el grupo de operación simulada, solo de realizaron una incisión y una sutura en el peritoneo y la piel.

[0275]

(7-2) Evaluación de la eficacia *in vivo*

Todos los anticuerpos monoclonales se administraron por inyección subcutanea, comenzando un día después de la cirugía UUO. El anticuerpo anti KLH IC17-mF18 (cadena pesada de la SEQ ID NO: 72, cadena liviana de la SEQ ID NO: 73 se usó como un control negativo en este estudio. El grupo de operación simulada recibió un anticuerpo anti KLH (IC17-mF18). Los animales se pesaron y se mataron por exanguinación bajo anestesia con isoflurano 7 días después de la operación. Se recolectaron muestras de sangre de las cavidades del corazón o de la vena poscava

transferidas a tubos con heparina, y se centrifugaron (10.000 g, 10 min, 4 grados C) para preparar muestras de plasma. El riñón se retiró rápidamente. Parte del tejido del riñón se congeló rápidamente en nitrógeno o en hielo seco para un análisis molecular.

[0276]

Se midió el contenido de hidroxiprolina en el riñón, uno de los aminoácidos incluidos en el colágeno, para evaluar la deposición fuera de la matriz en el tejido. Los tejidos húmedos del riñón se secaron a 110 °C durante la noche y se pesaron. Luego, 6N HCl (100 microlitros/1 mg de tejido seco) se agregó al tejido seco, y se hirvió 110 grados C durante la noche. Se limpiaron las muestras en el filtro, y se colocaron 10 microlitros de cada muestra en una placa de 96 pocillos. La placa con las muestras se secó a 60 °C, y se midió la hidroxiprolina usando el juego de ensayo de hidroxiprolina (BioVision) o análisis de espectrometría de masas. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 15. Se observó un aumento significativo en el contenido de hidroxiprolina en el riñón inducido muerto, y todos los anticuerpos (hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191, hT0947AE34-SG191, y hT0947AE37-SG191) inhibieron la fibrosis del renal. Los datos se presentan como error promedio +/- normalizado de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la prueba t de Student o la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Cuando los valores de P fueron <0,05, las diferencias se consideraron significativas.

[0277]

Ejemplo 8. Eficacia in vivo de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente en el modelo AGBM

La eficacia in vivo de los anticuerpos monoclonales hT0947AE07-MF18, hT0947AE20-MF18, hT0947AE34-MF18 y hT0947AE37-MF18 se evaluó en el modelo de nefritis glomerular inducida por suero antiGBM (modelo de ratón AGBM) que se sabe causa glomeruloesclerosis.

[0278]

(8-1) Establecimiento del modelo de ratón AGBM

Los ratones hembras C57BL/6JJcl de siete semanas de edad fueron presensibilizados por inyección subcutánea con IgG de oveja. Después de cinco días de presensibilización, el suero nefrotóxico (NTS) que contenía anticuerpo anti-GBM se inyectó por vía intravenosa durante 3 días. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de iluminación diurna regular (12:12 luz: Oscuridad) con libre acceso a alimentos (CE-2, CLEA Japón, Tokio, Japón) y agua.

[0279]

(8-2) Evaluación de la eficacia in vivo

Todos los anticuerpos monoclonales fueron administrados 30 mg/kg por inyección subcutánea 2 veces a la semana, iniciada a partir de un día antes de la inyección de NTS. Anticuerpo anti-KLH, IC17-MF18 (cadena pesada SEQ ID NO: 72, Cadena liviana SEQ ID NO: 73), fue utilizado como control negativo en este estudio. Los riñones fueron colectados 14 días después de la primera inyección de NTS. Para analizar la glomeruloesclerosis, se utilizó un clasificador (DenseNet AI V2 (Plugin)) de Halo AI para crear el modelo de clasificación glomerular mediante el entrenamiento de glomerulos escleróticos anotados y no escleróticos en algunos ratones y luego se aplicó para todos los ratones.

Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 16. Se observó un aumento significativo de la glomeruloesclerosis en ratones control de la enfermedad y todos los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente suprimieron el número de glomerulos escleróticos. Los datos se presentan como error promedio +/- normalizado de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la prueba t de Student o la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Cuando los valores de P fueron <0,05, las diferencias se consideraron significativas.

