

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 768**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2016 PCT/US2016/025802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16161410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2016 E 16763992 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3277716**

54 Título: **Tratamiento del cáncer usando inhibidores de TGF-beta y PD-1**

30 Prioridad:

03.04.2015 US 201562143016 P

13.07.2015 US 201562191797 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2021

73 Titular/es:

XOMA TECHNOLOGY LTD. (50.0%)

2910 Seventh Street

Berkeley, CA 94710, US y

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

MIRZA, AMER, M.;

AKHURST, ROSEMARY, J. y

LI, OU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 820 768 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del cáncer usando inhibidores de TGF-beta y PD-1

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere, en general, a una terapia de combinación para tratar el cáncer o prevención de la reincidencia del cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y un inhibidor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1).

Antecedentes

La inmunoterapia contra el cáncer se refiere a métodos para activar el sistema inmunitario para inducir la regresión tumoral y la estabilización de la enfermedad (Mellman I et al., *Nature*. 480, 7378: 480-9 (2011)). La terapia con anticuerpos dirigida contra ciertos reguladores inmunitarios negativos (puntos de control inmunitario) ha demostrado tener éxito como tratamiento antitumoral en algunos tipos de cáncer (Postow et al., *J Clin Oncol* 33: 9, (2015)).

La familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) consiste en tres isoformas diferentes que se encuentran en mamíferos (TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3). Las proteínas TGFβ activan y regulan múltiples respuestas genéticas que influyen en patologías, incluidas dolencias de células proliferativas, inflamatorias y cardiovasculares. La TGFβ es una citocina multifuncional originariamente nombrada por su capacidad de transformar los fibroblastos normales en células capaces de crecer independientemente de su anclaje. Las moléculas TGFβ se producen principalmente mediante células hematopoyéticas y tumorales y pueden regular, es decir, estimular o inhibir, el crecimiento y la diferenciación de las células procedentes de varios tejidos de origen normal y neoplásico (Sporn et al., *Science*, 233: 532 (1986)), y estimulan la formación y expansión de diversas células estromales.

Se sabe que las TGFβ participan en muchos procesos celulares proliferativos y no proliferativos tales como la proliferación y diferenciación celular, desarrollo embrionario, formación de la matriz extracelular, desarrollo óseo, cicatrización de heridas, hematopoyesis, y respuestas inmunitarias e inflamatorias. Véanse, por ejemplo, Pircher et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136: 30-37 (1986); Wakefield et al., *Growth Factors*, 1: 203-218 (1989); Roberts y Sporn, pp 419-472 en *Handbook of Experimental Pharmacology* eds M. B. Sporn & A. B. Roberts (Springer, Heidelberg, 1990); Massague et al., *Annual Rev. Cell Biol.*, 6: 597-646 (1990); Singer y Clark, *New Eng. J. Med.*, 341: 738-745 (1999). También, la TGFβ se utiliza en el tratamiento y prevención de enfermedades de la mucosa intestinal (documento WO 2001/24813). También se sabe que la TGFβ tiene efectos inmunosupresores intensos sobre varios tipos de células inmunitarias, incluida la inhibición de linfocitos T citotóxicos (CTL) (Ranges et al., *J. Exp. Med.*, 166: 991, 1987), Espevik et al., *J. Immunol.*, 140: 2312, 1988), disminuye la linfopoyesis de linfocitos B y la expresión de la cadena ligera kappa (Lee et al., *J. Exp. Med.*, 166: 1290, 1987), regulación negativa de la hematopoyesis (Sing et al., *Blood*, 72: 1504, 1988), regulación defectiva de la expresión de HLA-DR en células tumorales (Czarnecki et al., *J. Immunol.*, 140: 4217, 1988) e inhibición de la proliferación de linfocitos B activados por antígeno en respuesta al factor de crecimiento de linfocitos B (Petit-Koskas et al., *Eur. J. Immunol.*, 18: 111, 1988). Véase también la patente de Estados Unidos 7.527.791.

La expresión de las isoformas de la TGFβ en el cáncer es compleja y variable, donde diferentes combinaciones de isoformas de TGFβ tienen diferentes papeles en cánceres concretos. Las moléculas de TGFβ pueden actuar como supresores tumorales y como promotores tumorales. Por ejemplo, la delección o regulación defectiva de la señalización de TGFβ en animales puede dar como resultado un aumento en cáncer de mama, cáncer de intestino, cáncer de páncreas, cáncer de colon y carcinoma escamocelular, lo que indica que la presencia de TGFβ es importante para prevenir o ralentizar la progresión tumoral (Yang et al., *Trends Immunol* 31:220-27, 2010). Sin embargo, se sabe que la expresión en exceso de TGFβ es prooncogénica, y se detecta un aumento de la expresión en muchos tipos de tumores (Yang et al., más arriba).

Los anticuerpos dirigidos contra TGFβ se han descrito en las patentes de Estados Unidos números 7.527.791; 7.927.593; 7.494.651; 7.369.111; 7.151.169; 6.492.497; 6.419.928; 6.090.383; 5.783.185; 5.772.998; 5.571.714; y 7.723.486 y 8.569.462.

La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), también conocida como grupo de diferenciación 279 (CD279), es una célula de la superficie celular que coinhíbe el receptor expresado en linfocitos T activados, linfocitos B y macrófagos, y es un componente del bloqueo del punto de control inmunitario (Shinohara et al., *Genomics*, 23(3):704, (1994); Francisco et al., *Immunol Rev.*, 236: 219, (2010)). PD-1 limita la actividad de los linfocitos T después de la interacción con sus dos ligandos PD-L1 (también conocido como B7-H1; CD274) y PD-L2 (B7-DC; CD273) (Postow et al., *J Clin Oncol.*, 33: 9, (2015)). La interacción de PD-1 con PD-L1 y PD-L2, reduce la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas y la actividad citotóxica (Freeman GJ et al., *J Exp Med.*, 192:1027-34, (2000); Brown JA et al., *J Immunol.*, 170:1257-66, (2003)).

Recientemente, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) estadounidense ha autorizado dos anticuerpos

monoclonales para la inhibición de PD-1 mediante inmunoterapia. Pembrolizumab (KEYTRUDA®, Merck Sharp & Dohme Corp.) está autorizado para usar en melanoma metastásico, y el nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb) está autorizado para usar en el melanoma metastásico y en el cáncer escamocelular de pulmón no microcítico (NSCLC) metastásico. Estos dos anticuerpos se unen al receptor de PD-1 y bloquean la interacción con sus ligandos, PD-L1 y PD-L2.

También se ha comprobado que los inhibidores de PD-L1 son eficaces para inhibir los tumores sólidos en cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello y cánceres gastrointestinales (Herbst RS et al., J Clin Oncol., 31: 3000 (2013); Heery CR et al., J Clin Oncol., 32: 5s, 3064 (2014); Powles T et al., J Clin Oncol, 32: 5s, 5011(2014); Segal NH et al., J Clin Oncol., 32: 5s, 3002 (2014)).

Los anticuerpos dirigidos contra PD-1 se han descrito en las patentes de Estados Unidos números 8.735.553; 8.617.546; 8.008.449; 8.741.295; 8.552.154; 8.354.509; 8.779.105; 7.563.869; 8.287.856; 8.927.697; 8.088.905; 7.595.048; 8.168.179; 6.808.710; 7.943.743; 8.246.955; y 8.217.149.

En el escenario del cáncer, múltiples mecanismos de inmunosupresión pueden impedir que la inmunoterapia sea eficaz. En algunos casos, los tumores son resistentes a la monoinmunoterapia y solamente una pequeña fracción de los cánceres responderán completamente. Por tanto, el uso de combinaciones de agentes inmunoterapéuticos probablemente será necesario para obtener respuestas óptimas en un paciente (Hodi FS et al., Adv Immunol., 90:341-68, 2006; Postow et al., J Clin Oncol., 33: 9, 2015).

Recientemente, la inhibición de TGFβ combinada con la inhibición de la proteína del punto de control inmunitario CTLA-4 ha demostrado ser eficaz para suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis de melanomas (Hanks et al., J Clin Oncol 32: 5s, 2014). Los enfoques de inmunoterapia combinada que utilizan inhibidores de PD-1/PD-L1 y CTLA-4 están siendo evaluados en la actualidad (Sznol M et al., J Clin Oncol., 32: 5s, 2014; Wolchok JD et al., N Engl J Med., 369: 122-133, 2013; Callahan et al., J Clin Oncol., 32:5s, 2014 y revisado en Postow et al., J Clin Oncol., 33: 9, (2015)). Los estudios han descrito la regulación por aumento sinérgica de IFNγ en linfocitos T efectores procedentes de ganglios linfáticos drenantes del tumor después del bloqueo simultáneo de PD-L1 y TGFβ usando una combinación de anticuerpos monoclonales, lo que involucra a PD-L1 y TGFβ en la supresión de las respuestas celulares a la inmunización activa en el hospedador con tumor (Wei et al., Cancer Res, 68: 13, 2008). Wong et al., (2013) The Journal of Immunology, 190, 11: 5402-5410, describe el cultivo *in vitro* de linfocitos T reguladores procedentes de un modelo de lupus en ratón (BFW₁) con tratamiento anti-PD-1 con un anticuerpo dirigido contra TGFβ, y mostraron que las células tratadas con el anticuerpo dirigido contra TGFβ presentaba un aumento de la expresión de PD-1 en cultivo.

Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere, en general, a materiales y métodos para tratar el cáncer o prevenir la recurrencia del cáncer usando inhibidores de TGFβ y PD-1 en terapia de combinación. Se ha demostrado que la inhibición de TGFβ estimula la secreción de quimiocinas y la inflamación, mientras que se ha demostrado que el bloqueo de PD-1 suprime los mecanismos de inhibición inmunitaria. Los datos presentados en el presente documento demuestran que los inhibidores de TGFβ, en particular cuando se administran con inhibidores de PD-1, suscitan la regresión tumoral en modelos de cáncer en ratón. La invención se define mediante las reivindicaciones.

En diversos enfoques, la invención contempla el uso de un anticuerpo que se une al factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)₁, TGFβ₂ y TGFβ₃. En algunas realizaciones, el anticuerpo neutraliza la actividad de TGFβ₁ y TGFβ₂ en mayor medida que TGFβ₃. En algunas realizaciones, la neutralización de TGFβ₁ y TGFβ₂ mediante el anticuerpo es al menos 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más potente que la neutralización de TGFβ₃. Los ensayos de neutralización ilustrativos contemplados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, un ensayo de liberación de interleucina-11 y un ensayo de proliferación de células HT-2. Además, se puede llevar a cabo un ensayo de actividad de TGFβ para determinar si un anticuerpo divulgado en el presente documento inhibe preferentemente una isoforma de TGFβ, incluyendo un ensayo de fosforilación de pSMAD o un ensayo de unión a rhLAP. En una realización adicional, el anticuerpo tiene un valor de CI50 menor (es decir, mejor unión, mayor potencia) para TGFβ₁ y TGFβ₂ en comparación con TGFβ.

En diversas realizaciones, la invención contempla el uso de un anticuerpo que se une a TGFβ, TGFβ₂ y TGFβ₃ que comprende: una repetición determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR), secuencia de aminoácidos de la CDR1 definida en los SEQ ID NO: 13, 19 y 25, o una variante de la misma que tenga al menos un 85 % de identidad con la misma; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 14, 20 y 26, o una variante de la misma que tenga al menos un 85 % de identidad con la misma; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 15, 21 y 27, o una variante de la misma que tenga al menos un 85 % de identidad con la misma; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 16, 22 y 28, o una variante de la misma que tenga al menos un 85 % de identidad con la misma; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 17, 23 y 29, o una variante de la misma que tenga al menos un 85 % de identidad con la misma; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 18, 24 y 30, o una variante de la misma que tenga al menos un

85 % de identidad con la misma. En algunas realizaciones, se contempla que un anticuerpo útil en la invención comprenda una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 85 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada definida en los SEQ ID NO: 2, 6 y 10. En una realización relacionada, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada definida en los SEQ ID NO: 2, 6 y 10.

En una realización relacionada, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 85 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera definida en los SEQ ID NO: 4, 8 y 12. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera definida en los SEQ ID NO: 4, 8 y 12. En otra realización adicional, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 4, 8 y 12.

En diversas realizaciones, la invención contempla el uso de un anticuerpo que se une a TGFβ1 y TGFβ2 con mayor afinidad que a TGFβ3 que comprende: una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 19, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 20, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 21, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 22, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 23, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 24, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.

En diversas realizaciones, la invención contempla el uso de un anticuerpo que neutraliza la actividad de TGFβ1 y TGFβ2 en mayor medida de lo que neutraliza la actividad de TGFβ3 que comprende: una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 19, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 20, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 21, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 22, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 23, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 24, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.

En una realización, la invención contempla el uso de un anticuerpo que se une a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 que comprende: (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 25, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 26, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 27, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 28, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 29, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 30, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.

En otro aspecto, un anticuerpo para el uso descrito en el presente documento comprende (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 13, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 14, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 15, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 16, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 17, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 18, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.

En diversas realizaciones, un inhibidor de TGFβ útil en la invención es un anticuerpo que comprende: una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 19, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 20, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 21, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el

SEQ ID NO: 22, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 23, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 24, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.

5 En una realización relacionada, un anticuerpo para el uso descrito en el presente documento comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se define en el SEQ ID NO: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se define en el SEQ ID NO: 12.

10 En una realización relacionada, un anticuerpo para el uso descrito en el presente documento comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se define en el SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se define en el SEQ ID NO: 4.

15 En una realización relacionada, un anticuerpo para el uso descrito en el presente documento comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se define en el SEQ ID NO: 6 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se define en el SEQ ID NO: 8.

20 En algunas realizaciones, un anticuerpo útil en la invención además comprende una región constante de la cadena pesada, en donde la región constante de la cadena pesada es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE modificada o sin modificar, un fragmento de la misma o combinaciones de las mismas.

25 En una realización, un anticuerpo usado en el presente documento comprende una región constante de la cadena ligera unida a dicha región variable de la cadena ligera. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena ligera es una región constante de la cadena ligera lambda modificada o sin modificar, una región constante de la cadena ligera kappa, un fragmento de la misma o combinaciones de las mismas.

30 En algunas realizaciones, se contempla que el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo que se une a PD-1 tal como un anticuerpo monoclonal divulgado en la Descripción detallada. En diversas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra PD-1 inhibe o bloquea la unión del receptor de PD-1 a uno o ambos de sus ligandos, PD-L1 y PD-L2.

35 El cáncer puede seleccionarse entre el grupo que consiste en cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas metastásico, adenocarcinoma de páncreas metastásico, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma, glioma maligno, glioma pontino difuso intrínseco, neoplasia cerebral infantil recurrente, carcinoma de células renales, carcinoma de células renales metastásico de células claras, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, cáncer de próstata en estadio IV, melanoma metastásico, melanoma, melanoma maligno, melanoma cutáneo recurrente, melanoma con metástasis cerebral, melanoma cutáneo en estadio IIIA; melanoma cutáneo en estadio IIIB, melanoma cutáneo en estadio IIIC; melanoma cutáneo en estadio IV, melanoma maligno de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer escamocelular de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de mama metastásico recurrente, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular, linfoma no Hodgkin, LNH de linfocitos B avanzado, LH que incluye linfoma de linfocitos B grandes difusos (DLBCL) que incluye DLBCL después de un trasplante autólogo de citoblastos, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda del adulto en remisión; leucemia mieloide aguda del adulto con Inv(16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1; leucemia mieloide aguda del adulto con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL; leucemia promielocítica aguda del adulto con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA; leucemia mieloide aguda relacionada con agentes alquilantes, leucemia linfocítica crónica, síndrome de Richter; macroglobulinemia de Waldenström, glioblastoma del adulto; gliosarcoma del adulto, glioblastoma recurrente, rabdomiosarcoma infantil recurrente, sarcoma de Ewing recurrente/tumor neuroectodérmico primitivo periférico, neuroblastoma recurrente; osteosarcoma recurrente, cáncer colorrectal, cáncer colorrectal positivo para MSI; cáncer colorrectal negativo para MSI, carcinoma nasofaríngeo no queratinizante; carcinoma nasofaríngeo no diferenciado recurrente, adenocarcinoma de cuello de útero; carcinoma adenoescamoso de cuello de útero; carcinoma escamocelular de cuello de útero; carcinoma de cuello de útero recurrente; cáncer de útero en estadio IVA; cáncer de útero en estadio IVB, carcinoma escamocelular del canal anal; carcinoma del canal anal metastásico; carcinoma del canal anal recurrente, cáncer de cabeza y cuello recurrente; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma de ovario, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer GI avanzado, adenocarcinoma gástrico; adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, neoplasias de hueso, sarcoma de tejidos blandos; sarcoma óseo, carcinoma tímico, carcinoma urotelial, carcinoma de células de Merkel recurrente; carcinoma de células de Merkel en estadio III; carcinoma de células de Merkel en estadio IV, síndrome mielodisplásico y micosis fungoides recurrente y síndrome de Sezary.

60 El cáncer puede seleccionarse entre el grupo que consiste en carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, melanoma y carcinoma escamocelular (SCC).

65 El cáncer puede tener una mutación en el homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2 (*KRAS*).

El cáncer puede tener una mutación en el homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata Harvey (*HRAS*).

El cáncer puede tener una mutación en el homólogo del oncogén vírico del neuroblastoma RAS (v-ras) (*NRAS*).

El cáncer puede tener mutaciones en el oncogén Ras.

5

El cáncer puede seleccionarse entre el grupo que consiste en adenocarcinoma de pulmón, adenoma mucinoso, carcinoma ductal del páncreas y carcinoma colorrectal, glioma cerebral de grado menor, carcinoma invasivo de mama, glioblastoma multiforme, melanoma, tiroides, adenocarcinoma de recto, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de hígado, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de esófago, carcinoma endometrioide del cuerpo uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer oral, cáncer de intestino grueso y linfoma.

10

Se contempla que el uso de la invención puede reducir el tamaño del tumor o la carga tumoral en el sujeto, y/o reducir la metástasis en el sujeto. En diversas realizaciones, el tamaño del tumor se puede reducir en un 20 %, 30 % o más. En diversas realizaciones, el tamaño del tumor se puede reducir en un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

15

Se contempla que el uso de la invención puede reducir la carga tumoral, y también reducir o prevenir la recurrencia de los tumores una vez que el cáncer ha entrado en remisión.

20

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad, dolencia o trastorno asociado con la señalización y/o la expresión mediada de TGFβ y PD-1 que comprende la etapa de administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica contemplada en el presente documento. En ciertas estrategias, la enfermedad, dolencia o trastorno se selecciona entre un grupo de cánceres.

25

La divulgación contempla además una composición farmacéutica estéril que comprende un inhibidor de TGFβ, un inhibidor de PD-1 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

30

La divulgación contempla además una composición farmacéutica estéril que comprende un inhibidor de TGFβ independiente y un transportador farmacéuticamente aceptable.

La divulgación contempla además una composición farmacéutica estéril que comprende un inhibidor de PD-1 independiente y un transportador farmacéuticamente aceptable.

35

Se contempla que los inhibidores, tales como anticuerpos, de la presente divulgación se puedan administrar simultáneamente, en la misma formulación. Se contempla además que los inhibidores se administren en una formulación independiente y se administren concurrentemente, donde concurrentemente se refiere a agentes administrados con una diferencia de menos de 30 minutos entre sí. Se contempla además que se pueda administrar simultáneamente un tercer agente con los inhibidores.

40

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la recurrencia de una enfermedad, dolencia o trastorno asociado con la señalización y/o la expresión mediada de TGFβ y PD-1 que comprende la etapa de administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica contemplada en el presente documento, en donde la administración previene la recurrencia de cáncer en un sujeto que ha recibido la terapia con inhibidores.

45

En algunas realizaciones, la combinación del anticuerpo de TGFβ y el anticuerpo de PD-1 descrita en el presente documento aumenta el número de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un tumor, y/o aumenta la actividad citolítica de los linfocitos NK. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el uso descrito en el presente documento aumenta la producción de perforina y granzima por los linfocitos NK.

50

En diversas realizaciones, la combinación del anticuerpo de TGFβ y el anticuerpo de PD-1 descrita en el presente documento disminuye el número de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhibe la función de los linfocitos T reguladores, por ejemplo, en diversas realizaciones, la inhibición de la capacidad de los Tregs regula defectivamente una respuesta inmunitaria o migra hacia un sitio de una respuesta inmunitaria.

55

En diversas realizaciones, la combinación del anticuerpo de TGFβ y el anticuerpo de PD-1 descrita en el presente documento aumenta el número de linfocitos T citotóxicos en un tumor y/o potencia la actividad de CTL, por ejemplo, refuerza, aumenta o fomenta la actividad de los CTL, por ejemplo, en diversas realizaciones, el aumento en la producción de perforina y granzima por los CTL y el aumento de la actividad citolítica de los CTL.

60

En diversas realizaciones, la combinación del anticuerpo de TGFβ y el anticuerpo de PD-1 descrita en el presente documento aumenta el número de células dendríticas (DC) en un tumor y/o inhibe la función tolerogénica (por ejemplo, efecto tolerogénico) de las células dendríticas, por ejemplo, en diversas realizaciones, disminuyendo el efecto tolerogénico de las células dendríticas CD8+.

65

En diversas realizaciones, la administración de la combinación del anticuerpo de TGF β y el anticuerpo de PD-1 descrita en el presente documento aumenta la proporción entre linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores en un tumor.

En diversas realizaciones, la divulgación proporciona un método para aumentar la proporción entre linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores en un tumor que comprende administrar a un sujeto que lo necesita cantidades terapéuticamente eficaces de un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y un inhibidor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1).

En diversas realizaciones, la terapia se va a administrar periódicamente, por ejemplo, cada hora, diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, una vez cada dos meses o en un intervalo más prolongado. En una realización relacionada, en tratamientos ilustrativos, un inhibidor de TGF β se va a administrar en un intervalo de dosis de 0,1 a 15 mg/kg y un inhibidor de PD-1 se va a administrar en un intervalo de dosis de 0,1 a 15 mg/kg. Estas concentraciones se pueden administrar en una sola forma farmacéutica o como múltiples dosis.

En diversas realizaciones, los inhibidores se van a administrar con un tercer agente. En una realización, el tercer agente se selecciona del grupo que consiste en una proteína degradadora de la matriz extracelular, un agente antifibrótico, terapia quirúrgica, quimioterapia (por ejemplo, cisplatino más pemetrexed, carboplatino más paclitaxel), un agente citotóxico (por ejemplo, lenalidomida, dexametasona) o radioterapia (Philips y Atkins, Int Immunol., 27(1):39-46 (2015)). Los terceros agentes ilustrativos se describen con más detalle en la Descripción detallada.

También se contempla una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos o composiciones anteriores de la divulgación que se unen a TGF β o PD-1, o uso de las mismas en la preparación de un medicamento, para el tratamiento de cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento asociados con la señalización y/o la expresión de TGF β y PD-1. También se contemplan jeringas, por ejemplo, jeringas de un solo uso o precargadas, envases precintados estériles, por ejemplo, viales, frascos, recipientes y/o kits o envases que comprenden cualquiera de los anticuerpos o composiciones anteriores, opcionalmente con instrucciones adecuadas para su uso.

Se entiende que cada rasgo o realización, o combinación, descrito en el presente documento es un ejemplo ilustrativo no limitativo de cualquiera de los aspectos de la invención y, como tal, se entiende que se puede combinar con cualquier otro rasgo o realización, o combinación, descrito en el presente documento. Por ejemplo, cuando se describen rasgos con una redacción tal como "una realización", "algunas realizaciones", "ciertas realizaciones", "realización adicional", "respecto a realizaciones específicas ilustrativas", y/u "otra realización", cada uno de estos tipos de realizaciones es un ejemplo no limitativo de un rasgo que se pretende combinar con cualquier otro rasgo, o combinación de rasgos, descritos en el presente documento sin tener que relacionar todas las combinaciones posibles. Dichos rasgos o combinación de rasgos se aplican a cualesquiera de los aspectos de la invención. Cuando se divulguen ejemplos de valores comprendidos en un intervalo, cualesquiera de estos ejemplos se contempla como posible límite de un intervalo, todos y cada uno de los valores numéricos comprendidos entre dichos límites están contemplados, y todas y cada una de las combinaciones de límites superior e inferior están contemplados. La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

El anticuerpo de TGF β útil en la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en XPA.42.089, XPA.42.068 y XPA.42.681. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.089 se definen en los SEQ ID NOS: 6 y 8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.068 se definen en los SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.681 se definen en los SEQ ID NOS: 10 y 12, respectivamente.

Otro anticuerpo de TGF β útil es Fresolimumab (GC1008, Cambridge Antibody Technology, Genzyme y Sanofi), actualmente en ensayos clínicos de Fase I (Morris JC et al., PLoS One. 2014 Mar 11;9(3):e90353, 2014; Akhurst y Hata, Nat Rev Drug Discov., 11: 790-811, 2012) véase la patente de Estados Unidos 7.723.486.

El anticuerpo de PD-1 se puede seleccionar del grupo que consiste en pembrolizumab, nivolumab y pidilizumab.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la inhibición del tumor en un modelo de aloinjerto en ratón con monoterapia y terapia de combinación de inhibidores de TGF β y PD-1. La Figura 1A muestra el crecimiento de tumores en ratones con implante de células cSCC. También se muestra la cantidad de CD45+, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores (Treg), células T CD4+ y CD8+ representados como porcentaje de células viables (Figura 1B) y como porcentaje de células CD45+ (Figura 1C).

La Figura 2 muestra las respuestas diferenciales de los tumores individuales a la inmunoterapia. Los datos de la Figura 1 se segregaron entre "respondedores y "progresores" para demostrar la gama de respuestas a α -PD-1 (Figura 2A), α -TGF β (Figura 2B), y la terapia de combinación (Figura 2C).

La Figura 3 muestra las respuestas diferenciales de los tumores individuales a la inmunoterapia. Los datos de la

Figura 1 se representaron gráficamente como mediciones del tumor independientes con el tiempo para el control (ctrl) (Figura 3A), monoterapia con α -PD-1 (Figura 3B), monoterapia con α -TGF β (Figura 3C), y α -PD-1 y α -TGF β en combinación (Figura 3D).

La Figura 4 muestra mediciones de inmunotipado del tumor de CD45+, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores (Treg), células T CD4+ y CD8+ tumorales de ratones con carcinoma escamocelular cutáneo (cSCC) químicamente inducido (DMBA-TPA), representados como porcentaje de células viables y como porcentaje de células CD45+.

La Figura 5 muestra el número de mutaciones por megabase (MB) y la sensibilidad a la monoterapia con inhibidores y la terapia de combinación de TGF β y PD-1 para líneas de células cSCC (FVB-1425, FVB-1428) estimuladas con Kras químicamente inducidas (DMBA/TPA) estimuladas con Kras y Hras (FVB-62, FVB-85, FVB-166, FVB-168, FVB-169) e iniciadas genéticamente (GEMM) en mores estimulados con Kras en ratones FVB/N singénicos.

La Figura 6 muestra la respuesta de la línea tumoral SCC químicamente inducida, FVB-168, a una monoterapia pan-específica con α -TGF β 1, 2,3 y α -PD1 y terapia de combinación. La Figura 6A muestra el porcentaje de carcinomas que muestran la progresión de la enfermedad (crecimiento tumoral continuado), respuesta completa (es decir, inhibición/regresión del crecimiento del carcinoma) o respuesta parcial a las terapias indicadas. La Figura 6B muestra el porcentaje de supervivencia de ratones en respuesta a la monoterapia pan-específica con α -TGF β 1, 2,3 y α -PD1 y terapia de combinación en este modelo. La Figura 6C muestra los niveles de los marcadores de células inmunitarias, linfocitos T CD8+ efectores (Teff), linfocitos T CD4+ efectores (Teff), CD4+ reguladores (Treg) como porcentaje de CD45+ y la proporción Teff/Treg para los tumores que responden y no responden (es decir, crecimiento del tumor progresivo) al tratamiento con una monoterapia pan-específica de inhibidores α -TGF β 1,2,3 y PD-1 y terapia de combinación.

La Figura 7 muestra la inhibición del tumor en un modelo de aloinjerto en ratón con una monoterapia pan-específica de inhibidores de TGF β 1,2 específicos, α -TGF β 1,2,3 pan-específicos e inhibidor de PD-1 y terapia de combinación. Representado como el volumen tumoral (mm³) durante 0-25 días después de los tratamientos indicados.

Descripción detallada

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento "TGF β " se refiere a una o más isoformas de TGF β , que incluyen TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 o variantes de la misma. Igualmente, la expresión "receptor de TGF β ", salvo que se indique otra cosa, se refiere a cualquier receptor que se une al menos a una isoforma de TGF β .

Como se utiliza en el presente documento "Proteína de muerte celular programada 1" o "PD-1" se refiere a un receptor de la superficie celular involucradas en el bloqueo del punto de control inmunitario mediado por la unión a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. Se ha comprobado que la unión de PD-1 a sus ligando reduce la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas y la actividad citotóxica.

Como se usa en el presente documento, la "actividad biológica deseada" de un anticuerpo anti-diana es la capacidad de unirse a TGF β o PD-1 e inhibir uno o más de sus efectos funcionales.

Como se usa en el presente documento, una "dolencia" o "trastorno" asociado con una "diana" en la que la modificación de una actividad diana mediante un inhibidor de la diana descrito en el presente documento es beneficioso y también incluye otros trastornos en los cuales se ha comprobado que altos niveles de la diana son, o se sospecha que son, bien responsables de la patofisiología del trastorno o bien un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno, así como enfermedades y otros trastornos en los que la modulación de la diana está asociado con cambios en los signos o síntomas clínicos. Dichos trastornos se pueden poner de manifiesto, por ejemplo, por un aumento en los niveles de la diana secretada y/o en la superficie de las células y en la modificación de la señalización en las células o tejidos afectados de un sujeto que padece el trastorno.

Los ejemplos de enfermedades, dolencias o trastornos que se pueden tratar con un inhibidor que inhibe TGF β y un inhibidor que inhibe PD-1 o un inhibidor de ambos TGF β y PD-1 (por ejemplo, anticuerpos descritos en el presente documento) incluyen cánceres, tales como cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas metastásico, adenocarcinoma de páncreas metastásico, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma, glioma maligno, glioma pontino difuso intrínseco, neoplasia cerebral infantil recurrente, carcinoma de células renales, carcinoma de células renales metastásico de células claras, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, cáncer de próstata en estadio IV, melanoma metastásico, melanoma, melanoma maligno, melanoma cutáneo recurrente, melanoma con metástasis cerebral, melanoma cutáneo en estadio IIIA; melanoma cutáneo en estadio IIIB, melanoma cutáneo en estadio IIIC; melanoma cutáneo en estadio IV, melanoma maligno de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer escamocelular de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de mama metastásico recurrente, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular, linfoma no Hodgkin, LNH de linfocitos B avanzado, LH incluyendo linfoma difuso de

linfocitos B grandes (DLBCL), mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda del adulto en remisión; leucemia mieloide aguda del adulto con Inv(16)(p13.1q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1; leucemia mieloide aguda del adulto con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL; leucemia promielocítica aguda del adulto con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA; leucemia mieloide aguda relacionada con agentes alquilantes, leucemia linfocítica crónica, síndrome de Richter; macroglobulinemia de Waldenström, glioblastoma del adulto; gliosarcoma del adulto, glioblastoma recurrente, rabdomiosarcoma infantil recurrente, sarcoma de Ewing recurrente/tumor neuroectodérmico primitivo periférico, neuroblastoma recurrente; osteosarcoma recurrente, cáncer colorrectal, cáncer colorrectal positivo para MSI; cáncer colorrectal negativo para MSI, carcinoma nasofaríngeo no queratinizante; carcinoma nasofaríngeo no diferenciado recurrente, adenocarcinoma de cuello de útero; carcinoma adenoescamoso de cuello de útero; carcinoma escamocelular de cuello de útero; carcinoma de cuello de útero recurrente; cáncer de útero en estadio IVA; cáncer de útero en estadio IVB, carcinoma escamocelular del canal anal; carcinoma del canal anal metastásico; carcinoma del canal anal recurrente, cáncer de cabeza y cuello recurrente; carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma de ovario, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer GI avanzado, adenocarcinoma gástrico; adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, neoplasias de hueso, sarcoma de tejidos blandos; sarcoma óseo, carcinoma tímico, carcinoma urotelial, carcinoma de células de Merkel recurrente; carcinoma de células de Merkel en estadio III; carcinoma de células de Merkel en estadio IV, síndrome mielodisplásico y micosis fungoides recurrente y síndrome de Sezary.

Una "inmunoglobulina" o "anticuerpo natural" es una glicoproteína tetramérica. En una inmunoglobulina de origen natural, cada tetrámero se compone de dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte con el extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. La parte con el extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (Δ), gamma (γ), alfa (α) y épsilon (ϵ), y definen el isotipo de anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, en general, *Fundamental Immunology*, cap. 7 (Paul, W., ed., 2.^a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo de modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión.

Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada (Clothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987).

Los dominios variables de la inmunoglobulina presentan la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables o CDR. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de conformidad con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o Chothia y Lesk, (*J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987); Chothia et al., (*Nature* 342:878-883, 1989).

La región hipervariable de un anticuerpo se refiere a los restos de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una CDR [por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe en [Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)]]. Las CDR también se han identificado y numerado según la numeración de ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003), que describe las ubicaciones de las CDR en los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de la siguiente forma: CDR1, aproximadamente los restos de 27 a 38; CDR2, aproximadamente los restos de 56 a 65; y, CDR3, aproximadamente los restos 105 a 116 (línea germinal) o los restos de 105 a 117 (reordenados). En una realización, se contempla que las CDR se ubican aproximadamente los restos 26-31 (L1), 49-51 (L2) y 88-98 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y, aproximadamente, los restos 26-33 (H1), 50-58 (H2) y 97-111 (H3) del dominio variable de la cadena pesada de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de longitud aproximadamente similar a la divulgada en el presente documento. Sin embargo, un experto en la materia entiende que la ubicación real de los restos de la CDR puede variar respecto de las proyecciones de restos anteriormente descritas cuando se ha identificado la secuencia del anticuerpo en particular.

Los restos marco o FR son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable.

"Región variable de la cadena pesada" como se utiliza en el presente documento se refiere a la región de la molécula de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) del dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo. La región variable de la cadena pesada puede contener una, dos o tres CDR de la cadena pesada de dicho anticuerpo.

"Región variable de la cadena ligera" como se utiliza en el presente documento se refiere a la región de una molécula de anticuerpo, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) del dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo. La región variable de la cadena ligera puede contener una, dos o tres CDR de la cadena ligera de dicho anticuerpo, que puede ser una cadena ligera kappa o lambda dependiendo del anticuerpo.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos tetraméricos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab)2, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos) y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada. Una "inmunoglobulina" o "anticuerpo tetramérico" es una glicoproteína tetramérica que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, comprendiendo cada una de ellas una región variable y una región constante. Las porciones de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de anticuerpo, o porciones de unión a antígeno, incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, anticuerpos de dominio (dAb), fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos injertados a CDR, anticuerpos monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpo lineal; anticuerpo recombinante quelante, un tricuerpo o bicuerpo, un intracuerpo, un nanocuerpo, una sustancia inmunofarmacéutica modular pequeña (SMIP), una proteína de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión al antígeno, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VHH, o una variante o un derivado del mismo, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para transmitir unión específica de antígeno al polipéptido, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de CDR, siempre que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada.

"Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

"Variante de anticuerpos" como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia polipeptídica de un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos en los dominios de la región variable del anticuerpo de referencia. Las variantes pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas al anticuerpo no modificado.

Un "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene una secuencia derivada de dos anticuerpos diferentes (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) que normalmente proceden de diferentes especies diferentes. De forma más típica, los anticuerpos quiméricos comprenden fragmentos de anticuerpos humanos y de roedor, generalmente, regiones constantes humanas y variables de ratón.

Un "anticuerpo neutralizante" es una molécula de anticuerpo que es capaz de eliminar o reducir significativamente una función biológica de un antígeno diana con el que se une. En consecuencia, un anticuerpo "neutralizante" anti-diana puede eliminar o reducir significativamente una función biológica, tal como la actividad enzimática, unión del ligando o señalización intracelular.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo determinado por el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N secuencia interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante una SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en células recombinantes debido al menos a que un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" es "específico de diana", es "específico para" la diana o es "inmunoactivo" cuando el antígeno diana se refiere a un anticuerpo o sustancia de anticuerpo que se une al antígeno diana con mayor afinidad que con antígenos similares. En un aspecto de la divulgación, los polipéptidos de unión a la diana, o los fragmentos, variantes o derivados del mismo, se unirán con

mayor afinidad a una diana humana en comparación con su afinidad de unión a la diana de otra especie, es decir, no humano, pero los polipéptidos de unión que se reconocen y se unen a ortólogos de la diana están comprendidos en el alcance proporcionado.

- 5 Por ejemplo, un polipéptido que es un anticuerpo o fragmento del mismo "específico para" su antígeno afín indica que las regiones variables de los anticuerpos reconocen y se unen al polipéptido de interés con una preferencia detectable (es decir, es capaz de distinguir el polipéptido de interés de otros polipéptidos conocidos de la misma familia, por medidas mensurables en la afinidad de unión, a pesar de la posible existencia de identidad de secuencia localizada, homología o similitud entre miembros de la familia). Se entenderá que los anticuerpos específicos también pueden interactuar con otras proteínas (por ejemplo, la proteína A de *S. aureus* o de otros anticuerpos en técnicas ELISA) mediante interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos y, en particular, en la región constante de la molécula. Los ensayos de cribado para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para usar en los métodos de la presente divulgación son bien conocidos y se realizan rutinariamente en la técnica. Para una discusión completa de dichos ensayos, véanse Harlow et al. (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Los anticuerpos para su uso en los métodos se pueden producir usando cualquier método conocido en la materia.

- 20 El término "epítipo" se refiere a dicha porción de cualquier molécula que puede reconocer y unirse mediante un agente de unión selectivo a una o más de las regiones de unión a antígeno. Los epítipos habitualmente consisten en agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activa, tales como, cadenas laterales de aminoácidos o carbohidratos, y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítipos que se utilizan en el presente documento pueden ser contiguos o no contiguos. Además, los epítipos pueden ser miméticos (mimotopos) en que comprenden una estructura tridimensional que es idéntica al epítipo utilizado para generar el anticuerpo, pero comprende nada o solo parte de los restos de aminoácidos que aparecen en la diana que se usaron para estimular la respuesta inmunitaria de anticuerpos. Como se usa en el presente documento, un mimotopo no se considera un antígeno diferente del epítipo al que se une el agente de unión selectivo; el agente de unión selectivo reconoce la misma estructura tridimensional del epítipo y mimotopo.

- 30 El término "derivado", cuando se utiliza respecto a las sustancias y polipéptidos de anticuerpos de la presente divulgación se refiere a polipéptidos químicamente modificados mediante técnicas tales como ubiquitinación, conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, etiquetado (por ejemplo, con radionucleidos o varias enzimas), unión covalente de polímero tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) y la inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos como ornitina, que normalmente no se encuentran en las proteínas humanas. Los derivados retienen las propiedades de unión de las moléculas no derivatizadas de la divulgación.

- 35 "Resto detectable" o una "etiqueta" se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, immunoquímicos o químicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se usa comúnmente en un ELISA), biotina, estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para los que estén disponibles antiseros o anticuerpos monoclonales con una secuencia complementaria de una diana. El resto detectable frecuentemente genera una señal mensurable, tal como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de resto detectable unido en una muestra.

- 45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza en el presente documento para indicar la cantidad de composición específica de diana de la divulgación que es eficaz para aliviar o reducir los síntomas de la enfermedad que se vaya a tratar.

- 50 Los términos "tratar", "tratado", "que trata" y "tratamiento", tal como se usan respecto de los métodos del presente documento se refieren a eliminar, reducir, suprimir o mejorar, ya sea de manera temporal o permanente, bien parcial o completamente, un síntoma clínico, manifestación o progresión de un evento, enfermedad o dolencia. Dicho tratamiento no tiene que ser absoluto para ser útil.

- La presente divulgación proporciona el uso de anticuerpos específicos de diana, que pueden comprender aquellas secuencias ilustrativas definidas en el presente documento, fragmentos, variantes y derivados de los mismos, formulaciones farmacéuticas que incluyen los anticuerpos específicos de diana enumerados en el presente documento. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que se pueden subdividir en subclases o isotipos, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad ADCC. Un anticuerpo divulgado en el presente documento, si comprende un dominio constante, puede ser de cualquiera de estas subclases o isotipos.

- 65 Los anticuerpos usados en la presente divulgación pueden presentar afinidad de unión por uno o más antígenos de TGF β y/o de PD-1 con una Kd menor o igual de aproximadamente 10^{-5} M, menor o igual de aproximadamente 10^{-6} M, o menor o igual de aproximadamente 10^{-7} M, o menor o igual de aproximadamente 10^{-8} M, o menor o igual de

aproximadamente 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M o menos. Dichas afinidades se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales, tales como diálisis en equilibrio; mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, el instrumento BIAcore 2000, usando los procedimientos generales detallados por el fabricante); mediante radioinmunoensayo usando un antígeno diana marcado con ¹²⁵I; o por otro método definido en los ejemplos siguientes o conocidos por el experto en la materia. Los datos de afinidad se pueden analizar, por ejemplo, por el método de Scatchard et al., (Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660, 1949).

Un ensayo cinético de exclusión KinExA es también útil para medir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. La tecnología KinExA mide eventos de unión en fase de solución, en lugar de eventos de unión entre una fase en solución y una fase sólida. Además, mientras que muchos métodos para medir eventos de unión requieren modificar al menos un reactivo mediante inmovilización o marcado, el método KinExA no requiere la modificación de las moléculas en estudio. Se cree que el método KinExA permite una gama más amplia de constantes de unión a medir que otros métodos actualmente disponibles. Se puede solicitar una descripción adicional de los dispositivos KinExA y su funcionamiento para la caracterización de anticuerpos al fabricante (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID) y se puede encontrar en la bibliografía publicada, por ejemplo, en la patente de EE.UU, n.º 6.664.114 y en Darling et al., "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions." Assay and Drug Development Technologies, 2004, 2:647-657.

Factor de crecimiento transformante β

El TGF β es un dímero unido por un enlace disulfuro que se sintetiza como una preproteína de aproximadamente 400 aminoácidos (aa) que se escinde antes de su secreción para producir el TGF β maduro. La escisión del fragmento del extremo N, conocido como el "péptido asociado a la latencia" (LAP), puede permanecer unido al dímero de forma no covalente, inactivando así el TGF β . El TGF β aislado *in vivo*, se encuentra predominantemente en la forma inactiva "latente", es decir, asociado al LAP. El complejo TGF β latente se puede activar de varias formas, por ejemplo, mediante la unión a un receptor de la superficie celular denominado el receptor del factor de crecimiento II análogo a manosa-6-fosfato/insulina independiente de cationes. La unión se produce a través de los restos de manosa-6-fosfato unidos a los sitios de glicosilación contenidos en el LAP. Tras la unión al receptor, TGF β se libera en su forma madura. A continuación, el TGF β maduro y activo queda libre para unirse a su receptor y ejercer sus funciones biológicas. El principal dominio de unión a TGF β en el receptor de TGF β de tipo II se ha cartografiado como una secuencia de 19 aminoácidos (Demetriou et al., J. Biol. Chem., 271:12755, 1996). Véanse también las patentes de Estados Unidos 7.867.496 y 8.569.462.

En la actualidad, existen cinco isoformas conocidas de TGF β (TGF β 1 a TGF β 5; TGF β 1-3 son de mamífero, TGF β 4 se encuentra en aves de corral; y TGF β 5 se encuentra en ranas), todos ellos son homólogos entre sí (60-80 % de identidad), forman homodímeros de aproximadamente 25 kDa, y actúan a través de receptores de TGF β comunes (TGF β -RI, TGF β -RII, TGF β -RIIB y TGF β -RIII). Los aspectos estructurales y funcionales del TGF β , así como de los receptores de TGF β , son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Cytokine Reference, eds. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, Calif., 2001). El TGF β está bien conservado entre especies. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de los TGF β 1 maduros de rata y ser humano son prácticamente idénticas. Véase también la patente de Estados Unidos 7.867.496.

TGF β 1 tiene un papel importante en el proceso de cicatrización de heridas en tejidos biológicos (New Engl. J. Med., Vol. 331, p. 1286, 1994 y J. Cell. Biol., Vol. 119, pág. 1017, 1992). En el sitio del tejido herido, se producen reacciones biológicas tales como la infiltración de células inflamatorias y fibroblastos, la producción de matriz extracelular (ECM) y la vascularización, y se produce el crecimiento celular para la posterior regeneración del tejido para reparar el tejido lesionado. Véase también la patente de Estados Unidos 7.579.186.

Los ratones deficientes en TGF β 2 demuestran defectos de desarrollo significativos, incluyendo defectos en corazón, pulmón, craneofacial, extremidades, columna vertebral, ojo, oído y urogenitales (Dunker et al., Eur J Biol 267:6982-8, 2001). Los ratones deficientes en TGF β 3 demuestran una letalidad de casi el 100 % 24 h después del nacimiento. Estos ratones muestran una afectación significativa del paladar y retraso en el desarrollo pulmonar (Dunker et al., más arriba). El TGF β 2 se ha implicado también en el desarrollo de glaucoma (Luthen-Driscoll, Experimental Eye Res 81:1-4, 2005), fibrosis asociada con la enfermedad de Crohn (Van Assche et al., Inflamm Bowel Dis. 10:55-60, 2004), en la cicatrización de heridas y en la nefropatía diabética (Pohlers et al., Biochim Biophys Acta 1792:746-56, 2009)

Se ha observado que muchos tumores humanos (deMartin et al., EMBO J., 6: 3673 (1987), Kuppnier et al., Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)) y muchas líneas de células tumorales (Derynck et al., Cancer Res., 47: 707 (1987), Roberts et al., Br. J. Cancer, 57: 594 (1988)) producen TGF β .

La expresión de las isoformas de la TGF β en el cáncer es compleja y variable, donde diferentes combinaciones de isoformas de TGF β tienen diferentes papeles en cánceres concretos. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 7.927.593. Por ejemplo, TGF β 1 y TGF β 3 pueden desempeñar un mayor papel en el cáncer de ovario y en su progresión que TGF β 2; mientras que la expresión de TGF β 1 y TGF β 2 es mayor en tumores de tipo condrosarcoma de grado superior que TGF β 3. En el cáncer de mama humano, TGF β 1 y TGF β 3 se expresan intensamente, donde la expresión de TGF β 3 parece estar correlacionada con la supervivencia global de las pacientes con metástasis

ganglionar y la expresión positiva para TGFβ3 tiene mal resultado pronóstico. Sin embargo, en el cáncer de colon, TGFβ1 y TGFβ2 se expresan más intensamente que TGFβ3 y están presentes en niveles en circulación más altos que en individuos sin cáncer. En gliomas, TGFβ2 es importante para la migración de las células.