[0280]

Ejemplo 9. Eficacia in vivo de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente en el modelo de ratón Alport

La eficacia in vivo de los anticuerpos monoclonales hT0947AE20-MF18 y hT0947AE37-MF18 se evaluó en el modelo de ratón knockout Col4a3 (modelo de ratón Alport) que se sabe que causa disfunción renal progresiva.

[0281]

(9-1) Establecimiento de ratones knockout Col4a3

Una cepa de ratón knockout del gen Col4a3 fue establecida por la edición de genes mediada por Zinc Finger Nuclease (ZFN). Un par de ZFN fueron diseñados para inducir mutaciones en el exón 48, que codifica la primera parte del dominio NC1, un dominio funcional de la cadena de colágeno normal. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de iluminación diurna regular (12:12 luz: Oscuridad) con libre acceso a alimentos (CE-2, CLEA Japón, Tokio, Japón) y agua.

[0282]

(9-2) Evaluación de la eficacia in vivo

Todos los anticuerpos monoclonales fueron administrados por inyección subcutánea 2 veces a la semana desde la edad de 14 semanas a 20 semanas. Anticuerpo anti-KLH, IC17dk-MF18 (cadena pesada SEQ ID NO: 72, Cadena liviana SEQ ID NO: 73), fue

utilizado como control negativo en este estudio. Para analizar el progreso de la enfermedad renal en ratones Alport, se recolectó sangre a las 14, 16, 18 y 20 semanas de edad de la vena yugular, y 21 semanas de la porción abdominal de la vena cava bajo anestesia isoflurana transferida a tubos con heparina, y centrifugado (10,000g, 10 min, 4 grados C) para preparar muestras de plasma. Los parámetros bioquímicos en plasma se midieron mediante un autoanalizador TBA-120FR (Canon Medical Systems Corporation, Tochigi, Japón).

[0283]

Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 17. Se observó un aumento significativo de la creatinina plasmática en ratones control de la enfermedad y tanto hT0947AE20-MF18 como hT0947AE37-MF18 mostraron una mejora de la función renal. Los datos se presentan como media +/- error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la prueba t de Student o la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Cuando los valores de P fueron <0,05, las diferencias se consideraron significativas.

[0284]

Ejemplo 10. Viscosidad de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente dependientes del pH

Para la medición de la viscosidad, anticuerpos con regiones constantes IgG1 humanas (SG191, SEQ ID NO: 23 Y SK1, SEQ ID NO: 25) fueron preparados. Los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0497AE07-SG191, hT0497AE20-SG191, hT0497AE27-SG191, hT0497AE34-SG191 y hT0497AE37-SG191) se prepararon a 150 mg/ml en un tampón de fórmula (20 mM HIS, 150 mM Arg, 162,1 mM, ASpmet). La viscosidad de las soluciones MAB se midió a 23 grados C mediante un método de hilado electromagnético (EMS) utilizando un viscómetro EMS (Kyoto Electronics Manufacturing, Kyoto, Japón). Se colocó una bola de aluminio en un vial de vidrio que contenía las muestras y se obtuvo la viscosidad de cada solución de muestra a velocidades de rotación a 1000 rpm. La viscosidad de la muestra líquida se puede calcular a partir de la velocidad de rotación de la bola de aluminio medida mediante el uso de la lámpara de flash y la cámara de vídeo CCD.

[0285]

La viscosidad de los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente a la concentración de anticuerpos de 150 mg/ml se muestra en la Fig. 18. Los anticuerpos dependientes del pH hT0947AE20-SG191, hT0947AE27-SG191 y hT0947AE37-SG191 mostraron menor viscosidad en comparación con el anticuerpo hT0947AE07-SG191, lo que indica que esos anticuerpos dependientes del pH son preferibles para desarrollar un producto

farmacológico de anticuerpos a altas concentraciones para administración subcutánea.
[0286]

Ejemplo 11. Estudio de estabilidad acelerada por calor de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente dependientes del pH

Los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente (hT0497AE20-SG191, hT0497AE34-SG191 y hT0497AE37-SG191) se concentraron a 130 0,5 mg/ml utilizando el Amicon (marca registrada) Ultra 15 ml 30K (Millipore #UFC903024) en un tampón de fórmula (20 mM HIS, 150 mM Arg, 162 pH 6,0). Las muestras se mantuvieron a 40 grados C, los tiempos se tomaron al día 14 y 28. Las muestras se analizaron por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC; Phenomenex #00H-4788-K0) con buffer en funcionamiento que contenía 50 mm de fosfato de sodio, 300 mm de cloruro de sodio, pH 7,0.