5 Anticuerpos de TGFβ

La presente divulgación abarca el uso de moléculas de aminoácidos que codifican anticuerpos específicos de diana. En realizaciones ilustrativas, un anticuerpo específico de diana útil en los métodos de la divulgación puede comprender una cadena ligera kappa (κ) humana o lambda (λ) humana o una secuencia de aminoácidos derivada de las anteriores, o una cadena pesada humana o una secuencia derivada de la misma, o ambas cadenas pesada y ligera juntas en una forma monocaténaria, tetramérica u otra forma. En algunas realizaciones, una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina diana específica son moléculas de aminoácidos diferentes. En otras realizaciones, la misma molécula de aminoácidos contiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo específico de diana.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra la diana humana para TGFβ útiles en los métodos comprende una o más CDR de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) madura (es decir, que carece de la secuencia de señalización) de los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681 (SEQ ID NOS: 4, 8 y 12 respectivamente) o variantes de la misma, que incluyen anticuerpos con CDR injertada, modificados, humanizados, quiméricos o humanos genomanipulados o cualesquiera otras variantes descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la VL comprende la secuencia de aminoácidos desde el inicio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de la cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos anteriores.

En una realización, el anticuerpo específico de diana comprende una CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3), cada una de las cuales se selecciona independientemente de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la región VL definida en los SEQ ID NOS: 4, 8 y 12, un ácido nucleico que codifica la región VH definida en los SEQ ID NOS: 4, 8 y 12, o codificada por una molécula de ácido nucleico que codifica la región VL definida en los SEQ ID NOS: 3, 7 y 11. En una realización, la CDR1 de la cadena ligera corresponde aproximadamente a los restos 24-34, la CDR2 corresponde aproximadamente a los restos 50-56 y la CDR3 se extiende aproximadamente a los restos 89-97, de acuerdo con la numeración de Chothia. En una realización alternativa, se contempla que las CDR de la cadena pesada se ubiquen en aproximadamente los restos de 27 a 38 (CDR1); aproximadamente los restos de 56 a 65 (CDR2); y, aproximadamente los restos de 105 a 116 (línea germinal) o los restos de 105 a 117 (CDR3) de acuerdo con la numeración de ImMunoGenTics (IMGT). En una realización, se contempla que las CDR de la cadena ligera se ubiquen en aproximadamente los restos 26-31 (L1), 49-51 (L2) y 88-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera de una cadena ligera de un anticuerpo de longitud aproximadamente similar a la divulgada en el presente documento. Un polipéptido del anticuerpo específico de diana puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región VL seleccionado del grupo que consiste en XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681.

En algunas realizaciones, el anticuerpo específico de diana humana para el TGFβ comprende una o más CDR de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) madura (es decir, que carece de la secuencia de señalización) de los anticuerpos XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681 definidos en los SEQ ID NOS: 2, 6 y 10, respectivamente, o variantes de los mismos. En algunas realizaciones, la VH comprende la secuencia de aminoácidos desde el inicio de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de una cualquiera de la cadena pesada de los anticuerpos anteriores.

En una realización, el anticuerpo específico de diana comprende una CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3), cada una de las cuales se selecciona independientemente de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región VH definida en los SEQ ID NOS: 2, 6 y 10, un ácido nucleico que codifica la región VH definida en los SEQ ID NOS: 2, 6 y 10, o codificada por una molécula de ácido nucleico que codifica la región VH definida en los SEQ ID NOS: 1, 5 y 9. Se contempla además que un anticuerpo específico de diana comprende una CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada, cada una de las cuales se selecciona independientemente entre las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región VH definida en los SEQ ID NOS: 2, 6 y 10. En una realización, las CDR de la cadena pesada se han ubicado de acuerdo con la numeración de Chothia: la CDR1 corresponde aproximadamente a los restos 26-35, la CDR2 corresponde aproximadamente a los restos 50-58 y la CDR3 se extiende aproximadamente a los restos 95-102 (o 95-111 o 95-118). En una realización alternativa, se contempla que las CDR de la cadena pesada se ubiquen en CDR1, aproximadamente los restos de 27 a 38 (CDR1); aproximadamente los restos de 56 a 65 (CDR2); y, CDR3, aproximadamente los restos de 105 a 116 (línea germinal) o los restos de 105 a 117 (CDR3) de acuerdo con la numeración de ImMunoGenTics (IMGT). En una realización, se contempla que las CDR de la cadena pesada se ubiquen en aproximadamente los restos 26-33 (H1), 50-58 (H2) y 97-111 (H3) del dominio variable de la cadena pesada de una cadena pesada de un anticuerpo de longitud aproximadamente similar a la divulgada en el presente documento. Un polipéptido del anticuerpo específico de diana puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región VH seleccionado del grupo que

consiste en XPA.42.068, XPA.42.089 y XPA.42.681.

En otra realización, el anticuerpo de TGF β comprende una región variable madura de la cadena ligera que se ha divulgado anteriormente y una región variable madura de la cadena pesada que se ha divulgado anteriormente, opcionalmente emparejadas con la cadena pesada o ligera correspondientemente denominada u, opcionalmente, con una cadena pesada o ligera diferente.

En realizaciones ilustrativas, la divulgación contempla el uso de: un anticuerpo monoclonal que retiene uno cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco o seis de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 o LCDR3 de una cualquiera de los SEQ ID NOS: 13, 19 y 25; 14, 20 y 26; 15, 21 y 27 y los SEQ ID NOS: 16, 22 y 28; 17, 23 y 29; y 18, 24 y 30, respectivamente, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en cualesquiera de dichas CDR, por ejemplo, una sustitución conservativa o no conservativa y, opcionalmente, emparejada, un anticuerpo monoclonal que retiene la totalidad de HCDR1, HCDR2, HCDR3, o la región variable de la cadena pesada de una cualquiera de los SEQ ID NOS: 13, 19 y 25; 14, 20 y 26; y 15, 21 y 27, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en cualesquiera de dichas CDR, comprendiendo opcionalmente, además, cualquier región constante de la cadena pesada adecuada, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2 o IgE, una secuencia humana de las anteriores, o un híbrido de las anteriores; un anticuerpo monoclonal que retiene la totalidad de LCDR1, LCDR2, LCDR3, o la región variable de la cadena ligera de una cualquiera de los SEQ ID NOS: 16, 22 y 28; 17, 23 y 29; y 18, 24 y 30, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en cualesquiera de dichas CDR, comprendiendo opcionalmente, además, cualquier región constante de la cadena ligera adecuada, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera kappa o lambda, una secuencia humana de las anteriores, o un híbrido de las anteriores.

En algunas realizaciones, un anticuerpo útil en los métodos comprende las tres CDR de la cadena ligera, las tres CDR de la cadena pesada, o las seis CDR de la cadena ligera y pesada. En algunas realizaciones ilustrativas, dos CDR de la cadena ligera de un anticuerpo se pueden combinar con una tercera CDR de la cadena ligera de un anticuerpo diferente. Como alternativa, una LCDR1 procedente de un anticuerpo se puede combinar con una LCDR2 procedente de un anticuerpo diferente y una LCDR3 procedente de otro anticuerpo más, especialmente, cuando las CDR tienen una gran homología. De forma similar, dos CDR de la cadena pesada de un anticuerpo se pueden combinar con una tercera CDR de la cadena pesada de un anticuerpo diferente; o una HCDR1 procedente de un anticuerpo se puede combinar con una HCDR2 procedente de un anticuerpo diferente y una HCDR3 procedente de otro anticuerpo más, especialmente, cuando las CDR tienen una gran homología.

En algunas realizaciones, un anticuerpo útil en los métodos comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la región variable de la cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 2, 6 y 10 y/o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la región variable de la cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 4, 8 y 12, comprende el anticuerpo además al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 o LCDR3. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos con porcentaje de identidad con la región variable de la cadena ligera puede comprender una, dos o tres de las CDR de la cadena ligera. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos con porcentaje de identidad con la región variable de la cadena pesada puede comprender una, dos o tres CDR de la cadena pesada.

En una realización adicional, un anticuerpo útil en los métodos comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a las seis CDR de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de una secuencia de anticuerpo descrita en el presente documento, las CDR definidas en los SEQ ID NOS: 13, 19 y 25; 14, 20 y 26; y 15, 21, 27; 16, 22 y 28; 17, 23 y 29; y 18, 24 y 30.

En una realización relacionada, los restos del marco se han alterado. Las regiones marco de la cadena pesada que se pueden alterar se encuentran entre las regiones designadas como H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4, que rodean los restos de la CDR de la cadena pesada, y los restos de las regiones marco de la cadena ligera que se pueden alterar se encuentran entre las regiones designadas como L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4, que rodean los restos de la CDR de la cadena ligera. Un aminoácido comprendido en la región marco se puede sustituir, por ejemplo, por cualquier aminoácido adecuado identificados en un marco humano o en un marco de consenso humano.

En realizaciones ilustrativas, un anticuerpo dirigido contra TGF β descrito en el presente documento se une específicamente al menos a una isoforma de TGF β seleccionada del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3. En otras realizaciones, el anticuerpo dirigido contra TGF β se une específicamente a: (a) TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 ("anticuerpo pan-reactivo" o "anticuerpo de pan-unión"); (b) TGF β 1 y TGF β 2; (c) TGF β 1 y TGF β 3; y (d) TGF β 2 y TGF β 3. En realizaciones ilustrativas, un anticuerpo dirigido contra TGF β descrito en el presente documento se une al menos a una isoforma de TGF β con una afinidad de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M o menos (menor significa mayor afinidad de unión) u, opcionalmente, se une a dos isoformas de TGF β , o a todas las TGF β 1, 2, o 3 con una afinidad de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M o menos para una o más de las

isoformas. En otras realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a TGFβ1 y TGFβ2 con al menos 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5fold, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor afinidad (por ejemplo, se une preferentemente a TGFβ1 y TGFβ2) en comparación con la unión a TGFβ3. Como alternativa, un anticuerpo descrito en el presente documento, se une a cada una de las isoformas de TGFβ, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, con una afinidad en un intervalo de 3 veces, 5 veces o 10 veces entre sí.

En algunas realizaciones, la neutralización de TGFβ1 y TGFβ2 mediante el anticuerpo es al menos 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más potente que la neutralización de TGFβ3.

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.089 se definen en los SEQ ID NOS: 6 y 8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.068 se definen en los SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de XPA.42.681 se definen en los SEQ ID NOS: 10 y 12, respectivamente.

Ácidos nucleicos del anticuerpo

La presente divulgación también abarca el uso de moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos específicos de diana descritos en el presente documento y en el Listado de secuencias, opcionalmente para producir de forma recombinante un anticuerpo descrito en el presente documento o para generar variantes de anticuerpos. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo específico de diana. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo específico de diana. En una realización, el ácido nucleico codifica un anticuerpo específico de diana de la presente divulgación, así como cualquiera de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos dirigidos contra TGFβ contemplados para usar en los métodos incluyen todas las secuencias de ácido nucleico, que incluyen las secuencias de los SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9 y 11, y las secuencias de ácido nucleico que comprenden codones degenerados basados en la diversidad del código genético, que codifican una secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento, o cualesquiera HCDR o LCDR descritas en el presente documento, como se define en los SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13-30, así como los ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones muy rigurosas, tales como los descritos en el presente documento, con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento, o cualesquiera HCDR o LCDR descritas en el presente documento, como se define en los SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13-30.

La preparación de variantes y derivados de los anticuerpos y compuestos de unión a antígeno de la presente invención, incluyendo la maduración por afinidad o la preparación de variantes o derivados que contienen análogos de aminoácidos, se describe con más detalle en el presente documento. Las variantes ilustrativas incluyen las que contienen una sustitución conservativa o no conservativa de un aminoácido correspondiente comprendido en la secuencia de aminoácidos, o una sustitución de un aminoácido por un correspondiente aminoácido de una secuencia de un anticuerpo humano diferente. Las variantes y fragmentos de un anticuerpo divulgados en el presente documento se preparan usando los métodos que se describen en el presente documento, así como los conocidos en el campo de la producción de proteínas recombinantes.

Proteína de muerte celular programada 1 (PD-1)

PD-1, también conocida como grupo de diferenciación 279 (CD279) es una proteína de membrana de 268 aminoácidos. PD-1 pertenece a la familia CD28/CTLA-4 de proteínas reguladoras de linfocitos T (Ishida Y et al., The EMBO J., 11 (11): 3887-95, (1992)). PD-1 es un receptor de la superficie celular coinhibidor expresado en linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B y macrófagos, y es un componente del bloqueo del punto de control inmunitario (Shinohara et al., Genomics, 23(3):704, (1994); Francisco et al., Immunol Rev., 236: 219, (2010)). PD-1 limita la actividad de los linfocitos T después de la interacción con sus dos ligandos PD-L1 (también conocido como B7-H1; CD274) y PD-L2 (B7-DC; CD273) (Freeman GJ et al., J. Exp. Med. 192 (7): 1027-34, 2000; Latchman Y et al., Nat. Immunol., 2 (3): 261-8, 2001; Postow et al., J Clin Oncol., 33: 9, 2015). La interacción de PD-1 con PD-L1 y PD-L2, reduce la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas y la actividad citotóxica (Freeman GJ et al., J Exp Med., 192:1027-34, (2000); Brown JA et al., J Immunol., 170:1257-66, (2003)).

Anticuerpos de PD-1

Los anticuerpos dirigidos contra PD-1 se han descrito en las patentes de Estados Unidos números 8.735.553; 8.617.546; 8.008.449; 8.741.295; 8.552.154; 8.354.509; 8.779.105; 7.563.869; 8.287.856; 8.927.697; 8.088.905; 7.595.048; 8.168.179; 6.808.710; 7.943.743; 8.246.955; y 8.217.149.

Se contempla que cualquier anticuerpo conocido se pueda usar en los presentes métodos. En algunas realizaciones, en los presentes métodos se usa un anticuerpo monoclonal de murino dirigido contra la diana para PD-1 humana. Por ejemplo, MAb anti h PD-1 *in vivo* (BioXCell, Clone: RMP1-14, n.º de cat.: BE0146). Se ha comprobado que los anticuerpos dirigidos contra PD-1 son eficaces en terapia humana, véanse, por ejemplo, pembrolizumab (KEYTRUDA®, Merck Sharp & Dohme Corp.) y nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb) que son anticuerpos dirigidos contra PD-1 autorizados para usar en terapia humana. Anticuerpos de PD-1 adicionales están en fase de desarrollo clínico, por ejemplo pidilizumab (CT-011) (CureTech Ltd.).

Como alternativa, los anticuerpos de PD-1 se preparan usando técnicas conocidas en la materia y descritas en el presente documento, incluyendo tecnología de expresión en fago, tecnología de hibridoma, tecnología de ratón transgénico y otras.

En diversas realizaciones, un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TGFβ como a la proteína PD-1 es de utilidad en los presentes métodos.

Anticuerpos monoclonales

Anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Los anticuerpos monoclonales son generalmente muy específicos y pueden dirigirse contra un único sitio antigénico, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes iguales o diferentes (epítomos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan en un cultivo homogéneo, no contaminado por otras inmunoglobulinas con diferentes especificidades y características.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por el método del hibridoma, descrito en primer lugar por Kohler et al. (Nature, 256:495-7, 1975) (Harlow & Lane; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), o se pueden preparar por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., (Nature 352:624-628, 1991) y Marks et al., (J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Los métodos adicionales para producir anticuerpos monoclonales son bien conocidos de una persona normalmente experta en la materia.

Los anticuerpos monoclonales, tales como los producidos por los métodos anteriores, se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico o suero según procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía con hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis y/o cromatografía de afinidad.

Se contempla además que los anticuerpos de la presente divulgación se puedan usar como pequeños fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo que son bien conocidos en la materia y que se describen en el presente documento.

Fragmentos de anticuerpo

Los fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo intacto de longitud completa, preferentemente, una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocaténario (por ejemplo, scFv); fragmentos de anticuerpo multispecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, etc., (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); minicuerpos; anticuerpo recombinante quelante; triacuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; sustancias inmunofarmacéuticas modulares pequeñas (SMIP), proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión; anticuerpos camelizados; anticuerpos que contienen VHH; y otros polipéptidos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Holliger & Hudson (Nat. Biotech. 23:1126-36 (2005)).

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de la bisagra, que tiene dos fragmentos de anticuerpo "Fv monocaténario" o "scFv", comprende los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al Fv formar la estructura deseada para su unión al antígeno, dando como resultado un anticuerpo monocaténario (scFv), en el que una región VH y VL están emparejadas para formar una molécula monovalente mediante un enlazador sintético que permite su preparación en forma de una única cadena proteica (Bird et al., Science 242:423-426, 1988, y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1-13, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1.

- Fragmentos de anticuerpo adicionales incluyen un fragmento de dominio de anticuerpo (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) que consiste en un dominio VH. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero que usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, y Poljak et al., Structure 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.
- Los anticuerpos de cadena pesada funcionales desprovistos de las cadenas ligeras se encuentran de forma natural en tiburones nodriza (Greenberg et al., Nature 374:168-73, 1995), tiburones de la familia Orectolobidae (Nuttall et al., Mol Immunol. 38:313-26, 2001) y en camélidos (Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8, 1993; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998), tales como camellos, dromedarios, alpacas y llamas. El sitio de unión al antígeno se reduce a un único dominio, el dominio VHH, en estos animales. Estos anticuerpos forman regiones de unión a antígeno que utilizan solamente la región variable de la cadena pesada, es decir, estos anticuerpos funcionales son homodímeros de las cadenas pesadas que solamente tienen la estructura H2L2 (denominados como "anticuerpos de cadena pesada" o "HCABs"). Se ha informado que el VHH camélido se recombina con las regiones constantes de IgG2 e IgG3 que contienen los dominios bisagra, CH2, y CH3 y carecen de un dominio CH1 (Hamers-Casterman et al., más arriba). Por ejemplo, la IgG1 de llama es un isotipo de anticuerpo convencional (H2L2) en el que VH se recombina con una región constante que contiene los dominios de bisagra, CH1, CH2 y CH3, mientras que IgG2 e IgG3 de llama son isotipos solo de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y que no contienen cadenas ligeras. Se ha descubierto que los dominios VHH de camélido se unen al antígeno con alta afinidad (Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001) y tienen una elevada estabilidad en solución (Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002). Los fragmentos clásicos que solo tienen VH son difíciles de producir en forma soluble, pero se pueden obtener mejoras en la solubilidad y en la unión específica cuando los restos marco se alteran para que sean más parecidos a VHH. (Véase, por ejemplo, Reichman, et al., J Immunol Methods 1999, 231:25-38.) Los métodos para generar anticuerpos que tienen cadenas pesadas de camélido se describen en, por ejemplo, en las publicaciones de patentes estadounidenses con números 20050136049 y 20050037421.
- El dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo es el fragmento de unión a antígeno completamente funcional más pequeño con una masa molecular de 15 kDa solamente, esta entidad se denomina un nanocuerpo (Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004). Se puede generar una biblioteca de nanocuerpos a partir de un dromedario inmunizados como se describe en Conrath et al., (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001) o usando métodos recombinantes, como se describe en Revets et al, Expert Opin. Biol. Ther. 5(1):111-24 (2005).
- La producción de Fab-scFv biespecíficos ("bicuerpos") y Fab-(scFv)(2) triespecíficos ("tricuerpos") se describe en Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000) y Willems et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). Para los bicuerpos o triacuerpos, una molécula scFv se fusiona a una o ambas de las cadenas VL-CL (L) y VH-CH1 (Fd), por ejemplo, para producir un tricuerpo, dos scFv se fusionan al extremo C de Fab mientras que, en un bicuerpo, un scFv se fusiona al extremo C de Fab.
- Un "minicuerpo" que consiste en un scFv fusionado a CH3 mediante un enlazador peptídico (sin bisagra) o mediante una bisagra de IgG se ha descrito en Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 17(4):315-23, 2004.
- Los intracuerpos son anticuerpos monocatenarios que demuestran expresión intracelular y pueden manipular la función de las proteínas intracelulares (Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101:17616-21, 2004). Los intracuerpos, que comprenden secuencias de señalización celular que retienen la construcción del anticuerpo en regiones intracelulares, se pueden producir como se describe en Mhashilkar et al (EMBO J 14:1542-51, 1995) y Wheeler et al. (FASEB J. 17:1733-5. 2003). Los transcuerpos son anticuerpos permeables a células en los que un dominio de transducción de proteínas (PTD) está fusionado con un fragmento variable monocatenario (scFv) de anticuerpo (Heng et al., (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005).
- Se contemplan además anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión específicos para la proteína diana. Estas construcciones son polipéptidos monocatenarios que comprenden dominios de unión al antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, el documento WO03/041600, la publicación de patente de Estados Unidos 20030133939 y la publicación de patente de Estados Unidos 20030118592.
- Se pueden incorporar una o más CDR a una molécula de forma covalente o no covalente para convertirla en una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar una o varias CDR como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede unir covalentemente una o varias CDR a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar la una o varias CDR de forma no covalente. Las CDR permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a un antígeno particular de interés.
- Por lo tanto, varias composiciones que comprenden una, dos y/o tres CDR (por ejemplo, una sola CDR o en tándem, 2, 3 u otras múltiples repeticiones de las CDR; o combinaciones de 2 o 3 CDR individuales o como repeticiones en

tándem; opcionalmente, con una secuencia de aminoácidos separadora entre las CDR o repeticiones) de una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo se pueden generar por técnicas conocidas en la materia.

5 Anticuerpos multiespecíficos

En algunas realizaciones, puede ser deseable generar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) contra una diana que tienen especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes en las mismas moléculas u otras diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítomos diferentes de la molécula diana. Como alternativa, un brazo de anticuerpo específico de TGF β se puede combinar con un brazo que se une a PD-1. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan o capturan una diana. Estos anticuerpos tienen un brazo de unión a la diana y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-60, alcaloide de la vinca, la cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos F(ab')₂ biespecíficos). Véanse también las revisiones de los métodos y los beneficios terapéuticos de los anticuerpos biespecíficos en Spasevska I, BioSciences Master Reviews, 2014; Caravella J y Lugovskoy A, Curr Opin Chem Biol., 14(4)520-528,2010

De acuerdo con otro enfoque para preparar anticuerpos biespecíficos, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos grandes por otros más pequeños (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros. Véase el documento WO96/27011.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Se han descrito también en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando unión química. Brennan et al., (Science 229:81-83, 1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. En una realización adicional más, los fragmentos de Fab'-SH directamente recuperados de E. coli se pueden acoplar químicamente *in vitro* para formar anticuerpos biespecíficos. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')₂ específico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de E. coli y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado pudo unirse a células que expresaban en exceso el receptor HER2 y los linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. (Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los anticuerpos homodiméricos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:6444-48 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos.

Los fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada (VH) conectado a una región variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado

otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Como alternativa, el anticuerpo biespecífico puede ser un "anticuerpo lineal" producido como se describe en Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995). Los anticuerpos lineales comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo recombinante quelante (CRAb). Un anticuerpo recombinante quelante reconoce epítomos adyacentes y no solapantes del antígeno diana, y es lo suficientemente flexible como para enlazar ambos epítomos simultáneamente (Neri et al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995).

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. (Tutt et al., J. Immunol. 147:60, 1991).

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Como los anticuerpos quiméricos o humanizados son menos inmunógenos en seres humanos que los anticuerpos monoclonales precursores no humanos (por ejemplo, de ratón), se pueden usar para el tratamiento de seres humanos con un riesgo de anafilaxia bastante más bajo.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos, en los que los dominios variables de Ig de un anticuerpo monoclonal no humano (por ejemplo, de ratón) se han fusionado a dominios constantes de Ig humana, se pueden generar usando procedimientos convencionales conocidos en la materia (véanse Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855 (1984); y, Boulianne et al, Nature 312, 643-646, (1984)).

Los anticuerpos humanizados se pueden conseguir por una diversidad de métodos entre los que se incluyen, por ejemplo: (1) injertar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en marcos y una región constante humanos (un proceso denominado en la técnica como humanización mediante "injerto de CDR"), (2) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "cubrirlos" con una superficie de tipo humano sustituyendo los restos superficiales (un proceso que se denomina en la técnica como "chapado"), o, como alternativa, (3) sustituir los aminoácidos humanos en posiciones determinadas como improbables para afectar negativamente tanto la unión con el antígeno como el plegado de la proteína, pero que probablemente reducir la inmunogenicidad en un entorno humano (por ejemplo, HUMAN ENGINEERING™). En la presente divulgación, los anticuerpos humanizados incluirán anticuerpos "humanizados", "chapados" y "HUMAN ENGINEERED™". Estos métodos se divulgan en, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31:169-217 (1994); Studnicka et al., patente de los Estados Unidos n.º 5.766.886; Studnicka et al., (Protein Engineering 7: 805-814, 1994; Co et al., J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994); Riechmann, et al., Nature 332:323-27 (1988); y Kettleborough et al., Protein Eng. 4:773-783 (1991). Las técnicas de injerto de CDR son conocidas en la materia, véase, por ejemplo, Riechmann, et al. (Nature 332:323-27 (1988)).

Anticuerpos humanos de animales transgénicos

Los anticuerpos humanos contra proteínas diana también se pueden producir usando animales transgénicos que no tienen producción endógena de inmunoglobulinas y se han diseñado para contener loci de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, El documento WO 98/24893 divulga animales transgénicos que tienen un locus Ig humana en donde los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de los loci endógenos de las cadenas pesadas y ligeras. El documento WO 91/00906 también divulga hospedadoras de mamíferos no de primate transgénicos capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, en donde los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primate, y en donde los loci endógenos que codifican la inmunoglobulina están sustituidos o inactivados. El documento WO 96/30498 y la patente de Estados Unidos n.º 6.091.001 divulgan el uso del sistema Cre/lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero, tal como para sustituir todo o parte de la región constante variable para formar una molécula de anticuerpo modificado. El documento WO 94/02602 divulga hospedadores mamíferos no humanos que tienen loci endógenos de Ig inactivados y loci de Ig humana funcionales. La patente de Estados Unidos n.º 5.939.598 divulga métodos para preparar ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas, y expresan un locus exógeno de la inmunoglobulina que comprende una o más regiones constantes xenogénicas. Véanse también, las patentes de Estados Unidos números 6.114.598, 6.657.103 y 6.833.268; Green LL, Curr Drug Discovery Technol., 11(1), 74-84, 2014; Lee EC et al., Nature Biotechnology, 32:356-363, 2014; Lee EC y Owen M, Methods Mol Biol., 901:137-48, 2012).

Usando un animal transgénico anteriormente descrito, se puede producir una respuesta inmunitaria contra una molécula antigénica seleccionada, se pueden extraer células productoras de anticuerpos del animal y utilizarse para producir hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, adyuvantes y similares, son conocidos en la materia, y se utilizan en la inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico, como

se describe en el documento WO 96/33735. Esta publicación divulga anticuerpos monoclonales contra varias moléculas antigénicas entre las que se incluyen IL-6, IL-8, TNF α , CD4 humana, L-selectina, gp39 y toxina tetánica. Los anticuerpos monoclonales se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la correspondiente proteína. El documento WO 96/33735 divulga que los anticuerpos monoclonales contra IL-8, derivados de células inmunitarias de ratones transgénicos inmunizados con IL-8, bloquean las funciones inducidas por IL-8 en neutrófilos. Los anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por el antígeno utilizado para inmunizar animales transgénicos también se divulgan en el documento WO 96/34096 y en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030194404; y en la solicitud de patente n.º 20030031667.

Los animales transgénicos adicionales útiles para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los Medarex HuMAb-MOUSE®, descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.770.429 y en Fishwild, et al. (Nat. Biotechnol. 14:845-851 (1996)), que contienen secuencias génicas procedentes de genes de anticuerpos humanos no reordenados que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpos humanos. La inmunización de un HuMAb-MOUSE® permite la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos contra la proteína diana.

También, Ishida et al. (Cloning Stem Cells. 4:91-102 (2002)) describe el ratón TransChromo (TCMOUSE™) que comprende segmentos de tamaño megabase de ADN humano y que incorpora todos loci de inmunoglobulina humana (hlg). El TCMOUSE™ tiene una gama diversa de hlg, que incluye todas las subclases de IgGs(IgG1-G4). La inmunización del TCMOUSE™ con diversos antígenos humanos produce respuestas de anticuerpos que comprenden anticuerpos humanos.

Véanse también Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immunol., 7:33 (1993); y patente de Estados Unidos n.º 5.591.669, la patente de EE.UU. n.º 5.589.369, patente de Estados Unidos n.º 5.545.807; y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20020199213. La publicación de patente de EE.UU. n.º 20030092125 describe métodos para desviar la respuesta inmunitaria de un animal hacia el epítipo deseado. También pueden generarse anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de los Estados Unidos números 5.567.610 y 5.229.275).

Anticuerpos humanos para tecnología de expresión

El desarrollo de tecnologías para preparar repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes, y la expresión de los fragmentos de anticuerpo codificados en la superficie de bacteriófagos filamentosos, ha proporcionado un medio para preparar directamente anticuerpos humanos. Los anticuerpos producidos mediante tecnología de fagos se producen como fragmentos de unión a antígeno -usualmente fragmentos Fv o Fab- en bacterias y, por tanto, carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras se pueden introducir mediante una de estas dos estrategias: Los fragmentos pueden estar genomanipulados, por ejemplo, para producir anticuerpos completos para la expresión en células de mamífero, o en fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de unión que puede disparar una función efectora.

Como ejemplo, un método para preparar la biblioteca de anticuerpos para su uso en técnicas de expresión en fago comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina humana con antígeno diana o una porción antigénica del mismo para producir una respuesta inmunitaria, extraer células productoras de anticuerpos del animal inmunizado; aislar el ARN de las células extraídas, transcribir de manera inversa el ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc usando un cebador, e insertar el ADNc en un vector de expresión en fago de forma que los anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos recombinantes específicos de antígeno de la divulgación se pueden obtener de esta forma.

En otro ejemplo, se pueden extraer células productoras de anticuerpos de animales no inmunizados, aislar el ARN de las células extraídas, y transcribirlo de forma inversa para producir ADNc, que se amplifica usando un cebador, y se introduce en un vector de expresión en fago de forma que los anticuerpos se expresen en el fago. Los procesos de expresión en fago imitan la selección inmunitaria mediante la expresión de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos y la posterior selección del fago por su unión a un antígeno de selección. Una de estas técnicas se describe en el documento WO 99/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas de elevada afinidad y funcionalidad para los receptores MPL y msk usando dicho enfoque. Los anticuerpos de la divulgación se pueden aislar por cribado de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, preferentemente, una biblioteca de expresión en fagos de scFv, preparada usando ADNc de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y cribar dichas bibliotecas son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.969.108. Existen kits comercialmente disponibles para generar bibliotecas de expresión en fagos (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fago de Stratagene SurfZAP.TM., n.º de catálogo 240612). Existen también otros métodos y reactivos que se pueden usar para generar y cribar bibliotecas de expresión de anticuerpos (véanse, por ejemplo, Ladner et al. patente de EE.UU. n.º 5.223.409; Kang et al. publicación PCT n.º WO 92/18619; Dower et al. publicación PCT n.º WO 91/17271; Winter et al. publicación PCT n.º WO 92/20791; Markland et al. publicación PCT n.º WO 92/15679; Breitling et al. publicación PCT n.º WO 93/01288; McCafferty et al. publicación PCT n.º WO 92/01047; Garrard et al. publicación PCT n.º WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science

246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.

En un enfoque, para aislar anticuerpos humanos específicos del antígeno diana con las características deseadas, una biblioteca de VH y VL humanas se criban para seleccionar fragmentos de anticuerpo que tengan la especificidad deseada. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferentemente bibliotecas scFV preparadas y cribadas como se describe en el presente documento y en la técnica (McCafferty et al., publicación PCT n.º WO 92/01047, McCafferty et al., (Nature 348:552-554 (1990)); y Griffiths et al., (EMBO J 12:725-734 (1993)). Las bibliotecas de anticuerpos scFV se criban, preferentemente, usando proteína diana como antígeno.

Como alternativa, el fragmento Fd (VH-CH1) y la cadena ligera (VL-CL) de los anticuerpos se clonan de forma independiente mediante PCR y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas combinatorias de expresión en fagos, que después se pueden seleccionar por su unión a un antígeno particular. Los fragmentos Fab se expresan sobre la superficie del fago, es decir, se unen físicamente a los genes que los codifican. Por lo tanto, la selección de Fab mediante unión con el antígeno coselecciona la secuencias que codifican el Fab, que se pueden amplificar posteriormente. Mediante varias rondas de unión a antígeno y reamplificación, un procedimiento denominado purificación por adsorción, se enriquece el Fab específico del antígeno y finalmente se aísla.

En 1994, se describió un enfoque para la humanización de anticuerpos, denominado "selección guiada". La selección guiada utiliza la potencia de la técnica de expresión en fago para la humanización del anticuerpo monoclonal de ratón (véase Jaspers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). Para esto, el fragmento Fd del anticuerpo monoclonal de ratón puede expresarse junto con una biblioteca de la cadena ligera humana, y la biblioteca de Fab híbrida resultante se puede seleccionar a continuación con antígeno. De este modo, el fragmento Fd proporciona un molde para guiar la selección. Posteriormente, las cadenas ligeras humanas seleccionadas se combinan con una biblioteca de fragmentos Fd humanos. La selección de la biblioteca resultante produce Fab completamente humanos.

Se ha descrito varios procedimientos para derivar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de expresión en fago (véanse, por ejemplo, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); las patentes de Estados Unidos números 5.565.332 y 5.573.905; Clackson, T., y Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). En particular, la selección y evolución *in vitro* de anticuerpos derivados de bibliotecas de expresión en fago se ha convertido en una poderosa herramienta (véanse Burton, D. R., y Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); publicación de patente de EE.UU. n.º 20020004215 y documento WO 92/01047; publicación de patente de EE.UU. n.º 20030190317; y las patentes de Estados Unidos números 6.054.287 y 5.877.293.

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193 (2002), y la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030044772, publicada el 6 de marzo de 2003, describen métodos para cribar bibliotecas de anticuerpos expresadas en fagos u otras moléculas de unión para captura por elevación, un método que implica la inmovilización de las moléculas de unión candidatas a un soporte sólido.

Los fragmentos Fv se expresan sobre la superficie del fago, mediante la asociación de una cadena expresada como una proteína de fusión de fago (por ejemplo, con el gen M13 III) y la cadena complementaria expresada como fragmento soluble. Se contempla que el fago pueda ser un fago filamentoso tal como uno de los fagos de la clase I: fd, M13, f1, f1, lke, ZJ/Z, Ff y uno de la clase II de fagos Xf, Pfl y Pf3. El fago pueda ser M13 o fd o un derivado de los mismos.

Una vez que se han seleccionado los segmentos VL y VH humanos, se realizan experimentos de "mezclar y emparejar", en los que diferentes pares de los segmentos VL y VH inicialmente seleccionados se criban por su unión a la diana, para seleccionar las combinaciones preferidas de pares VL/VH. Adicionalmente, para mejorar además la calidad del anticuerpo, los segmentos VL y VH del uno o más pares VL/VH preferidos se pueden mutar aleatoriamente, preferentemente dentro de cualquiera de las regiones CDR1, CDR2 o CDR3 de VH y/o VL, en un procedimiento análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración por afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración por afinidad *in vitro* se puede llevar a cabo amplificando las regiones VL y VH usando cebadores de PCR complementarios de las CDR1, CDR2 y CDR3 de VH o CDR1, CDR2 y CDR3 de VL, respectivamente, donde los cebadores se han "enriquecido" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en determinadas posiciones, de manera que los productos de PCR resultantes codifican segmentos VH y VL en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones de la CDR3 de VH y/o VL. Estos segmentos VL y VH mutados aleatoriamente se pueden volver a cribar por su unión al antígeno diana.

Después del cribado y el aislamiento de un anticuerpo específico de diana a partir de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado se puede recuperar del paquete de expresión (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión por técnicas de ADN recombinante convencionales. Si se desea, el ácido nucleico se puede manipular adicionalmente para crear

otras formas de anticuerpos de la divulgación, como se describe a continuación. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula hospedadora de mamífero, como se describe en el presente documento.

Se contempla que el método de expresión en fago se pueda llevar a cabo en una cepa mutagénica de la bacteria o célula hospedadora. Una cepa mutagénica es una célula hospedadora que tiene un defecto genético que hace que el ADN replicado en la misma quede mutado en comparación con su ADN precursor. Cepas mutagénicas ilustrativas son NR9046mutD5 y NR9046 mut T1.

También se contempla que el método de expresión en fago se pueda llevar con un fago auxiliar. Se trata de un fago que se utiliza para infectar las células que contienen un genoma de fago defectuoso y que actúan para complementar el defecto. El genoma de fago defectivo puede ser un fagémido o un fago del que se han eliminado algunas secuencias génicas que codifican funciones. Ejemplos de fagos auxiliares son M13K07, M13K07 gen III n. 3; y fago que expresa o que codifica una molécula de unión fusionada a una proteína de la cápside.

También se generan anticuerpos por métodos de cribado de expresión en fago usando el enfoque jerárquico combinatorio doble que se divulga en el documento WO 92/01047, en el que una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifica la otra cadena (L o H) y el elemento de unión bicatenario específico resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de expresión en fago como las descritas en dichos documentos. Esta técnica también se divulga en Marks et al., (Bio/Technology, 10:779-783 (1992)).

Los métodos de expresión de péptidos sobre la superficie de células de levadura, microbianas y de mamífero también se han utilizado para identificar anticuerpos específicos de antígenos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.348.867; 5.723.287; 6.699.658; Wittrup, Curr Op. Biotech. 12:395-99 (2001); Lee et al, Trends in Biotech. 21(1) 45-52 (2003); Surgeeva et al, Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 1622-54 (2006). Las bibliotecas de anticuerpos se pueden unir a proteínas de levadura, tales como aglutinina, imitando eficazmente la expresión en la superficie de las células de los anticuerpos mediante los linfocitos B del sistema inmunitario.

Además de los métodos de expresión en fago, los anticuerpos se pueden aislar usando métodos de expresión *in vitro* y expresión en células microbianas, que incluyen la expresión en ribosomas y la expresión de ARNm (Amstutz et al, Curr. Op. Biotech. 12: 400-05 (2001)). La selección de polipéptidos usando expresión en ribosomas se describe en Hanes et al., (Proc. Natl Acad Sci USA, 94:4937-4942 (1997)) y las patentes de Estados Unidos números 5.643.768 y 5.658.754 concedidas a Kawasaki. La expresión en ribosomas es también útil para un análisis mutacional a gran escala rápido de los anticuerpos. El enfoque de mutagénesis selectiva también proporciona un método para producir anticuerpos con las actividades mejoradas que se pueden seleccionar usando técnicas de expresión en ribosomas.

Variantes de secuencia de aminoácidos

Se pueden generar composiciones de polipéptidos modificados que comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis CDR de un anticuerpo, en donde una CDR se ha alterado para proporcionar mayor especificidad o afinidad con la molécula diana. Los sitios dentro de las CDR de un anticuerpo se han modificado normalmente en serie, por ejemplo, sustituyendo en primer lugar con opciones conservativas (por ejemplo, un aminoácido hidrófobo sustituido por un aminoácido hidrófobo no idéntico) y después con opciones más diferenciadas (por ejemplo, aminoácido hidrófobo sustituido por un aminoácido cargado), y después se pueden realizar delecciones o inserciones en el sitio diana. Por ejemplo, usando las secuencias marco conservadas que rodean las CDR, se generan cebadores de PCR complementarios de dichas secuencias de consenso para amplificar la secuencia de CDR específica de antígeno situada entre las regiones del cebador. Las técnicas para clonar y expresar secuencias de nucleótidos y de polipéptidos están bien establecidos en la materia [véanse, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989)]. Las secuencias amplificadas de las CDR se ligan en un plásmido adecuado. El plásmido que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis CDR clonadas contiene opcionalmente regiones codificantes de polipéptidos adicionales unidas a la CDR.

Las modificaciones se pueden realizar mediante sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, que se describen con más detalle más adelante. Las "inserciones" o "delecciones" están preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 10 aminoácidos. La variación se puede introducir realizando sistemáticamente sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica del anticuerpo usando las técnicas de ADN recombinante y sometiendo a ensayo las variantes recombinante resultantes para determinar su actividad. Se pueden realizar alteraciones en el ácido nucleico en sitios que difieren en su ácido nucleico del de otras especies (posiciones variables) o en regiones altamente conservadas (regiones constantes). Los métodos para alterar las secuencias de anticuerpos y expresar composiciones de polipéptidos de anticuerpo útiles en la divulgación se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 8.569.462.

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la

semivida en suero de la molécula de IgG *in vivo*.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. En estas variantes, al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo se ha eliminado y en su lugar se ha insertado un resto diferente. Se contempla la mutagénesis de sustitución dentro de cualquiera de las regiones hipervariables o CDR o regiones marco. Las sustituciones conservativas implican la sustitución de un aminoácido por otro miembro de su clase. Las sustituciones no conservativas implican la sustitución de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos conservativas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o en la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina (Ala, A), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), prolina (Pro, P), fenilalanina (Phe, F), triptófano (Trp, W) y metionina (Met, M); los aminoácidos polares neutros incluyen glicina (Gly, G), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), cisteína (Cys, C), tirosina (Tyr, Y), asparagina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q); los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina (Arg, R), lisina (Lys, K) e histidina (His, H); y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E).

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Glucosilación alterada

También se pueden producir variantes de anticuerpo que tengan un patrón de glucosilación alterado con respecto al anticuerpo precursor, por ejemplo, eliminación de uno o más restos de carbohidrato del anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. Por lo tanto, los sitios de glucosilación ligados a N se pueden añadir a un anticuerpo alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de estas secuencias de tripéptido. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más frecuentemente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Los sitios de glucosilación ligados a O se pueden añadir a un anticuerpo insertando o sustituyendo uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original.

Los glicanos Fc alteran la unión de la IgG a los receptores Fc y a C1q y, por tanto, son importantes para las funciones efectoras de IgG. Se pueden producir variantes de anticuerpos con glicanos Fc modificados y funciones efectoras alteradas. Por ejemplo, los anticuerpos con azúcares modificados en sus extremos, como ácidos siálicos, fucosa nuclear, N-acetilglucosamina bisectante y restos de manosa pueden alterar la unión al receptor FcγRIIIa y alterar la actividad ADCC. En un ejemplo adicional, los anticuerpos con restos de galactosa modificados en sus extremos pueden alterar la unión a C1q y alterar la actividad CDC (Raju, Curr. Opin. Immunol. 20: 471-78 (2008)).

También se contemplan para usar en los métodos las moléculas de anticuerpo sin fucosilación o con fucosilación reducida que presentan una actividad ADCC mejorada. Se conocen en la materia distintas formas de realizar esto. Por ejemplo, la actividad ADCC efectora está mediada por la unión de la molécula de anticuerpo al receptor FcγRIII, lo que se ha comprobado que es dependiente de la estructura del carbohidrato de la glucosilación vinculada a N en el Asn-297 del dominio CH2. Los anticuerpos no fucosilados se unen a este receptor con mayor afinidad y activan las funciones efectoras mediadas por FcγRIII- de forma más eficaz que los anticuerpos naturales fucosilados. Por ejemplo, la producción recombinante de anticuerpos no fucosilados en células CHO, en las que la enzima alfa-1,6-fucosil transferasa se ha desactivado genéticamente, da como resultado un anticuerpo con actividad ADCC 100 veces mayor (Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 87:614-22 (2004)). Se pueden conseguir efectos similares mediante la disminución en la actividad de estas u otras enzimas en la ruta de fucosilación, por ejemplo, a través de un tratamiento con ARNip o de sentido contrario, líneas celulares genomanipuladas para desactivar genéticamente enzima(s), o por cultivo con inhibidores de la glucosilación selectivos (Rothman et al., Mol Immunol. 26:1113-23 (1989)). Algunas cepas de células hospedadoras, por ejemplo Lec13 o la línea de células de hibridoma de rata YB2/O producen anticuerpos de forma natural con niveles de fucosilación más bajos. (Shields et al., J Biol Chem. 277:26733-40 (2002); Shinkawa et al., J Biol Chem. 278:3466-73 (2003)). Un aumento en el nivel de carbohidrato bisectriz, por ejemplo mediante la producción recombinante de anticuerpos en células que expresan un exceso de enzima GnTIII, también se ha determinado que aumenta la actividad ADCC (Umana et al., Nat Biotechnol. 17:176-80 (1999)). Se ha previsto que la ausencia de solo uno de los dos restos de fucosa puede ser suficiente para aumentar la actividad ADCC (Ferrara et al., Biotechnol Bioeng. 93:851-61 (2006)).

Variantes con función efectora alterada

Se contemplan otras modificaciones de los anticuerpos para usar en los métodos. En un aspecto, puede ser deseable modificar un anticuerpo usado en el presente documento con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Un método para modificar la función efectora enseña que se pueden introducir uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron y col., (J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)) y Shopes, B. (J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., (Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)). Como alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y pueden potenciarse de este modo la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véanse Stevenson et al., (Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)). Además, se ha comprobado que las secuencias internas de la CDR pueden hacer que un anticuerpo se una a MHC de Clase II y disparar una respuesta de linfocitos T auxiliares no deseada. Una sustitución conservativa puede permitir que el anticuerpo retenga su actividad de unión pero pierda su capacidad para disparar una respuesta de linfocitos T auxiliares no deseada.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración en el tumor, por ejemplo. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semivida en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacáridos, a los fragmentos de anticuerpo para aumentar la semivida.

El epítipo de unión del receptor de rescate constituye, preferentemente, una región en donde uno cualquiera o más restos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio de FC se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferentemente, se transfieren tres o más restos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferentemente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o VH, o más de una de esas regiones, del anticuerpo. Como alternativa, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o a la región VL o a ambas, del fragmento de anticuerpo.

Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una porción Fc humana, una porción Fc humana de consenso, o una variante de la misma que retenga su capacidad de interactuar con el receptor de rescate de Fc, incluidas variantes en las que se han modificado o eliminado las cisteínas involucradas en la unión por puente disulfuro, y/o en las que se añade una met al extremo N y se eliminan uno o más de los 20 aminoácidos del extremo N, y/o regiones que interactúan con el complemento, tal como el sitio de unión a C1q, se eliminan, y/o el sitio ADCC se elimina [véase, por ejemplo, Sarmay et al., Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)].