El resultado del análisis de la SEC se muestra en la Fig. HT0497AE34-SG191 y hT0497AE37-SG191 no mostraron un aumento significativo de especies de alto peso molecular (HMW) incluso después del tratamiento a 40 grados C durante 4 semanas, mientras que hT0497AE20-SG191 mostró un aumento de HMW después del tratamiento a 40 grados C durante 2 y 4 semanas.

[0287]

Ejemplo 12. Eficacia in vivo de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente en el modelo de ratón CDAHFD

La eficacia in vivo del anticuerpo monoclonal hT0947AE37-SG191 se evaluó en el modelo de NASH/fibrosis hepática de ratón inducida por CDAHFD (dieta alta en grasas, definida por L-aminoácidos, deficiente en colina).

[0288]

(12-1) Establecimiento del modelo de NASH/fibrosis hepática de ratón inducido por CDAHFD

Ratones C57BL/6JmsSlc Se adquirieron ratones macho de 5 semanas de edad de Japan SLC (Shizuoka, Japón) y se aclimataron durante 1 semana antes del inicio de los tratamientos. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de iluminación diurno regular (12:12 luz:oscuridad) con libre acceso a alimentos y agua. La dieta de prueba, una dieta alta en grasas, definida por L-aminoácidos y deficiente en colina (CDAHFD; #A06071302, Research Diets New Brunswick, NJ, EE. UU.) se administró a ratones durante 2 semanas u 8 semanas. Durante el estudio, 3 grupos fueron alimentados con CDAHFD (n=10) y 1 grupo (n=5) fue alimentado con CRF-1 (Oriental Yeast, Tokio, Japón) como grupo de control normal.

[0289]

(12-2) Evaluación del efecto antifibrótico

Todos los anticuerpos monoclonales se administraron por inyección subcutánea 2 días antes del sacrificio. El anticuerpo anti-KLH, IC17dk, se utilizó como control negativo en este estudio. Los animales se pesaron y luego se sacrificaron por desangrado bajo anestesia con isoflurano en la semana 2 o la semana 8 después de la alimentación con CDAHFD. Se recogieron muestras de sangre de las cavidades cardíacas o de la vena postcaval, se transfirieron a tubos con EDTA-3K y se centrifugaron (10.000 g, 10 min, 4 grados C) para preparar muestras de plasma. El hígado se extirpó rápidamente y se pesó. Parte del tejido hepático se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido o en hielo seco para análisis moleculares.

[0290]

El ARN total se extrajo de tejidos hepáticos utilizando un TRIzol (marca registrada) RNA Isolation Reagents (ThermoFisher), y el ADNc se sintetizó utilizando un Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Diagnostics). La expresión génica se midió utilizando el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher). Los cebadores y las sondas Taq-Man para los genes se adquirieron de Applied Biosystems. Se utilizó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de ratón (GAPDH) como referencia endógena para cada muestra. Los valores relativos de expresión de ARNm se calcularon utilizando el análisis doble delta Ct.

[0291]

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 20. Se observó un aumento significativo en el ARNm de alfa 1 de colágeno tipo 1 en ratones de control de la enfermedad y hT0947AE37-SG191 (AE37) mostró reducción. Todos los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la prueba t de Student o la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Cuando los valores de P fueron $<0,05$, las diferencias se consideraron significativas.

[0292]

Ejemplo 13. Eficacia in vivo de anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente en el modelo de ratón BLM

La eficacia in vivo de los anticuerpos monoclonales hT0947AE37-SG191 se evaluó en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

[0293]

(13-1) Establecimiento del modelo de fibrosis pulmonar de ratón inducida por bleomicina
Ratones C57BL/6J Se adquirieron ratones macho de 8 semanas de edad DEL

LABORATORIO JACKSON JAPAN, INC (Kanagawa, Japón) y se aclimataron durante 1 semana antes del inicio de los tratamientos. Todos los ratones se mantuvieron en un ciclo de iluminación diurno regular (12:12 luz:oscuridad) con libre acceso a los alimentos CE-2 (CLEA Japón, Tokio, Japón) y agua. La bleomicina (Nihonkayaku, Tokio, Japón) se administró por vía subcutánea en un total de 10 inyecciones (5 días consecutivos de administración, 2 días de retirada y después de 5 días consecutivos de administración).