Shields et al. notificaron que los restos de IgG1 involucrados en la unión a todos los receptores Fc humanos están situados en el dominio CH2 cercano a la bisagra y se clasifican en dos categorías, de la siguiente forma: 1) posiciones que pueden interactuar directamente con todos los FcR incluyen Leu234-Pro238, Ala327 y Pro329 (y posiblemente Asp265); 2) posiciones que alteran la naturaleza o la posición del carbohidrato incluyen Asp265 y Asn297. Los restos de IgG1 adicionales que alteran la unión al receptor Fc II son los siguientes: (efecto más grande) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, y (menos efecto) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 y Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A y D270A reducen la unión. Además de los restos anteriormente identificados para todos los FcR, los restos de IgG1 adicionales que reducen la unión al receptor Fc IIIA en un 40 % o más son los siguientes: Ser239, Ser267 (solo Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 y Asp376. Las variantes que mejoran la unión al FcRIIIA incluyen T256A, K290A, S298A, E333A, K334A y A339T. Lys414 mostró una reducción del 40 % en la unión a FcRIIA y FcRIIB, Arg416, una reducción del 30 % en la unión a FcRIIA y FcRIIIA, Gln419, una reducción del 30 % a FcRIIA y una reducción del 40 % a FcRIIB, y Lys360, una mejora del 23 % a FcRIIIA. Véase también Presta et al., (Biochem. Soc. Trans. 30:487-490, 2001), que describe varias posiciones en la región Fc de IgG1 para las que se ha descubierto una unión mejorada solamente a receptores (R) Fc gamma específicos o mejoraron simultáneamente la unión a un tipo de R Fc gamma y una unión reducida a otro tipo. Las variantes de IgG1 seleccionadas con unión mejorada a Fc gamma RIIIA se analizaron a continuación en un ensayo de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) *in vitro* y mostraron una mejora en la ADCC cuando se usaron tanto células mononucleares de sangre periférica como linfocitos citolíticos naturales.

Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.194.551, describe variantes con función efectora alterada que contienen mutaciones en la región Fc de IgG humana, en la posición de aminoácido 329, 331 o 322 (usando la numeración de Kabat), algunas de las cuales presentan una unión de C1q reducida o actividad CDC. En otro ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.737.056, describe variantes con función efectora alterada o unión al receptor Fc-gamma que contienen mutaciones en la región Fc de IgG humana, en la posición de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 (usando la numeración de Kabat), algunas de las cuales

presentan perfiles de unión al receptor con una reducción en la actividad ADCC o CDC. De estas, se ha indicado que una mutación en la posición de aminoácido 238, 265, 269, 270, 327 o 329 reduce la unión a FcRI, se ha indicado que una mutación en la posición de aminoácido 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 reduce la unión a FcRII, y se ha indicado que una mutación en la posición de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 reduce la unión a FcRIII.

La patente de EE.UU. n.º 5.624.821, notifica que la actividad de unión a Clq de un anticuerpo de murino se puede alterar por mutación del resto de aminoácido 318, 320 o 322 de la cadena pesada y que la sustitución del resto 297 (Asn) da como resultado la eliminación de la actividad lítica.

La publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040132101, describe variantes con mutaciones en las posición de aminoácidos 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 o 332 (usando la numeración de Kabat) o en las posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 o 332 (usando la numeración de Kabat), o que dichas mutaciones en las posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 o 332 pueden reducir la actividad ADCC o reducir la unión a un receptor Fc gamma.

Modificaciones covalentes

Los anticuerpos que comprenden modificaciones covalentes también se contemplan para usar en los métodos. Se pueden preparar mediante síntesis química o mediante escisión enzimática o química del anticuerpo, cuando proceda. Se introducen otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácidos dirigidos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos de los extremos N o C.

Los restos de cisteinilo se hacen reaccionar muy frecuentemente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, 2-piridil disulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Otras modificaciones incluyen histidilo, lisinilo, arginilo, tirosilo, glutaminilo y asparaginilo, hidroxilación de prolina y lisina. Los métodos para preparar dichas modificaciones se divulgan en la patente de Estados Unidos 8.926.976 y en la técnica.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas (R-N.dbd.C.dbd.N-R'), donde R y R' son diferentes grupos alquilo, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los restos de aspartilo y glutamilo se convierten en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del extremo N, y amidación de los grupos carboxilo del extremo C.

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar glucósidos química o enzimáticamente al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación ligada a N y O.

Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, los azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 y en Aplin y Wriston, (CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981)).

La eliminación de los posibles restos de carbohidrato presentes en el anticuerpo se puede llevar a cabo química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares, excepto el azúcar enlazador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el anticuerpo. La desglucosilación química se describe en Hakimuddin, et al., (Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)) y en Edge et al., (Anal. Biochem. 118: 131 (1981)). La escisión enzimática de restos de carbohidrato de los anticuerpos se puede conseguir mediante el uso de varias endoglucosidasas y exoglucosidasas como se describe en Thotakura et al., (Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende enlazar el anticuerpo a uno de varios polímeros no

proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietado, polioxialquilenos o polímeros de polisacáridos tales como el dextrano. Dichos métodos son conocidos en la materia.

5 Derivados

Como se ha indicado anteriormente, derivado, cuando se utiliza respecto a las sustancias y polipéptidos de anticuerpos, se refiere a polipéptidos químicamente modificados por técnicas tales como la ubiquitinación, etiquetado (por ejemplo, con radionucleidos o varias enzimas), unión covalente de polímero tal como PEGilación (derivatización con polietilenglicol) y la inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos como ornitina. Los derivados de los anticuerpos divulgados en el presente documento son también útiles como agentes terapéuticos y se pueden utilizar en los métodos del presente documento.

El resto conjugado se puede incorporar a o unirse a una sustancia de anticuerpo bien covalentemente o a través de enlaces iónicos, de van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, incorporación de nucleótidos radioactivos, o nucleótidos biotinilados que son reconocidos por estreptavidina.

El polietilenglicol (PEG) se puede unir a las sustancias de anticuerpo para proporcionar una semivida prolongada *in vivo*. El grupo -PEG tener cualquier peso molecular conveniente y puede estar ramificado o no ramificado. El peso molecular promedio del PEG preferentemente estará comprendido en un intervalo de aproximadamente 2 kiloDalton ("kD") a aproximadamente 100 kDa, más preferentemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, con máxima preferencia de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG generalmente se unirán a las sustancias de anticuerpo de la divulgación mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo natural o genomanipulado en el resto de PEG (por ejemplo, un aldehído, un grupo amino, tiol o éster) a un grupo reactivo en la sustancia de anticuerpo (por ejemplo, un aldehído, un grupo amino o éster). La adición de restos PEG a sustancias de anticuerpo se puede llevar a cabo usando técnicas bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 96/11953 y la patente de Estados Unidos n.º 4.179.337.

La ligadura de la sustancia de anticuerpo con PEG habitualmente se lleva a cabo en fase acuosa y se puede supervisar fácilmente mediante HPLC analítica en fase invertida. Las sustancias PEGiladas se purifican mediante HPLC preparativa y se caracterizan mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas con desorción por láser.

Conjugados de anticuerpos

Un anticuerpo se puede administrar en su forma "desnuda" o n o conjugada, o se puede conjugar directamente a otros agentes terapéuticos o diagnósticos, o se puede conjugar indirectamente a polímeros portadores que comprenden dichos otros agentes terapéuticos o diagnósticos. En algunas realizaciones, el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen: daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) más arriba). Las toxinas adecuadas incluyen: toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica; toxinas vegetales tales como ricina; toxinas de molécula pequeña tales como geldanamycin (Mandler et al. J. Natl. Cancer Inst. 92(19):1573-81 (2000); Mandler et al., Bioorg. Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13,786-91 (2002)), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-23 (1996)), auristatinas (Doronina et al., Nat. Biotech. 21: 778-84 (2003) y caliqueamicina (Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)). Los conjugados de anticuerpo-fármaco y los métodos se revisan en Ducry L, mAbs. 6(1), 2014 y Shen WC, AAPS.,17: 3-7, 2015.

Los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable mediante el uso de radioisótopos, etiquetas de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), etiquetas enzimáticas (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) etiquetas fluorescentes o luminiscentes o bioluminiscentes (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, y similares. Los procedimientos para llevar a cabo dicho etiquetado son bien conocidos en la materia; por ejemplo, véanse (Sternberger, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

La conjugación de los restos de anticuerpos se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.306.393. Las técnicas generales también se describen en Shih et al., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); y Shih et al., patente de EE.UU n.º 5.057.313. Este método general implica hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una porción de carbohidrato oxidada con un polímero transportador que tiene al menos una función amina libre y que se carga con una pluralidad de fármaco, toxina, quelante, adendas de boro u otro agente terapéutico. Esta reacción da como resultado una unión de base de Schiff inicial (imina), que se puede estabilizar mediante reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

El polímero transportador puede ser, por ejemplo, un aminodextrano polipéptido de al menos 50 restos de

aminoácidos. Se conocen en la materia varias técnicas para conjugar un medicamento u otro agente al polímero transportado. Se puede usar un transportador polipeptídico en lugar de aminodextrano, pero el transportador polipeptídico deberá tener al menos 50 restos de aminoácidos en la cadena, preferentemente 100-5000 restos de aminoácidos. Al menos parte de los aminoácidos deberían ser restos de lisina o restos de glutamato o aspartato. Las aminas colgantes de los restos de lisina y los carboxilatos colgantes de glutamina y aspartato son convenientes para enlazar un fármaco, toxina, inmunomodulador, quelante, adenda de boro u otro agente terapéutico. Los ejemplos de transportadores polipeptídicos incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, copolímeros de los mismos y polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para transferir propiedades de solubilidad deseadas sobre el transportador cargado resultante y el conjugado. Los ejemplos de agentes con los que se puede conjugar el anticuerpo incluyen cualesquiera de los agentes citotóxicos o quimioterapéuticos descritos en el presente documento.

Como alternativa, los anticuerpos conjugados se pueden preparar mediante conjugación directa de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico. El procedimiento general es análogo al método de conjugación indirecta salvo que un agente terapéutico se une directamente a un componente oxidado del anticuerpo. Por ejemplo, un resto de carbohidrato de un anticuerpo se puede unir al polietilenglicol para aumentar la semivida.

Como alternativa, un agente terapéutico se puede unir a la región de bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante la formación de un enlace disulfuro, o usando un reticulador heterobifuncionales, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP). Yu et al., *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). Las técnicas generales para dicha conjugación son bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). Se conocen en la técnica diversos agentes de acoplamiento de proteína bifuncional, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suerato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bioactivo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

Proteínas de fusión de anticuerpo

Los métodos de preparar proteínas de fusión de anticuerpo-toxina en las que una molécula recombinante comprende uno o más componentes de anticuerpo o un agente quimioterapéutico también son conocidos de los expertos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas de fusión anticuerpo-exotoxina A de *Pseudomonas* se han descrito en Chaudhary et al., *Nature* 339:394 (1989), Brinkmann et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:8616 (1991), Batra et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:5867 (1992), Friedman et al., *J. Immunol.* 150:3054 (1993), Wels et al., *Int. J. Can.* 60:137 (1995), Fominaya et al., *J. Biol. Chem.* 271:10560 (1996), Kuan et al., *Biochemistry* 35:2872 (1996) y Schmidt et al., *Int. J. Can.* 65:538 (1996). Las proteínas de fusión anticuerpo-toxina que contienen un resto de toxina diftérica se han descrito en Kreitman et al., *Leukemia* 7:553 (1993), Nicholls et al., *J. Biol. Chem.* 268:5302 (1993), Thompson et al., *J. Biol. Chem.* 270:28037 (1995), y Valleria et al., *Blood* 88:2342 (1996). Deonarain et al., *Tumor Targeting* 1:177 (1995), han descrito una proteína de fusión anticuerpo-toxina que tiene un resto ARNasaan, mientras que Linardou et al., *Cell Biophys.* 24-25:243 (1994), produjeron una proteína de fusión anticuerpo-toxina que comprende un componente de ADNasa I. La gelonina se ha usado como resto de toxina en la proteína de fusión anticuerpo-toxina de Wang et al., *Abstracts of the 209th ACS National Meeting*, Anaheim, Calif., 2-6 de abril de 1995, Parte 1, BIOT005. Como ejemplo adicional, Dohlsten et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:8945 (1994), notificaron una proteína de fusión anticuerpo-toxina que comprende la enterotoxina A estafilocócica.

Las toxinas ilustrativas que se utilizan adecuadamente en la preparación de dichas proteínas de fusión son ricino, abrina, ribonucleasa, ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antivirica de *Phytolacca americana*, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, y endotoxina de *Pseudomonas*. Véanse, por ejemplo, Pastan et al., *Cell* 47:641 (1986), y Goldenberg, *CA--A Cancer Journal for Clinicians* 44:43 (1994). Otras toxinas adecuadas son conocidas por los expertos en la materia.

Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden usar en ADEPT mediante conjugación del anticuerpo con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco activo contra el cáncer. Véanse, por ejemplo, el documento WO88/07378 y la patente de Estados Unidos n.º 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluyen cualquier enzima capaz de activarse con un profármaco en una forma tal que se convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en la presente divulgación incluyen, aunque no de forma limitativa, la fosfatasa alcalina útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; la arilsulfatasa útil para convertir los

profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; la citosina desaminasa útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en su fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles para convertir los profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir los profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como α -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; la β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como abzimas, se puede usar para convertir los profármacos de la divulgación en fármacos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar como se describe en el presente documento para administrar la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas anteriores se pueden unir covalentemente a los anticuerpos por técnicas bien conocidas en la materia tales como el uso de reactivos de reticulación heterobifuncionales anteriormente descritos. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la divulgación, unidas a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la divulgación, usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)).

20 Producción recombinante de anticuerpos

El ADN que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos). Habitualmente, esto requiere clonación del ADN o, preferentemente, del ARNm (es decir, el ADNc) que codifica los anticuerpos. La clonación y la secuenciación se llevan a cabo usando técnicas convencionales, tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press; Ausubel, et al. (Eds.), Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994)).

La secuenciación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véanse, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467). Al comparar la secuencia del ácido nucleico clonado con las secuencias publicadas de los genes de la inmunoglobulina humana y los ADNc, el experto en la técnica podrá determinar fácilmente, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso del segmento de la línea germinal en el polipéptido de la inmunoglobulina (incluyendo el isotipo de la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y ligera, incluyendo las secuencias que resultan de la adición de la región N y el proceso de mutación somática. Una fuente de información de la secuencia de los genes de la inmunoglobulina es el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras, tales como células E. coli, células COS de simio, células 293 de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293E), células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en la técnica.

En una realización alternativa, la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina de interés puede determinarse mediante secuenciación directa de la proteína. Se pueden diseñar secuencias de nucleótidos codificantes de acuerdo con la tabla de codones universal.

Para la producción recombinante de los anticuerpos, el ácido nucleico codificante se aísla e inserta en un vector replicable para su clonación posterior (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen en general, aunque no de forma limitativa, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores selectivos, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción, que son conocidos y se han descrito en la técnica.

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores del presente documento son las células procariotas, levaduras, o células de eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como Escherichia, por ejemplo, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, por ejemplo, Salmonella typhimurium, Serratia, por ejemplo, Serratia marcescans y Shigella, así como bacilos tales como B. subtilis y B. licheniformis (por ejemplo, B. licheniformis 41 P divulgada en el documento DD 266,710 publicado el 12 de abril de 1989), Pseudomonas tales como P. aeruginosa y Streptomyces. Un hospedador de clonación preferido de E. coli es E. coli 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como E. coli B, E. coli X1776

(ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más utilizado habitualmente entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, hospedadores de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado proceden de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles varias cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori* y dichos virus pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, especialmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, tabaco, lenteja de agua y otras células vegetales también pueden utilizarse como hospedadores.

Los ejemplos de líneas celulares de mamífero útiles son células de ovario de hámster chino, incluyendo células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, y células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, (Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, (Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervicouterino humanas (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MCR 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Además, los vectores novedosos y las líneas celulares con múltiples copias de unidades de transcripción separadas por un marcador selectivo son especialmente útiles y preferidas para la expresión de anticuerpos que se unen a la diana.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio, lo que incluye desde cultivos microbianos. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Better et al. (Science 240:1041-43, 1988; ICSU Short Reports 10:105 (1990); y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:457-461 (1993) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se han secretado en el espacio periplásmico de *E. coli*. [Véase también, (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)].

La composición de anticuerpo preparada a partir de células microbianas o de insecto puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía catiónica con hidroxipatito o cromatografía de intercambio aviar, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estiredivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE® en una resina de intercambio

aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Métodos de cribado

Una terapéutica eficaz depende de identificar agentes eficaces desprovistos de toxicidad significativa. Los anticuerpos se pueden cribar por su afinidad de unión según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de desplazamiento en gel, transferencias Western, ensayos de competición radiomarcados, cofraccionamiento por cromatografía, coprecipitación, reticulación, ELISA y similares, que se describen en, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (1999) John Wiley & Sons, NY.

Los métodos para evaluar la actividad biológica neutralizante de TGF β y los anticuerpos dirigidos contra TGF β son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 7.867.496. Los ejemplos de los bioensayos in vitro incluyen: (1) inducción de la formación de colonias de células NRK en agar blando en presencia de EGF (Roberts et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:5339-5343); (2) inducción de la diferenciación de células mesenquimales primitivas para expresar un fenotipo cartilaginoso (Seyedin et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:2267-2271); (3) inhibición de crecimiento de células epiteliales de pulmón MvLu mink (Danielpour et al. (1989) *J. Cell. Physiol.*, 138:79-86) y células de riñón de mono BBC-1 (Holley et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5989-5992); (4) inhibición de la mitogénesis de timocitos de ratón C3H/HeJ (Wrann et al. (1987) *EMBO J.*, 6:1633-1636); (5) inhibición de la diferenciación de mieloblastos de rata L6 (Florini et al. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261:16509-16513); (6) medida de la producción de fibronectina (Wrana et al. (1992) *Cell*, 71:1003-1014); (7) inducción del promotor del inhibidor del activador del plasminógeno I (PAI-1) fusionado a un gen indicador de la luciferasa (Abe et al. (1994) *Anal. Biochem.*, 216:276-284); (8) ensayo de inmunoadsorción en sándwich (Danielpour et al. (1989) *Growth Factors*, 2:61-71); y (9) ensayos celulares descritos en Singh et al. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13(24):4355-4359.

En algunas realizaciones, la neutralización de TGF β 1 y TGF β 2 mediante el anticuerpo es al menos 2-50 veces, 10-100 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces, o 20-50 %, 50-100 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más potente que la neutralización de TGF β 3.

En la técnica se conocen métodos adicionales para evaluar la actividad biológica y la neutralización de TGF β (por ejemplo, con anticuerpos de TGF β). Por ejemplo, la neutralización se puede medir con ensayos de neutralización y expresarse como un valor de CI50. El valor de CI50 se puede calcular para una molécula dada determinando la concentración de molécula necesaria para activar la semiinhibición de la respuesta biológica máxima de una segunda molécula o actividad celular. Cuanto menor sea la CI50, mayor será la potencia de la molécula para inhibir la actividad deseada de la proteína. Los ensayos de neutralización ilustrativos contemplados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, un ensayo de liberación de interleucina-11 y un ensayo de proliferación de células HT-2/IL-4. Además, se puede llevar a cabo un ensayo de actividad de TGF β para determinar si el anticuerpo inhibe preferentemente una isoforma de TGF β , incluyendo un ensayo de fosforilación de pSMAD o un ensayo de unión a rhLAP.

Los métodos para evaluar la actividad biológica neutralizante de los inhibidores de PD-1 y los anticuerpos dirigidos contra PD-1 son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la neutralización se puede medir con ensayos de neutralización y expresarse como un valor de CI50. El valor de CI50 se puede calcular para una molécula dada determinando la concentración de molécula necesaria para activar la semiinhibición de la respuesta biológica máxima de una segunda molécula o actividad celular. Cuanto menor sea la CI50, mayor será la potencia de la molécula para inhibir la actividad deseada de la proteína. Los ensayos de neutralización ilustrativos contemplados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, medir la capacidad de los anticuerpos de PD-1 para fomentar las respuestas de los linfocitos T en linfocitos T humanos, ensayo de liberación de IFN γ , o ensayo de secreción de interleucina-2 (Wang et al., *Cancer Immunol Res.*, 2(9): 846-56 (2014).

Terapia de Combinación

Un inhibidor de TGF β de la presente divulgación se administra con un segundo agente que inhibe PD-1 y la combinación es útil para tratar una enfermedad o trastorno como se describe en el presente documento. En el caso de usar anticuerpos para inhibir TGF β y PD-1, si más de un anticuerpo de TGF β o anticuerpo de PD-1 es eficaz para unirse a los respectivos antígenos diana, se contempla que dos o más anticuerpos contra diferentes epítomos del antígeno diana y/o que se unen preferentemente a diferentes isoformas de TGF β o PD-1 se pueden mezclar de tal forma que la combinación de anticuerpos, tres o cuatro o más conjuntamente, siguen proporcionando mayor eficacia contra una dolencia o trastorno a tratar con inhibidores de TGF β y PD-1. Las composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención se pueden administrar a personas o mamíferos que padecen, o tienen predisposición a padecer, una dolencia o trastorno asociado con el polipeptídico diana de uno cualquiera de TGF β o PD-1.

La administración concurrente de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma ruta, siempre que exista un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, como la administración en diferentes días o semanas.

También se puede usar un tercer agente con un inhibidor de TGF β y un inhibidor de PD-1. El tercer agente puede ser otro agentes terapéuticos, tales como citocinas, factores de crecimiento, otros inhibidores y anticuerpos dirigidos contra otros antígenos diana, por ejemplo ipilimumab (YERVOY®, Bristol-Myers Squibb Company), un anticuerpo contra CTLA-4; bevacizumab (AVASTIN®, Genentech), un anticuerpo contra VEGF-A; erlotinib (TARCEVA®, Genentech y OSI Pharmaceuticals), un inhibidor de tirosina quinasa que actúa sobre EGFR, dasatinib (SPRYCEL®, Bristol-Myers Squibb Company), un inhibidor de tirosina quinasa Bcr-Abl oral; IL-21; IFN- α 2b pegilado; axitinib (INLYTA®, Pfizer, Inc.), un inhibidor de tirosina quinasa; y trametinib (MEKINIST®, GlaxoSmithKline), un inhibidor de MEK (Philips y Atkins, Int Immunol., 27(1):39-46 (2015)).

Si el cáncer es positivo para la mutación V600, como es el caso de algunos cánceres, en particular en melanoma (Ascierto P et al., J Transl Med., 10: 85, 2012) también se contempla que el tercer agente sea un inhibidor de BRAF, por ejemplo vemurafenib o dabrafenib.

Se contempla que los inhibidores, tales como anticuerpos, de la presente divulgación se puedan administrar simultáneamente, en la misma formulación. Se contempla además que los inhibidores se administren en una formulación independiente y se administren concurrentemente, donde concurrentemente se refiere a agentes administrados con una diferencia de menos de 30 minutos entre sí. Se contempla además que el tercer agente se pueda administrar simultáneamente con los inhibidores.

En otro aspecto, se administra un inhibidor de TGF β o de PD-1 antes de la administración de la otra composición inhibidora. Administración anterior se refiere a la administración de un inhibidor comprendido en el intervalo de una semana antes del tratamiento con el otro inhibidor, hasta 30 minutos antes de la administración del otro inhibidor. Se contempla además que se administre un inhibidor después de la administración de otra composición de inhibidor. Se entiende que después de la administración describe la administración desde 30 minutos después del tratamiento con anticuerpos hasta una semana después de la administración de anticuerpos. Se contempla además que un tercer agente se pueda administrar de esta forma antes de bien el inhibidor de TGF β o bien el inhibidor de PD-1.

Se contempla además que se puedan administrar otras terapias coadyuvantes, cuando sea apropiado. Por ejemplo, el paciente también puede recibir terapia quirúrgica, quimioterapia, un agente citotóxico, terapia fotodinámica o radioterapia cuando sea apropiado.

Se contempla además que, cuando los inhibidores o anticuerpos del presente documento se administran junto con un tercer agente, tales como, por ejemplo, en donde el tercer agente es una citocina o factor de crecimiento o un agente quimioterapéutico, la administración también incluye el uso de un agente radioterapéutico o radioterapia. La radioterapia administrada junto con una composición de anticuerpo se administra según determine el médico a cargo del tratamiento, y a las dosis habitualmente administradas a los pacientes tratados de cáncer.

Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, 1131, 1125, Y90 y Re186), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o toxinas o fragmentos de la misma. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Un agente no citotóxico puede incluir un agente que se puede activar para que sea citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir una perla, liposoma, matriz o partícula (véase, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses 2003/0028071 y 2003/0032995). Dichos agentes pueden estar conjugados, acoplados, enlazados o asociados con un anticuerpo de acuerdo con la divulgación.

Los agentes quimioterapéuticos considerados para usar con los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, aunque no de forma limitativa, los relacionadas en la Tabla I:

Tabla I

Agentes alquilantes <u>Mostazas de nitrógeno</u> mecloretamina ciclofosfamida ifosfamida melfalán clorambucilo <u>Nitrosoureas</u> carmustina (BCNU) lomustina (CCNU) semustina (metil-CCNU)	Productos naturales <u>Fármacos antimitóticos</u> <u>Taxanos</u> paclitaxel alcaloides de vinca vinblastina (VLB) vincristina vinorelbina Taxotere® (docetaxel) estramustina
---	--

(continuación)

<u>Etilenimina/Metilmalamina</u> trietilenmelamina (TEM)trietilen tiosforamida (tiotepa) Hexametilmelamina (HMM, altretamina) <u>Sulfonatos de alquilo</u> Busulfano <u>Triazinas</u> dacarbazina (DTIC) <u>Antimetabolitos</u> <u>Análogos de ácido fólico</u> metotrexato Trimetrexato Pemetrexed (antiolato multidiana) <u>Análogos de pirimidina</u> 5-fluorouracilo fluorodesoxiuridina gemcitabina arabinósido de citosina (AraC, citarabina) 5-azacitidina 2,2'-difluorodesoxi-citidina <u>Análogos de purina</u> 6-mercaptapurina 6-tioguanina azatioprina 2'-desoxicoformicina (pentostatina) eritrohidroxinonil-adenina (EHNA) fosfato de fludarabina 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA) <u>Inhibidores de la topoisomerasa de tipo I</u> camptotecina topotecán irinotecán <u>Modificadores de la respuesta biológica</u> G-CSF GM-CSF <u>Agentes de diferenciación</u> derivados de ácido retinoico <u>Hormonas y antagonistas</u> <u>Adrenocorticosteroides/antagonistas</u> prednisona y equivalentes dexametasona ainoglutetimida <u>Progestinas</u> caproato de hidroxiprogesterona acetato de medroxiprogesterona megestrol acetato	estramustina fosfato <u>Epipodofilotoxinas</u> etopósido tenipósido <u>Antibióticos</u> actinomomicina D daunomicina (rubidomicina) doxorubicina (adriamicina) mitoxantroneidarrubicina bleomicina esplamicina (mitramicina) mitomicina C dactinomomicina afidicolina Enzimas L-asparaginasa L-arginasa <u>Radiosensibilizantes</u> metronidazol misonidazol desmetilmisonidazol pimonidazol etanidazol nimorazol RSU 1069 EO9 RB 6145 SR4233 nicotinamida 5-bromodeoxiuridina 5-yododesoxiuridina Bromodesoxicidina <u>Agentes diversos</u> Complejos de coordinación de platino cisplatino Carboplatino oxaliplatino Antracenodiona Mitoxantrona Urea sustituida Hidroxiurea <u>Derivados de metilhidrazina</u> N-metilhidrazina (MIH) procarbazona <u>Supresor suprarrenal</u> mitotano (o,p'-DDD) ainoglutetimida <u>Citocinas</u> interferón (α, β, γ) interleucina-2 <u>Fotosensibilizadores</u> derivados de hematoporfirina Photofrin® derivados de benzoporfirina Npe6 etioporfirina de estaño (SnET2)
--	--

(continuación)

Estrógenos dietilestilbestrol etinil estradiol/equivalentes	feborida-a bacterioclorofila-a naftalocianinas ftalocianinas ftalocianinas de cinc
Antiestrógeno Tamoxifeno	<u>Radiación</u> rayos X luz ultravioleta radiación gamma luz visible radiación infrarroja radiación de microondas
Andrógenos propionato de testosterona fluoximesterona/equivalentes	
<u>Antiandrógenos</u> flutamida análogos de la hormona liberadora de gonadotropina	
leuprolida	
<u>Antiandrógenos no esteroideos</u> flutamida	

Tratamiento de trastornos

En otra realización, cualquiera de los tipos de inhibidores descritos en el presente documento se pueden usar en los métodos. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo específico de diana es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En otra realización ilustrativa, la diana es humana y el paciente es un paciente humano. Como alternativa, el paciente puede ser un mamífero que expresa una proteína diana con la que reacciona de forma cruzada el anticuerpo específico de diana. El anticuerpo se puede administrar a un mamífero no humano que expresa una proteína diana con la que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (es decir, un primate) con fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. Dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos específicos de diana de la divulgación (Huang y Balmain, Cold Spring Harb Perspect Med., 4(9):a013623, 2014).

En una realización, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer o para prevenir la recurrencia de un cáncer que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de TGF β y un inhibidor de PD-1 o una composición farmacéutica que comprende uno o ambos de los inhibidores que se describen en el presente documento.

Las dolencias o trastornos ilustrativos que se pueden tratar con inhibidores de TGF β y de PD-1 (por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación) incluyen cánceres, tales como cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas metastásico, adenocarcinoma de páncreas metastásico, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma, glioma maligno, glioma pontino difuso intrínseco, neoplasia cerebral infantil recurrente, carcinoma de células renales, carcinoma de células renales metastásico de células claras, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, cáncer de próstata en estadio IV, melanoma metastásico, melanoma, melanoma maligno, melanoma cutáneo recurrente, melanoma con metástasis cerebral, melanoma cutáneo en estadio IIIA; melanoma cutáneo en estadio IIIB, melanoma cutáneo en estadio IIIC; melanoma cutáneo en estadio IV, melanoma maligno de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer escamocelular de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de mama metastásico recurrente, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular, linfoma no Hodgkin, LNH de linfocitos B avanzado, LH incluyendo linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda del adulto en remisión; leucemia mieloide aguda del adulto con Inv(16)(p13.1q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1; leucemia mieloide aguda del adulto con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL; leucemia promielocítica aguda del adulto con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA; leucemia mieloide aguda relacionada con agentes alquilantes, leucemia linfocítica crónica, síndrome de Richter; macroglobulinemia de Waldenström, glioblastoma del adulto; gliosarcoma del adulto, glioblastoma recurrente, rabdomiosarcoma infantil recurrente, sarcoma de Ewing recurrente/tumor neuroectodérmico primitivo periférico, neuroblastoma recurrente; osteosarcoma recurrente, cáncer colorrectal, cáncer colorrectal positivo para MSI; cáncer colorrectal negativo para MSI, carcinoma nasofaríngeo no queratinizante; carcinoma nasofaríngeo no diferenciado recurrente, adenocarcinoma de cuello de útero; carcinoma adenoescamoso de cuello de útero; carcinoma escamocelular de cuello de útero; carcinoma de cuello de útero recurrente; cáncer de útero en estadio IVA; cáncer de útero en estadio IVB, carcinoma escamocelular del canal anal; carcinoma del canal anal metastásico; carcinoma del canal anal recurrente, cáncer de cabeza y cuello recurrente; carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma de ovario, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer GI avanzado, adenocarcinoma gástrico; adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, neoplasias de hueso, sarcoma de tejidos blandos; sarcoma óseo,

carcinoma tímico, carcinoma urotelial, carcinoma de células de Merkel recurrente; carcinoma de células de Merkel en estadio III; carcinoma de células de Merkel en estadio IV, síndrome mielodisplásico y micosis fungoides recurrente y síndrome de Sezary.

Los cánceres ilustrativos que se pueden tratar con la combinación de anticuerpos de acuerdo con la presente invención incluyen cánceres, tales como adenocarcinoma de pulmón, adenoma mucinoso, carcinoma ductal del páncreas y carcinoma colorrectal, glioma cerebral de grado menor, carcinoma invasivo de mama, glioblastoma multiforme, melanoma, tiroides, adenocarcinoma de recto, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de hígado, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de esófago, carcinoma endometrioide del cuerpo uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer oral, cáncer de intestino grueso y linfoma.

Se ha observado que muchos tumores humanos (deMartin et al., EMBO J., 6: 3673 (1987), Kuppner et al., Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)) y muchas líneas de células tumorales (Derynck et al., Cancer Res., 47: 707 (1987), Roberts et al., Br. J. Cancer, 57: 594 (1988)) producen TGF β y sugiere un posible mecanismo para que dichos tumores eviten la vigilancia inmunitaria normal.

La expresión de las isoformas de la TGF β en el cáncer es compleja y variable, donde diferentes combinaciones de isoformas de TGF β tienen diferentes papeles en cánceres concretos. Las moléculas de TGF β pueden actuar como supresores tumorales y como promotores tumorales. Por ejemplo, la delección o regulación defectiva de la señalización de TGF β en animales puede dar como resultado un aumento en cáncer de mama, cáncer de intestino, cáncer de páncreas, cáncer de colon y carcinoma escamocelular, lo que indica que la presencia de TGF β es importante para prevenir o ralentizar la progresión tumoral (Yang et al., Trends Immunol 31:220-27, 2010). Sin embargo, se sabe que la expresión en exceso de TGF β es prooncogénica, y se detecta un aumento de la expresión en muchos tipos de tumores (Yang et al., más arriba).

Complejidades adicionales también se divulgan en la patente de los Estados Unidos 7.927.593. Por ejemplo, diferentes isoformas de TGF β parecen ser más relevantes para diferentes tipos de cánceres. TGF β 1 y TGF β 3 pueden desempeñar un mayor papel en el cáncer de ovario y en su progresión que TGF β 2; mientras que la expresión de TGF β 1 y TGF β 2 es mayor en tumores de tipo condrosarcoma de grado superior que TGF β 3. En el cáncer de mama humano, TGF β 1 y TGF β 3 se expresan intensamente, donde la expresión de TGF β 3 se correlaciona con la supervivencia global, mientras que las pacientes con metástasis ganglionar y expresión positiva para TGF β 3 tienen mal resultado pronóstico. Sin embargo, en el cáncer de colon, TGF β 1 y TGF β 2 se expresan más intensamente que TGF β 3 y están presentes en niveles en circulación más altos que en individuos sin cáncer. En gliomas, TGF β 2 es importante para la migración de las células.

Se cree que la infiltración de células inmunitarias en los sitios del tumor es un factor que contribuye al crecimiento del tumor. Estos infiltrados de células inmunitarias tienen un efecto beneficioso, ayudando a limpiar el tumor, pero también tienen un efecto perjudicial ya que habilitan la tolerancia a los antígenos tumorales. Se ha comprobado que TGF β puede afectar los niveles de células inmunitarias en los tumores (véanse, por ejemplo, Yang et al., Trends Immunol 31:220-27, 2010; Flavell et al., Nature Immunol 10:554-567, 2010; Nagarau et al., Expert Opin Investig Drugs 19:77-91, 2010). Por ejemplo, TGF β suprime los linfocitos citolíticos naturales que se infiltran en los tumores para eliminar los tumores del cuerpo. TGF β también suprime la actividad de los linfocitos T citotóxicos y de los linfocitos T auxiliares CD4+, los tipos de células que ayudan a la eliminación de tumores (Yang, más arriba). TGF β también tiene un papel en la regulación de la actividad de las células dendríticas, por ejemplo, inhibiendo la migración hacia los sitios de lesión y presentación del antígeno para fomentar una respuesta inmunitaria. Las células dendríticas son sensibles a TGF β y al mismo tiempo secretan TGF β . Por ejemplo, las células dendríticas se infiltran en los tumores y capturan las células, secretan TGF β y activan los linfocitos T reguladores, lo que a su vez puede evitar el aclaramiento del tumor (Flavell et al., más arriba). Adicionalmente, las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) son células derivadas de la médula ósea que se expanden durante la progresión tumoral. Las MDSC inhiben la proliferación de los linfocitos T, suprimen la maduración de células dendríticas, e inhiben la actividad de los linfocitos citolíticos naturales, ayudando de esta forma a las células a evitar la respuesta inmunitaria (Li et al., J Immunol. 182:240-49, 2009). Se ha comprobado que TGF β contribuye a los efectos de las MDSC sobre la inhibición de la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (Li et al., más arriba; Xiang et al., Int J Cancer 124:2621-33, 2009). El papel de las distintas isoformas de TGF β en cada uno de estos procesos inmunitarios aún no se ha resuelto. El direccionamiento selectivo de isoformas de TGF β y su inhibición en diversos grados puede ser un instrumento para modular la respuesta inmunitaria del hospedador para combatir y eliminar el tumor.

Se contempla que los métodos del presente documento reduzcan el tamaño del tumor o la carga tumoral en el sujeto, y/o reducir la metástasis en el sujeto. En diversas realizaciones, los métodos reducen el tamaño del tumor en un 10 %, 20 %, 30 % o más. En diversas realizaciones, los métodos reducen el tamaño del tumor en un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100%.

Se contempla que los métodos del presente documento reduzcan la carga tumoral, y también reducir o prevenir la recurrencia de los tumores una vez que el cáncer ha entrado en remisión.

En diversas realizaciones, el anticuerpo de TGF β y/o el anticuerpo de PD-1 y combinaciones o composiciones de los

5 mismos descritos en el presente documento modulan las células inmunitarias en un tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo de TGFβ y/o el anticuerpo de PD-1 y combinaciones o composiciones de los mismos del presente documento aumenta el número de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un tumor y/o aumenta la actividad citolítica de los linfocitos NK. En diversas realizaciones, los anticuerpos o composiciones descritos en el presente documento

disminuyen el número de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhiben la función de los linfocitos T reguladores. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los anticuerpos o composiciones descritos en el presente documento inhiben la capacidad de los Tregs para regular defectivamente una respuesta inmunitaria o migra hacia un sitio de una respuesta inmunitaria.

10 En diversas realizaciones, el anticuerpo de TGFβ y/o el anticuerpo de PD-1 y combinaciones o composiciones de los mismos del presente documento aumenta el número de linfocitos T citotóxicos en un tumor, y/o aumenta la actividad de los CTL, por ejemplo, refuerza, aumenta o fomenta la actividad de los CTL. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los anticuerpos o composiciones descritos en el presente documento aumentan la producción de perforina y granzima por los CTL, y aumentan la actividad citolítica de los CTL.

15 En diversas realizaciones, el, el anticuerpo de TGFβ y/o el anticuerpo de PD-1 y combinaciones o composiciones de los mismos descritos en el presente documento aumentan el número de células dendríticas (DC) en un tumor, y/o inhibe la función tolerogénica (por ejemplo, el efecto tolerogénico) de las células dendríticas. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los anticuerpos o composiciones descritos en el presente documento disminuyendo el efecto tolerogénico de las células dendríticas CD8+.

20 En diversas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos de TGFβ, XPA.42.068, XPA.42.089 o XPA.42.681 o variantes de los mismos que se describen en el presente documento modulan una o más de las actividades inmunitarias anteriormente descritas.

25 En una realización, el tratamiento de un cáncer en un animal que necesita dicho tratamiento, comprende administrar al animal una cantidad eficaz de un inhibidor de TGFβ y un inhibidor de PD-1 o de una composición que comprende un inhibidor descrito en el presente documento. Se contempla que los inhibidores sean un anticuerpo de TGFβ y un anticuerpo de PD-1.

30 Las dolencias que se pueden tratar con los métodos de la presente divulgación aparecen principalmente en mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos y otros primates, así como mascotas o animales de compañía tales como perros y gatos, animales de laboratorio tales como ratas, ratones y conejos, y animales de granja tales como caballos, cerdos, ovejas y ganado vacuno.

35 **Formulación de composiciones farmacéuticas**

40 Para administrar inhibidores, por ejemplo, anticuerpos, de la presente divulgación a seres humanos o animales de ensayo, es preferible formular los inhibidores en una composición que comprende uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, u otras reacciones alérgicas cuando se administran usando rutas bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. "Transportadores farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción clínicamente útiles, y similares.

45 Además, los compuestos pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos comunes. Se contemplan también dichos solvatos.

50 Los inhibidores se administran mediante cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Además, los inhibidores se administran de forma adecuada mediante infusión de pulsos, particularmente con dosis del anticuerpo que van disminuyendo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la

55 administración es breve o crónica. Se contemplan otros métodos de administración, incluyendo la administración tópica, particularmente la administración transdérmica, transmucosal, rectal, oral o local, por ejemplo mediante un catéter colocado próximo al sitio deseado.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que contienen los inhibidores descritos en el presente documento como un principio activo pueden contener transportadores o aditivos farmacéuticamente aceptables dependiendo de la ruta de administración. Los ejemplos de dichos transportadores o aditivos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetil almidón de sodio, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, gelatina, agar, diglicerina, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un tensioactivo farmacéuticamente aceptable y similares. los aditivos usados se

seleccionan entre, aunque no de forma limitativa, los anteriores o sus combinaciones, según sea adecuado, dependiendo de la forma farmacéutica de la presente divulgación.

La formulación de la composición farmacéutica variará de acuerdo con la ruta de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión). Una composición adecuada que comprende el inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo, que se va a administrar, se puede preparar en un vehículo o transportador fisiológicamente aceptable. Para soluciones o emulsiones, Los transportadores adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o fluido, nutrientes regeneradores de electrolitos.

Varios transportadores acuosos, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato estéril, agua bacteriostática, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, y similares, y pueden incluir otras proteínas para la estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc., sometidas a modificaciones químicas leves o similares.

Las formulaciones terapéuticas de los inhibidores se preparan para el almacenamiento mezclando el inhibidor que tiene el grado deseado de pureza con transportadores fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes ("Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera conveniente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, una microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y una microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las suspensiones acuosas pueden contener el compuesto activo en premezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietilenado, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán polietilenado. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un transportador adecuado antes del uso. Esta técnica ha mostrado ser eficaz con inmunoglobulinas convencionales. Se pueden emplear cualesquiera técnicas de liofilización y reconstitución adecuadas. Se apreciará por los expertos en la materia que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse para compensar.

Los anticuerpos de TGF β y PD-1 descritos en el presente documento pueden prepararse y administrarse como una formulación simultánea. En un aspecto, al menos dos de los anticuerpos reconocen y se unen a diferentes antígenos. En otro aspecto, al menos dos de la pluralidad de anticuerpos pueden reconocer específicamente y unirse a diferentes epítopos del mismo antígeno.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el compuesto activo en premezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados se ilustran por aquellos que se han mencionado ya anteriormente.

La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,5 %, normalmente a o al menos aproximadamente 1 %, hasta tanto como un 15 o 20 % en peso y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por lo tanto, una composición farmacéutica típica para la inyección parenteral podría prepararse para contener 1 ml de agua tamponada estéril, y 50 mg de anticuerpo. Una composición típica para la infusión intravenosa podría prepararse para contener 250 ml de solución de Ringer estéril, y 150 mg de anticuerpo. Los métodos reales para preparar composiciones parenteralmente administrables se conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Una dosificación eficaz del anticuerpo está comprendida en el intervalo de 0,01 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación acuosa inyectable estéril, una suspensión oleaginosa, dispersiones o polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butano diol. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil suave, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico, encuentran uso en la preparación de los inyectables.

En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, también será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede obtenerse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden formular composiciones útiles para la administración con potenciadores de la captación o la absorción para aumentar su eficacia. Dichos potenciadores incluyen por ejemplo, salicilato, glicocolato/linoleato, glicolato, aprotinina, bacitracina, SDS, caprato y similares. Véanse, por ejemplo, Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285 (1996)) y Oliyai y Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544 (1993)).

Las composiciones de anticuerpos contempladas para el uso inhiben la actividad de la diana, Incluyendo la unión de la diana a su receptor o ligando homólogo, la señalización mediada por diana, y similares. En particular, las composiciones presentan propiedades inhibitorias a concentraciones que están sustancialmente exentas de efectos secundarios, y son por tanto útiles para protocolos de tratamiento prolongados. Por ejemplo, la administración simultánea de una composición de anticuerpo con otra, más tóxica, un agente citotóxico puede conseguir una inhibición beneficiosa de una dolencia o trastorno que se está tratando, reduciendo a la vez eficazmente los efectos secundarios tóxicos en el paciente.

Además, las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las composiciones contempladas para su uso en la presente divulgación están bien equilibradas, potenciando por tanto su utilidad para los usos *in vitro* y especialmente *in vivo*, mientras que otras composiciones que carecen de dicho equilibrio tienen sustancialmente menos utilidad. Específicamente, las composiciones contempladas para usar en la divulgación tienen un grado adecuado de solubilidad en medio acuoso que permite la absorción y la biodisponibilidad en el cuerpo, teniendo a la vez también un grado de solubilidad en lípidos que permite a los compuestos atravesar la membrana celular hasta un posible sitio de acción. Por lo tanto, las composiciones de anticuerpos contempladas son máximamente eficaces cuando se administran en el sitio de actividad del antígeno diana.

Administración y dosificación

En un aspecto, los métodos de la presente divulgación incluyen una etapa de administrar una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición estéril.

Los métodos de la presente divulgación se llevan a cabo usando cualquier medio aceptado médicamente para introducir sustancias terapéuticas directa o indirectamente en un sujeto mamífero, incluyendo, aunque de forma no limitativa, inyecciones, ingestión oral, intranasal, tópica, transdérmica, parenteral, aerosoles de inhalación, administración vaginal o administración rectal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares e intracisternales, así como catéteres o técnicas de infusión. También se contempla la administración mediante inyección intradérmica, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implante quirúrgico en un sitio concreto.

En una realización, la administración se realiza en el sitio de un cáncer o el tejido afectado que necesita tratamiento mediante inyección directa en el sitio o con un mecanismo de administración sostenida o de liberación sostenida, que pueda administrar la formulación internamente. Por ejemplo, microesferas o cápsulas biodegradables u otras configuraciones poliméricas biodegradables capaces de la administración sostenida de una composición (por ejemplo, un polipéptido soluble, anticuerpo, o molécula pequeña) se pueden incluir en las formulaciones de la divulgación implantadas cerca o en el sitio del cáncer.

También se pueden administrar composiciones terapéuticas al paciente en múltiples sitios.

Las administraciones múltiples pueden realizarse simultáneamente o pueden administrarse durante un periodo de tiempo. En determinados casos, es beneficioso proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. Se puede administrar terapia adicional periódicamente, por ejemplo, cada hora, diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, o en un intervalo más prolongado.

En la presente divulgación también se contempla la administración de múltiples agentes, tales como las composiciones de anticuerpos junto con un tercer agente, como se describe en el presente documento, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un agente quimioterapéutico.

Las cantidades de inhibidor o composición de anticuerpo en una dosificación dada pueden variar de acuerdo con el tamaño del individuo al cual se está administrando la terapia así como las características del trastorno que se está tratando. En tratamientos ilustrativos, puede ser necesario administrar aproximadamente 1 mg/día, 5 mg/día, 10 mg/día, 20 mg/día, 50 mg/día, 75 mg/día, 100 mg/día, 150 mg/día, 200 mg/día, 250 mg/día, 500 mg/día o 1000 mg/día. Estas concentraciones se pueden administrar en una sola forma farmacéutica o como múltiples dosis. Los estudios convencionales de respuesta a la dosis, primero en modelos animales y a continuación en ensayo clínico, desvelan dosificaciones óptimas para patologías y poblaciones de pacientes concretas.

En la presente divulgación también se contempla, que las cantidades de inhibidor de TGF β y de inhibidor de PD-1 en una dosificación dada pueden variar de acuerdo con el tamaño del individuo al cual se está administrando la terapia así como las características del trastorno que se está tratando. Ambas composiciones de inhibidor se pueden administrar en un intervalo de dosificación de 0,1 a 15 mg en infusión intravenosa durante 30-60 minutos cada 1-4 semanas hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. En diversas realizaciones, la dosis puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/kg.

También será evidente que puede modificarse la dosificación si se administran sustancias terapéuticas tradicionales junto con las sustancias terapéuticas de la divulgación.

Kits

Como aspecto adicional, la divulgación incluye kits que comprenden uno o más compuestos o composiciones envasadas de una manera que facilita su uso para practicar los métodos de la divulgación. En una realización, dicho kit incluye un compuesto o composición descrito en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo específico de diana solo o junto con otro anticuerpo o un tercer agente), envasado en un recipiente tal como un frasco o recipiente precintado, con una etiqueta pegada al envase o incluida en el acondicionamiento que describa el uso del compuesto o composición en la práctica del método. Preferentemente, el compuesto o la composición se acondiciona en una forma farmacéutica unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica o para la práctica de un ensayo de cribado. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de las composiciones inhibitorias.

Aspectos y detalles adicionales de la divulgación serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que se pretende que sean ilustrativos en lugar de limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Terapia de combinación con inhibidores de TGF β y PD-1 del carcinoma escamocelular cutáneo químicamente inducido (cSCC).

5 Para demostrar el efecto de la terapia combinada con inhibidores de TGF β y PD-1, ratones FVB se inyectaron por vía subcutánea con la línea tumoral 168 de cSCC activada por KrasG13C químicamente inducida (cultivada mediante ≤ 2 pases *in vitro*). Cuando los tumores alcanzaron ~ 3 -5 mm de diámetro (aproximadamente 2-3 semanas después del implante), los ratones se trataron bien con anticuerpo anti-PD-1 (α -PD-1) solo (250 μ g, Clon: RMP1-14, n.º de cat.: BE0146, BioXCell), anticuerpo pan-específico de α -TGF β 1,2,3 (anti-TGF β) (200 μ g) solo o anticuerpos de α -PD-1 y

10 pan-específico de α -TGF β 1,2,3 combinados mediante inyección intraperitoneal (i.p.), tres tratamientos en intervalos de 4 días (ratones inyectados en el día 0, el día 4 y el día 8, n=7 por brazo). Se midieron posteriormente los tamaños de los tumores usando un calibre. La monoterapia con α -PD-1 inhibió el crecimiento del tumor en comparación con los ratones del control pero la regresión del tumor no se sostuvo después de 12-14 días. A diferencia de la monoterapia con α -PD-1, la monoterapia con α -TGF β mostró una actividad sólida y sostenida (> 12 -14 días). Aunque ambas

15 monoterapias con α -PD-1 y α -TGF β indujeron la regresión del tumor en comparación con los correspondientes ratones tratados con el control de IgG, el efecto combinado de α -PD-1 y α -TGF β en promedio fue mayor que el de cualquier reactivo por separado (Figura 1A, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$). Se separaron los tumores en progresores o resistentes ('res') con α -PD-1, respondedores o sensibles ('sens') con α -PD-1, respondedores con α -TGF β (TGFb) y respondedores a la combinación de α -PD-1/ α -TGF β (PD-1 TGFb). Se midieron los niveles de marcadores de células

20 inmunitarias en estos tumores como porcentaje de células vivas y como porcentaje de linfocitos CD45+ para evaluar los cambios en poblaciones de células inmunoinfiltrantes de tumores en respuesta al fármaco. CD45+, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores (Treg), linfocitos T CD4+ y CD8+ se midieron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) en 2-3 tumores por cohorte en el día 8, después del tercer tratamiento con inhibidores (Figura 1B y 1C). Se utilizaron cantidades elevadas de células CD8+ como biomarcador de la sensibilidad

25 al inhibidor de α -TGF β y α -PD-1.

Ejemplo 2. Respuestas diferenciales de tumores individuales a la inmunoterapia.

Los datos de la Figura 1 se segregaron entre "respondedores y "progresores" para demostrar la gama de respuestas a la inmunoterapia con α -PD-1 y α -TGF β (Figura 2). En el caso de la monoterapia con α -TGF β y la terapia combinada con α -PD1 y α -TGF β , se observó la regresión del tumor implantado en 3 de los 7 ratones tratados. Además, con el tratamiento combinado de α -PD1 y α -TGF β , se observó la regresión completa del tumor en ~ 50 % casos, sin

30 recrescimiento adicional del tumor cuatro semanas después de la dosificación sin dosis de fármaco adicionales (es decir, una reducción sostenida en el tamaño del tumor).

Estos resultados muestran que la combinación del anticuerpo de α -TGF β y el anticuerpo de α -PD-1 es más eficaz que el tratamiento con un único anticuerpo en el fomento de la regresión del tumor y, de forma sorprendente, en la

35 prevención de la recurrencia del cáncer.

Ejemplo 3. Reducción en el tamaño del tumor con una terapia combinada de α -TGF β / α -PD-1 en ratones con carcinoma escamocelular cutáneo (cSCC) químicamente inducido (DMBA-TPA).

Además del uso de modelos de aloinjerto, los efectos antitumorales de la terapia combinada con α -TGF β 1,2,3 α -TGF β α -PD-1 pan-específicos se evaluaron también usando modelos de carcinogénesis directa químicamente inducida en piel de ratón. Se han caracterizado bien los modelos de cSCC inducidos por DMBA-TPA (12-Otetradecanoil-forbol-13-acetato) (Balmain A et al., Princess Takamatsu Symp., 22:97-108, 1991; Burns PA et al., Oncogene, 6(12):2363-9, 1991; Yuspa SH et al., Dermatol Symp Proc., 1(2):147-50, 1996; Frame S et al., Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 353(1370):839-45, 1998) y se han usado ampliamente para identificar mecanismos genéticos y moleculares del inicio y progresión del cáncer que no habrían sido posibles mediante el estudio del cáncer humano o modelos más simples,

45 tales como aloinjertos de tumores. El modelo se inicia por la mutación mediante DMBA del codón 61 de Hras en > 90 % de tumores en ratones silvestres (Quintanilla M et al., Nature, 322(6074): 78-80, 1986). Múltiples tratamientos bimensuales posteriores con el promotor del tumor, TPA, estimulan el recrescimiento de los papilomas premalignos benignos. Una proporción de papilomas progresan a carcinomas durante un periodo de 4-12 meses y, en algunos casos, a tumores en forma de huso muy invasivos que han perdido muchas de las características de su célula epitelial.

Usando una cepa indicadora de bioluminiscencia en ratones con la luciferasa desactivada (p16(LUC)), se midió el crecimiento de los cSCC químicamente inducidos anteriores y, a continuación, después del tratamiento de los ratones con una combinación de anticuerpos de α -PD1 y anticuerpos de α -TGF β . Los ratones p16-LUC indican la expresión del gen p16(INK4a), un supresor tumoral en células tumorales activadas por Ras. El indicador se activa por eventos

50 neoplásicos tempranos, lo que permite la visualización de los tumores y la medición del tamaño del tumor usando un sistema óptico de obtención de imágenes IVIS.

Los tumores se iniciaron tratando tópicamente 3 ratones con DMBA dos veces en la primera semana y TPA durante las siguientes 20 semanas con recrescimiento del carcinoma observado a las ~ 30 semanas. Se llevó a cabo la resección quirúrgica a las 32 semanas tras el inicio del tumor con el tratamiento con DMBA. Se obtuvieron imágenes de los

65 ratones y se midieron los tamaños tumorales 5 veces (resección previa a la cirugía: en la semana 0 y tras la resección

quirúrgica: en las semanas 8, 12, 21 y 27).

Quando todos los ratones tuvieron carcinomas de aproximadamente 15 mm y pequeñas metástasis en el pulmón (3x3 mm), se resecaron los carcinomas y se trataron los ratones con anticuerpo de α -PD-1 (250 μ g, Clon: RMP1-14, BioXCell) y anticuerpo de α -TGF β (200 μ g) combinados mediante inyección intraperitoneal (i.p.), tres tratamientos en intervalos de 4 días (ratones inyectados en el día 8, el día 12 y el día 16, n = 3). Los tamaños tumorales se midieron posteriormente usando formador de imágenes mediante luminiscencia. Los tratamientos con los anticuerpos α -PD-1 y α -TGF β combinados dieron como resultado la regresión del tumor en los 3 ratones.

Los carcinomas que se resecaron de los ratones se inmunotiparon para determinar los marcadores de linfocitos CD45+, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T reguladores (Treg), linfocitos T CD4+ y CD8+ medidos por FACS en tumores tras el tercer tratamiento con inhibidores. Se separaron los tumores en progresores con α -PD-1, respondedores con α -PD-1, respondedores con α -TGF β y respondedores a la combinación de α -PD-1/ α -TGF β . Se midieron los niveles de marcadores de células inmunitarias en estos tumores como porcentaje de células vivas y como porcentaje de linfocitos CD45+ para evaluar los cambios en poblaciones de células inmunoinfiltrantes de tumores en respuesta al fármaco (Figura 4). Los tumores que respondieron al tratamiento con α -PD-1 solo, α -TGF β solo y α -PD-1/ α -TGF β combinados mostraron niveles significativamente aumentados de linfocitos T CD4+ y CD8+, mostrando los tumores sensibles a la combinación α -PD-1/ α -TGF β niveles incluso mayores de subconjuntos de linfocitos T CD4+. Además, los tumores sensibles a α -TGF β solo y la combinación α -PD-1/ α -TGF β mostraron linfocitos T efectores (Teff) CD8+/ linfocitos T reguladores (Treg) CD45+. Se utilizaron cantidades elevadas de linfocitos T CD8+ como biomarcador de la sensibilidad al inhibidor de α -TGF β y α -PD-1.

Ejemplo 4. Tumores SCC activados por *Kras* químicamente inducidos con la mayor carga mutacional responden a la monoterapia con α -PD1 y α -TGF β y al tratamiento combinado.

Se evaluaron la monoterapia con inhibidores de TGF β y PD-1 y la terapia combinada usando líneas de células cSCC activadas por *Kras* iniciadas genéticamente (GEMM) frente a las activadas por (DMBA/TPA) *Kras* y *Hras* inducidas químicamente en ratones singénicos. Las líneas de células tumorales inducidas químicamente poseen a menudo más mutaciones que las líneas celulares inducidas genéticamente. Estas mayores cantidades de mutaciones, son más parecidas a las cantidades de mutaciones en tumores humanos (Westcott PW et al., Nature, 517: 489-92, 2015). Las siguientes líneas de células químicamente inducidas: FVB-62, FVB-85, FVB-166, FVB-168, FVB-169 se compararon con los siguientes modelos de cSCC iniciado por GEMM activado por *Kras*: FVB-1425, FVB-1428, usando los métodos descritos en el ejemplo 1, párrafo [281] con ratones tratados dos veces por monoterapia con α -PD1, monoterapia con α -TGF β o anticuerpos de α -PD-1 y α -TGF β combinados (o los anticuerpos del control) una vez en el día 0 y una vez en el día 4 seguido por inmunotipado del tumor en los días 6-10. Los resultados de estos experimentos mostraron que solo los tumores SCC activados por *Kras* químicamente inducidos que contienen la mayor carga mutacional (es decir, la mayor cantidad de mutaciones por MB, que son más representativos de los tumores humanos) respondieron a la monoterapia y la terapia combinada de α -TGF β 1,2,3 y α -PD1 pan-específica (Figura 5). Las líneas de células tumorales inducidas químicamente sensibles al tratamiento fueron FVB-168 y FVB-169 con mutaciones *Kras*G13R.

Usando la línea de células FVB-168 de tumores SCC químicamente inducida, se evaluó la respuesta a la monoterapia y al tratamiento combinado pan-específico con α -TGF β 1,2,3 y α -PD1 midiendo la reducción en carcinomas y se expresó como respuesta parcial, respuesta completa o enfermedad progresiva (Figura 6A, datos de dos experimentos independientes). La monoterapia pan-específica con α -TGF β 1,2,3 y α -PD1 inhibió la progresión de la enfermedad en ~40-50 %. No se observaron diferencias significativas en la enfermedad entre cualquiera de las terapias en solitario. Sin embargo, se ha descubierto que la terapia combinada pan-específica con α -TGF β 1,2,3 y α -PD1 era significativamente más eficaz para inhibir la progresión de la enfermedad en comparación con cualquier monoterapia pan-específica con α -TGF β 1,2,3 o α -PD1. La terapia combinada pan-específica con α -TGF β 1,2,3 y α -PD1 dio como resultado una reducción de -90 % en la progresión de la enfermedad en comparación con los animales del control y se asoció con una mejor supervivencia global (Figura 6B).

Se separaron los tumores en carcinomas que progresaban (es decir, tumores que continuaban creciendo) o carcinomas que respondían (es decir, crecimiento tumoral inhibido por la terapia). Se midieron los niveles de marcadores de células inmunitarias en estos tumores como porcentaje de linfocitos CD45+ para evaluar los cambios en poblaciones de células inmunoinfiltrantes de tumores en respuesta al fármaco. Los linfocitos CD8+ efectores (T_{eff}), los linfocitos T CD4+ efectores (T_{eff}), los linfocitos CD4+ reguladores (T_{reg}) y la proporción de T_{eff}/T_{reg} se midieron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) en tumores por cohorte entre los días 6-10 después del tratamiento con monoterapia de α -PD1, monoterapia pan-específica de α -TGF β 1,2,3 o la combinación de α -PD-1 y α -TGF β 1,2,3 pan específicos (o los anticuerpos del control). La inhibición de α -TGF β y α -PD-1 dio como resultado la expansión de los linfocitos T efectores CD8+ y CD4+ (Figura 6C).

Estos resultados muestran que los tumores que tienen características similares a los tumores humanos son muy sensibles al tratamiento con una combinación de inhibidores de TGF β y PD-1 y que la terapia combinada reduce la progresión global de la enfermedad. La terapia combinada con inhibidor de TGF β /PD-1 cambia el perfil inmunitario de las células en los tumores a una proporción más favorable entre linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores (T_{eff}/T_{reg}).

Ejemplo 5. Comparación de anticuerpos específicos de TGFβ1,2 y pan-específicos de TGFβ1,2,3 y terapia combinada con α-PD-1 en un modelo de aloinjerto tumoral.

- 5 Para comparar los efectos de los anticuerpos que bloquean TGFβ1,2 y 3 con los que bloquean solo TGFβ1,2, tanto en monoterapia o como terapia combinada con un inhibidor de PD-1, se evaluaron los anticuerpos pan-específicos de α-TGFβ1,2,3 y específicos de TGFβ1,2 en un modelo de aloinjerto de SCC activado por Kras.

- 10 Se inyectaron por vía subcutánea ratones FVB (n=70) con la línea tumoral cSCC, Hras168 (1,25 x 10⁴ células). Una vez que los tumores fueron palpables (~0,5 cm de diámetro, ~2 semanas después del implante), los ratones se clasificaron en seis grupos experimentales (n=9-10 por grupo) que contenían ratones de peso corporal y tamaño tumoral similares. Los ratones se trataron con tres dosis consecutivas en el día 0, día 4 y día 8, con 200 µg por dosis tanto de α-TGFβ1,2,3 o α-TGFβ1,2 pan específicos y/o 250 µg de α-PD-1 por dosis y/o los anticuerpos del control correspondientes a las mismas concentraciones. Los seis grupos experimentales incluyeron: 1) anticuerpos del control; 2) α-PD1; 3) anticuerpo específico de α-TGFβ1,2; 4) anticuerpo específico de α-TGFβ1,2 y combinado con α-PD-1; 5) anticuerpo pan-específico de α-TGFβ1,2,3; 6) anticuerpo pan-específico de α-TGFβ1,2,3 y combinado con α-PD-1 mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Los tamaños tumorales se midieron posteriormente usando un calibre. Las monoterapias pan-específicas de α-TGFβ1,2,3 y α-TGFβ1,2 inhibieron el crecimiento tumoral (es decir, redujeron el tamaño del tumor) en comparación con los controles y fueron más eficaces que el anticuerpo de α-PD-1 solo.
- 20 Adicionalmente, los anticuerpos pan específicos de α-TGFβ1,2,3 y α-TGFβ1,2 mostraron actividad antitumoral comparable entre sí en la monoterapia y en la terapia combinada con α-PD-1 (Figura 7).

Estos resultados muestran que un anticuerpo que puede bloquear tanto las isoformas TGFβ1,2,3 como las isoformas TGFβ1,2 es eficaz junto con un inhibidor de PD-1 para reducir la carga tumoral en un sujeto.

- 25 Se espera que a los expertos en la técnica se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones en la divulgación como se muestra en los ejemplos ilustrativos anteriores. La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Mirza, et al.
- <120> Tratamiento del cáncer usando inhibidores de TGF-beta y PD-1
- 35 <130> 27129/49343
- <150> US 62/191.797
- <151> 13/07/2015
- 40 <150> US 62/143.016
- <151> 03/04/2015
- <160> 30
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 366
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Nucleótido sintético
- 55 <220>
- <221> misc_feature
- <223> Clon de la cadena pesada de XPA.42.068
- 60 <400> 1

ES 2 820 768 T3

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta aactgggtgg cacaaactat      180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc      300
ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc      360
tcttca                                          366

```

```

5  <210> 2
   <211> 122
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Péptido sintético

   <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <223> Clon de la cadena pesada de XPA.42.068

15 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (26)..(33)
   <223> H-CDR1

20 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (51)..(58)
   <223> H-CDR2

25 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (97)..(111)
   <223> H-CDR3

30 <400> 2

```

ES 2 820 768 T3

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

<210> 3
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Nucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Clon de la cadena ligera de XPA.42.068

<400> 3

tcttctgagc	tgactcagcc	accctcagtg	tccgtggccc	caggagagaa	ggccaggatt	60
acctgtgggg	ggaataacat	tggacgtaaa	agtgtacatt	ggtaccagca	gaggccaggc	120
caggcccctg	ttgtggtcct	ctactatgat	agagtcagac	cctcagggat	ccctgagcga	180
ttttctggct	ccaactctgg	gaacacggcc	accctgacca	tcaccagggt	cgaagccggg	240
gatgaggccg	actatTTTTTg	tcaggtgtgg	gataaacacta	gtgagcatgt	ggtcttcggc	300
ggaggcaccc	agctgaccgt	cctaggc				327

<210> 4
 <211> 109
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de la cadena ligera de XPA.42.068
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(31)
 <223> L-CDR1
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(51)
 <223> L-CDR2
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88)..(97)
 <223> L-CDR3
 25
 <400> 4

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

30
 <210> 5
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Nucleótido sintético
 <220>

ES 2 820 768 T3

	<221> misc_feature	
	<223> Clon de la cadena pesada de XPA.42.089	
	<400> 5	
5	caggtgcagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac	180
	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcgagc aatccacgag cacagcctac	240
	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggggacta	300
	tgggaggttc gggcccttcc gtcgggtctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	360
	tca	363
	<210> 6	
	<211> 121	
10	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Péptido sintético	
15	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<223> Clon de la cadena pesada de XPA.42.089	
20	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (26)..(33)	
	<223> H-CDR1	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (51)..(58)	
	<223> H-CDR2	
30	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (97)..(110)	
	<223> H-CDR3	
35	<400> 6	

ES 2 820 768 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Leu Trp Glu Val Arg Ala Leu Pro Ser Val Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Nucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> Clon de la cadena ligera de XPA.42.089

<400> 7

tcctatgagc tgacacagcc accctcagt tccgtggccc cgggacagac ggccagaatt 60
acctgtgggg caaatgacat tggaagtaaa agtgtccact ggtaccagca gaaggcaggc 120
caggcccctg tactggtcgt ctctgaagat atcatccggc cctcagggat ccctgagcga 180
atctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcaagtttgg gatagggata gtgatcaata tgtctttgga 300
actgggacca aggtcaccgt cctaggc 327

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Clon de la cadena ligera de XPA.42.089

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(31)
<223> L-CDR1

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(51)
<223> L-CDR2

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88)..(97)
<223> L-CDR3

25 <400> 8

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

30 <210> 9
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Nucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> Clon de la cadena pesada de XPA.42.681

<400> 9

```
cagggttcagc tgggtgcagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acactgggtgg cacaaactat      180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagatcattc      300
ctgtggctgg ttccctctga tgcttttgat atctgggggcc aaggggacaat ggtcacccgtc      360
tcttca                                          366
```

5

<210> 10
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Péptido sintético

15

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Clon de la cadena pesada de XPA.42.681

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(33)
<223> H-CDR1

25

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(58)
<223> H-CDR2

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(111)
<223> H-CDR3

<400> 10

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
```

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
          20          25          30
```