[0294]

(13-2) Evaluación de la eficacia in vivo

Todos los anticuerpos monoclonales se administraron por inyección subcutánea una vez a la semana en los días 14 y 21 después de la inducción de la enfermedad. El vehículo o anticuerpo anti-KLH, IC17dk, se utilizó como control negativo en este estudio. Los animales se pesaron y luego se sacrificaron por desangrado bajo anestesia con isoflurano el día 28 después de la inducción de la enfermedad. Se recogieron muestras de sangre de las cavidades cardíacas o de la vena postcaval, se transfirieron a tubos con heparina y se centrifugaron (10.000 g, 10 min, 4 grados C) para preparar muestras de plasma. El pulmón se extirpó rápidamente y se pesó. Parte del tejido pulmonar se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido o en hielo seco para análisis moleculares.

[0295]

Se midió el contenido de hidroxiprolina en el pulmón, que es uno de los aminoácidos incluidos en el colágeno, para evaluar la deposición de la extramatriz en el tejido. Los tejidos pulmonares húmedos se secaron mediante liofilizador durante la noche y se pesaron. Luego, se añadió HCl 6N (100 microlitros/1 mg de tejido seco) al tejido seco y se hirvió a 110 grados C durante la noche. Las muestras se limpiaron con el filtro y se midieron utilizando un kit de ensayo de hidroxiprolina (QuickZyme) o análisis de espectrometría de masas.

[0296]

El ARN total se extrajo de tejidos pulmonares utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen), y el ADNc se sintetizó utilizando un Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Diagnostics). La expresión génica se midió utilizando el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher). Los cebadores y las sondas Taq-Man para los genes se adquirieron de Applied Biosystems. Se utilizó la proteína ribosómica mitocondrial de ratón L19 (MRPL19) como referencia endógena para cada muestra. Los valores relativos de expresión de ARNm se calcularon utilizando el análisis doble delta Ct.

[0297]

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 21. Se observó un aumento significativo en el contenido de ARNm de colágeno tipo 1 alfa 1, ARNm de Serpine1 e hidroxiprolina en el pulmón inducido por la enfermedad y hT0947AE37-SG191 (AE37) mostró reducción. Todos los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la prueba t de Student o la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Cuando los valores de P fueron $<0,05$, las diferencias se consideraron significativas.

[0298]

La divulgación de la Publ. Intl. Nos. WO2019/163927 y WO2021/039945, se incorporan a la presente en su totalidad por referencia.

La descripción de la solicitud de patente japonesa No. 2023-019304 se incorpora a la presente en su totalidad por referencia.

[0299]

Aunque la presente invención se describe en el presente documento con cierto nivel de detalle a título ilustrativo y de ejemplo para la claridad de la comprensión, las descripciones y los ejemplos no deben considerarse limitantes del alcance de la invención. Las divulgaciones de todas las patentes y la literatura científica citadas en el presente documento se incorporan expresamente y en su totalidad como referencia.

Aplicación industrial

[0300]

La presente divulgación da a conocer anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente entre especies que inhiben una activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente sin inhibir la activación mediada por integrina de TGF-beta 1 latente o con la activación parcialmente mediada por integrina de TGF-beta 1 latente, o que inhiben una activación mediada por peptidasa de TGF-beta 1 latente pero tienen menos impacto en la inhibición de la activación mediada por integrina de la activación de TGF-beta 1 latente. Además, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-TGF-beta 1 que tienen afinidad de unión dependiente del pH hacia TGF-beta 1 latente. Se espera que los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente sean útiles para tratar enfermedades relacionadas con TGF-beta 1 como la fibrosis y el cáncer. Por ejemplo, la fibrosis renal, la fibrosis hepática y la fibrosis pulmonar pueden tratarse utilizando los anticuerpos anti-TGF-beta 1 latente.