```
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
```

35

ES 2 820 768 T3

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Nucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> Clon de la cadena ligera de XPA.42.681

<400> 11

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggaaagac ggccaggatt	60
acctgtgggg gaaacaacat tggatttaga agtgtgcact ggtaccaaca gaagtcaggc	120
caggcccctg tcctggtcat ctattttgat cgcgcccggc cctcagggat ccctgagcga	180
ttctctgcct ccaactctga gaacacggcc accctgacca tcaggagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actattactg tcagggtgg gatagtgaca gtgatgatct agtccttcggc	300
ggaggcacc agctgaccgt cctaggt	327

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Clon de la cadena ligera de XPA.42.681

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(31)
<223> L-CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(51)
 <223> L-CDR2

 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88)..(98)
 <223> L-CDR3

 <400> 12
 10

 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15

 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Phe Arg Ser Val
 20 25 30

 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

 Phe Asp Arg Ala Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser
 50 55 60

 Asn Ser Glu Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp
 85 90 95

 Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

 <210> 13
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético
 20

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.068 - H-CDR1

 25 <400> 13

 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

 <210> 14
 30 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.068 - H-CDR2
 5 <400> 14

 Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr
 1 5

 <210> 15
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.068 - H-CDR3
 20 <400> 15

 Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10 15

 25 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <223> Clon de XPA.42.068 - L-CDR1

 <400> 16

 Asn Ile Gly Arg Lys Ser
 1 5

 40 <210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Péptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <223> Clon de XPA.42.068 - L-CDR2

 <400> 17

 Tyr Asp Arg
 1
 55

 <210> 18

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

5

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.068 - L-CDR3

10

<400> 18

	Gln	Val	Trp	Asp	Asn	Thr	Ser	Glu	His	Val
	1				5					10

15

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.089 - H-CDR1

25

<400> 19

	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala
	1				5			

30

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Péptido sintético

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.089 - H-CDR2

45

<400> 20

	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala
	1				5			

<210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Péptido sintético

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.089 - H-CDR3

<400> 21

Ala	Arg	Gly	Leu	Trp	Glu	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr
1				5					10				

5 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <223> Clon de XPA.42.089 - L-CDR1

<400> 22

Asp	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser
1				5	

20 <210> 23
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.089 - L-CDR2

<400> 23

Glu	Asp	Ile
1		

35 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42.089 - L-CDR3

<400> 24

Gln	Val	Trp	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Tyr
1				5				10	

55 <210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 820 768 T3

<220>
 <223> Péptido sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42-681 - H-CDR1
 <400> 25

10 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

15 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42-681 - H-CDR2
 <400> 26

25 Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr
 1 5

30 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42-681 - H-CDR3
 <400> 27

Ala Arg Ser Phe Leu Trp Leu Val Pro Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10 15

45 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Péptido sintético

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Clon de XPA.42-681 - L-CDR1
 <400> 28

ES 2 820 768 T3

Asn Ile Gly Phe Arg Ser
1 5

5 <210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Clon de XPA.42-681 - L-CDR2

15 <400> 29

Phe Asp Arg
1

20 <210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Clon de XPA.42-681 - L-CDR3

30 <400> 30

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Asp Leu Val
1 5 10

35

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y un inhibidor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) para usar en un método para tratar el cáncer o prevenir la reincidencia del cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita cantidades terapéuticamente eficaces del inhibidor de TGF β y del inhibidor de PD-1, en donde el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo dirigido contra PD-1; y, en donde el inhibidor de TGF β es un anticuerpo que se une a TGF β que comprende:
 - (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 13, 19 y 25;
 - (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 14, 20 y 26;
 - (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 15, 21 y 27;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 16, 22 y 28;
 - (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 17, 23 y 29; y
 - (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 18, 24 y 30.
2. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
 - i) el anticuerpo de TGF β se une a TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3; o
 - ii) el anticuerpo de TGF β se une a TGF β 1, TGF β 2 con mayor afinidad que a TGF β 3; o
 - iii) el anticuerpo de TGF β neutraliza la actividad de TGF β 1 y TGF β 2 en mayor medida que de lo que neutraliza la actividad de TGF- β 3; o
 - iv) el anticuerpo de TGF β se une a TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 con una Kd de afinidad de 10⁻⁶ M o menos.
3. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el anticuerpo de TGF β comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 2, 6 y 10, y comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 4, 8 y 12.
4. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el inhibidor de TGF β es un anticuerpo que comprende:
 - a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 25, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 26, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 27, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 28, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 29, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y
 - f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 30, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.
5. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el inhibidor de TGF β es un anticuerpo que comprende:
 - a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 13, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 14, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 15, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 16, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 17, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y
 - f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 18, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.
6. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el inhibidor de TGF β es un anticuerpo que comprende:
 - g) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 19, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;
 - h) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 20, o una variante de

la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;

i) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en el SEQ ID NO: 21, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;

j) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 22, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos;

k) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 23, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos; y

l) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en el SEQ ID NO: 24, o una variante de la misma, en la que se han cambiado uno o dos aminoácidos.

7. El inhibidor de TGFβ y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 2 en donde

i) la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se define en el SEQ ID NO: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se define en el SEQ ID NO: 12; o

ii) la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se define en el SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se define en el SEQ ID NO: 4; o

iii) en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se define en el SEQ ID NO: 6 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se define en el SEQ ID NO: 8.

8. El inhibidor de TGFβ y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el anticuerpo además comprende una región constante de la cadena pesada, en donde la región constante de la cadena pesada es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE modificada o sin modificar, un fragmento de la misma o combinaciones de las mismas, que opcionalmente comprende además una región constante de la cadena ligera unida a dicha región variable de la cadena ligera.

9. El inhibidor de TGFβ y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas metastásico, adenocarcinoma de páncreas metastásico, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer fibrótico, glioma, glioma maligno, glioma pontino difuso intrínseco, neoplasia cerebral infantil recurrente, carcinoma de células renales, carcinoma de células renales metastásico de células claras, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, cáncer de próstata en estadio IV, melanoma metastásico, melanoma, melanoma maligno, melanoma cutáneo recurrente, melanoma con metástasis cerebral, melanoma cutáneo en estadio IIIA; melanoma cutáneo en estadio IIIB, melanoma cutáneo en estadio IIIC; melanoma cutáneo en estadio IV, melanoma maligno de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer escamocelular de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de mama metastásico recurrente, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular, linfoma no Hodgkin, LNH de linfocitos B avanzado, LH incluyendo linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda del adulto en remisión; leucemia mieloide aguda del adulto con Inv(16)(p13.1q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11; leucemia mieloide aguda del adulto con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1; leucemia mieloide aguda del adulto con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL; leucemia promielocítica aguda del adulto con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA; leucemia mieloide aguda relacionada con agentes alquilantes, leucemia linfocítica crónica, síndrome de Richter; macroglobulinemia de Waldenström, glioblastoma del adulto; gliosarcoma del adulto, glioblastoma recurrente, rabdomiosarcoma infantil recurrente, sarcoma de Ewing recurrente/tumor neuroectodérmico primitivo periférico, neuroblastoma recurrente; osteosarcoma recurrente, cáncer colorrectal, cáncer colorrectal positivo para MSI; cáncer colorrectal negativo para MSI, carcinoma nasofaríngeo no queratinizante; carcinoma nasofaríngeo no diferenciado recurrente, adenocarcinoma de cuello de útero; carcinoma adenoescamoso de cuello de útero; carcinoma escamocelular de cuello de útero; carcinoma de cuello de útero recurrente; cáncer de útero en estadio IVA; cáncer de útero en estadio IVB, carcinoma escamocelular del canal anal; carcinoma del canal anal metastásico; carcinoma del canal anal recurrente, cáncer de cabeza y cuello recurrente; carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma de ovario, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer GI avanzado, adenocarcinoma gástrico; adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, neoplasias de hueso, sarcoma de tejidos blandos; sarcoma óseo, carcinoma tímico, carcinoma urotelial, carcinoma de células de Merkel recurrente; carcinoma de células de Merkel en estadio III; carcinoma de células de Merkel en estadio IV, síndrome mielodisplásico y micosis fungoides recurrente y síndrome de Sezary.

10. El inhibidor de TGFβ y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, melanoma y carcinoma escamocelular (SCC).

11. El inhibidor de TGFβ y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el cáncer tiene una mutación

i) en el oncogén homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2 (KRAS); o

ii) en el oncogén homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata Harvey (HRAS); o

iii) en el oncogén homólogo del oncogén vírico del neuroblastoma RAS (v-ras) (NRAS); y/o

iv) en el oncogén RAS.

12. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método reducir el tamaño del tumor o la carga del tumor en el sujeto, opcionalmente en donde el tamaño del tumor se reduce en un 20 % o más; y/o reducir la metástasis en el sujeto.
13. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el inhibidor de PD-1 y el inhibidor de TGF β se formulan en una composición farmacéutica, opcionalmente en donde los inhibidores están en la misma composición o en composiciones independientes.
14. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, en el método, los inhibidores se administran simultáneamente, o se administran en momentos separados o consecutivamente.
15. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, en el método, la administración evita la recurrencia del cáncer en un sujeto que ha recibido la terapia con inhibidores.
16. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, en el método, la administración
- i) aumenta el número de linfocitos citolíticos naturales (NK) en un tumor y/o mejora la actividad citolítica de los linfocitos NK; y/o
 - ii) disminuye el número de linfocitos T reguladores en un tumor y/o inhibe la función de los linfocitos T reguladores; y/o
 - iii) aumenta el número de linfocitos T citotóxicos (CTL) en un tumor y/o potencia la función de los CTL; y/o
 - iv) aumenta el número de células dendríticas de tipo 2 (DC2) en un tumor; y/o
 - v) aumenta la proporción entre linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores en un tumor.
17. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, en el método, los inhibidores se administran una vez al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, mensualmente o una vez cada dos meses.
18. El inhibidor de TGF β y el inhibidor de PD-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, en el método, el inhibidor de TGF β se administra en un intervalo de dosis de 0,1 a 15 mg/kg y el inhibidor de PD-1 se administra en un intervalo de dosis de 0,1 a 15 mg/kg.
19. Un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y un inhibidor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) para usar en un método para aumentar la proporción entre linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores en un tumor, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita cantidades terapéuticamente eficaces del inhibidor de TGF β y del inhibidor de PD-1, en donde el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo dirigido contra PD-1; y, en donde el inhibidor de TGF β es un anticuerpo que se une a TGF β que comprende:
- (a) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 13, 19 y 25;
 - (b) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 14, 20 y 26;
 - (c) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada definida en los SEQ ID NOS: 15, 21 y 27;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 16, 22 y 28;
 - (e) una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 17, 23 y 29; y
 - (f) una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera definida en los SEQ ID NOS: 18, 24 y 30.

Figura 1A

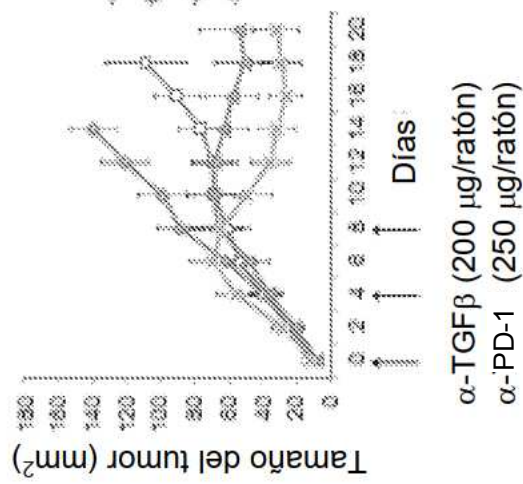


Figura 1B

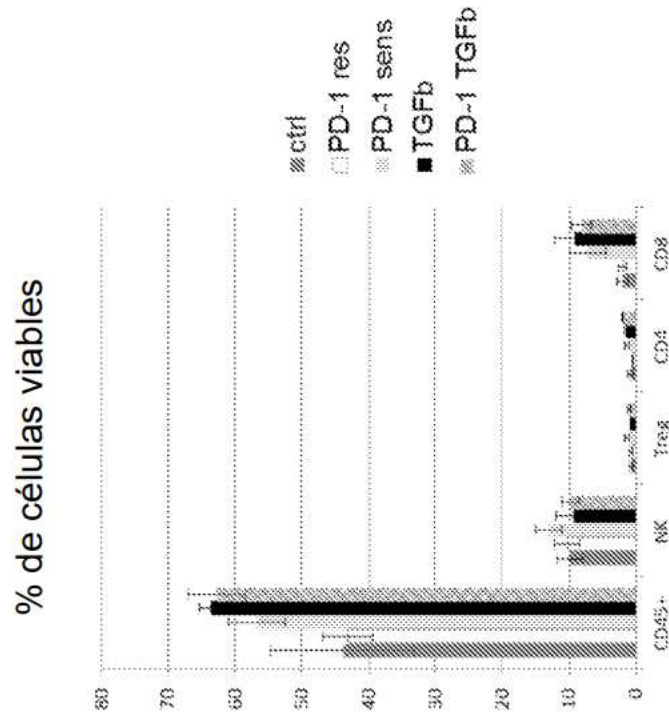


Figura 1C

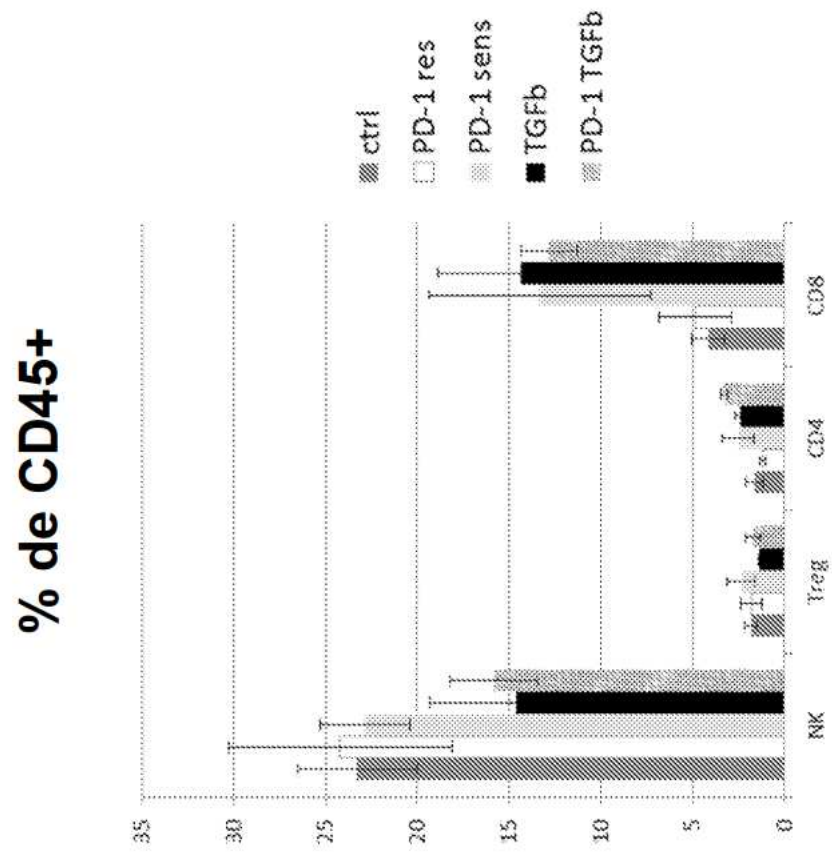


Figura 2A

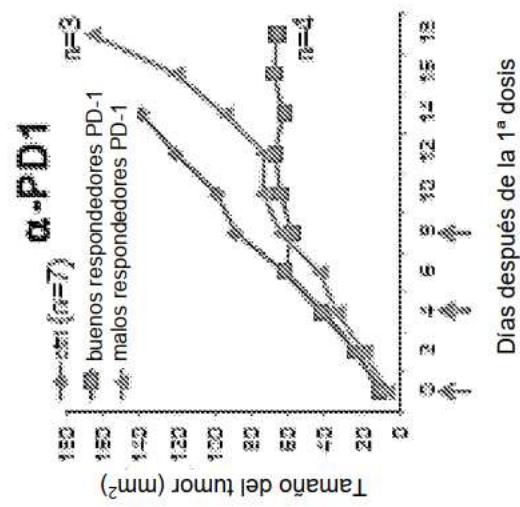


Figura 2B

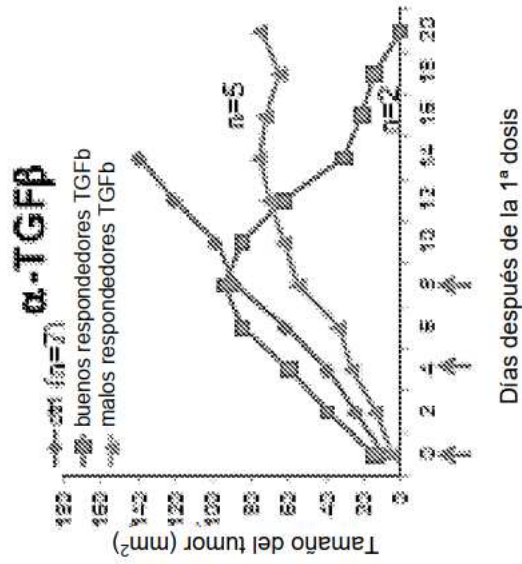
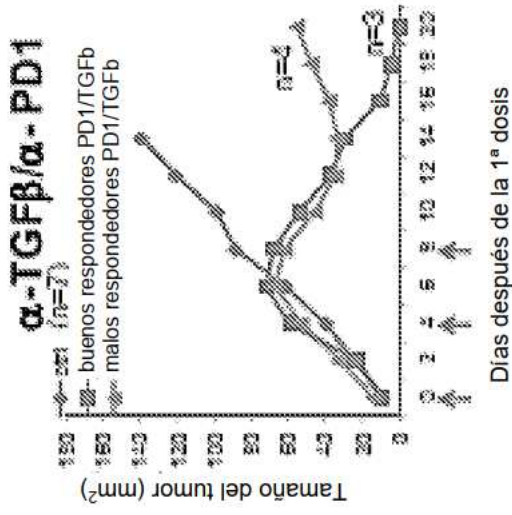


Figura 2C



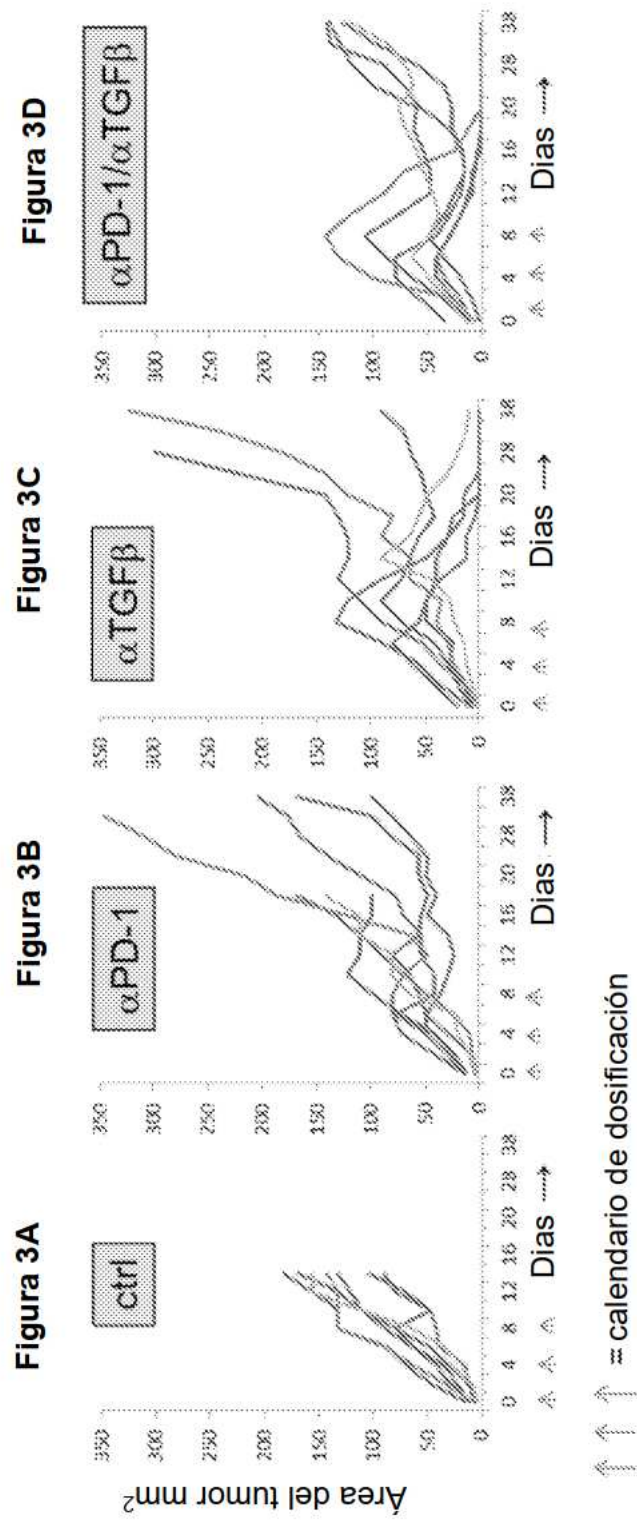


Figura 4

Inmunofenotipado Hras 168

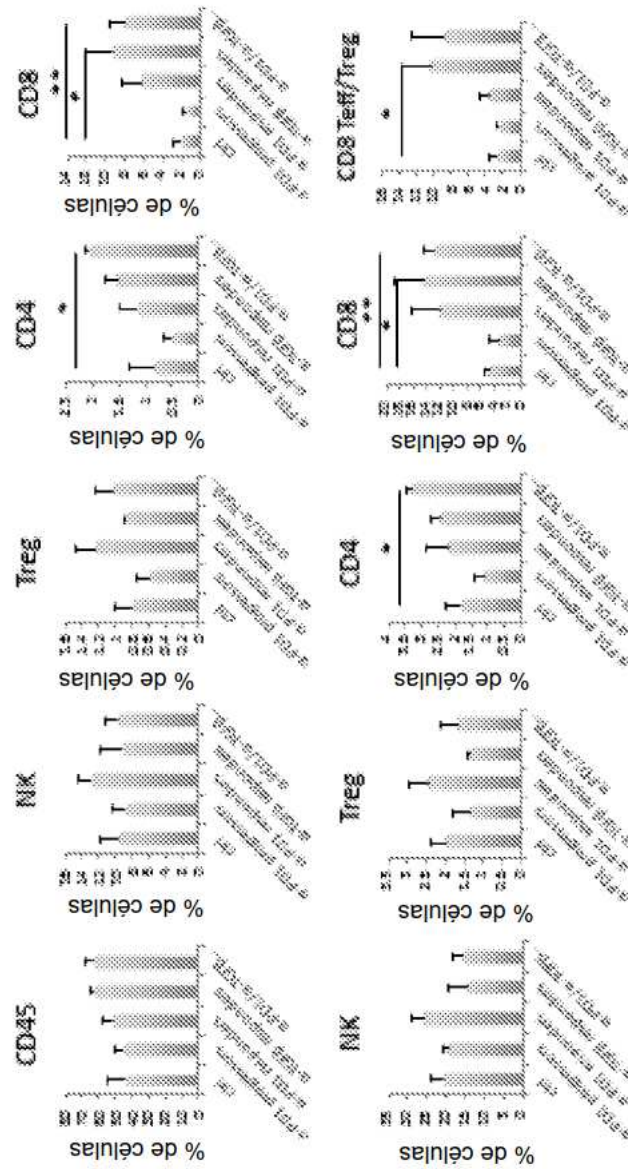


Figura 5

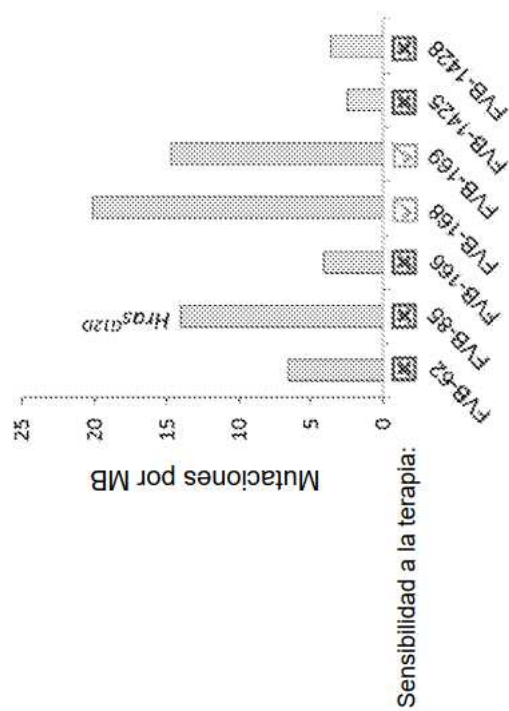


Figura 6A

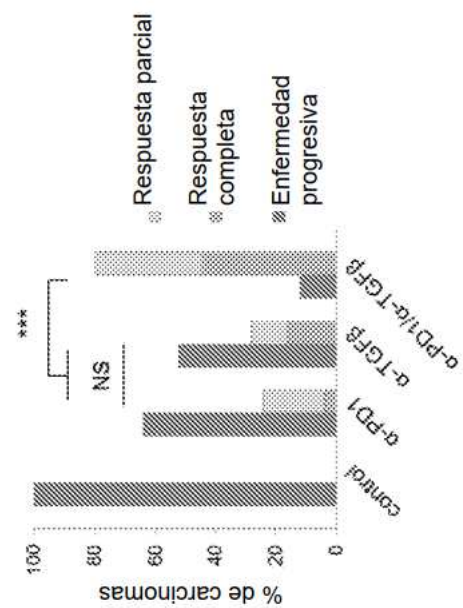


Figura 6B

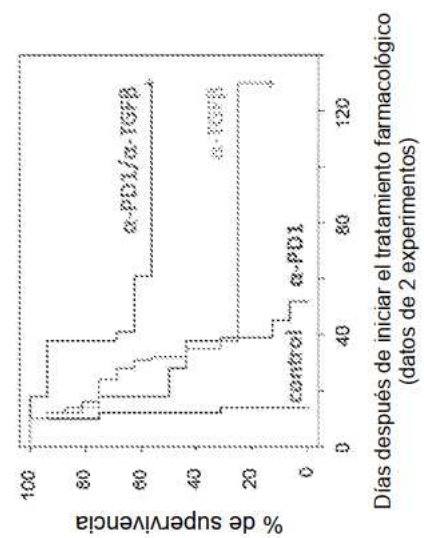


Figura 6C

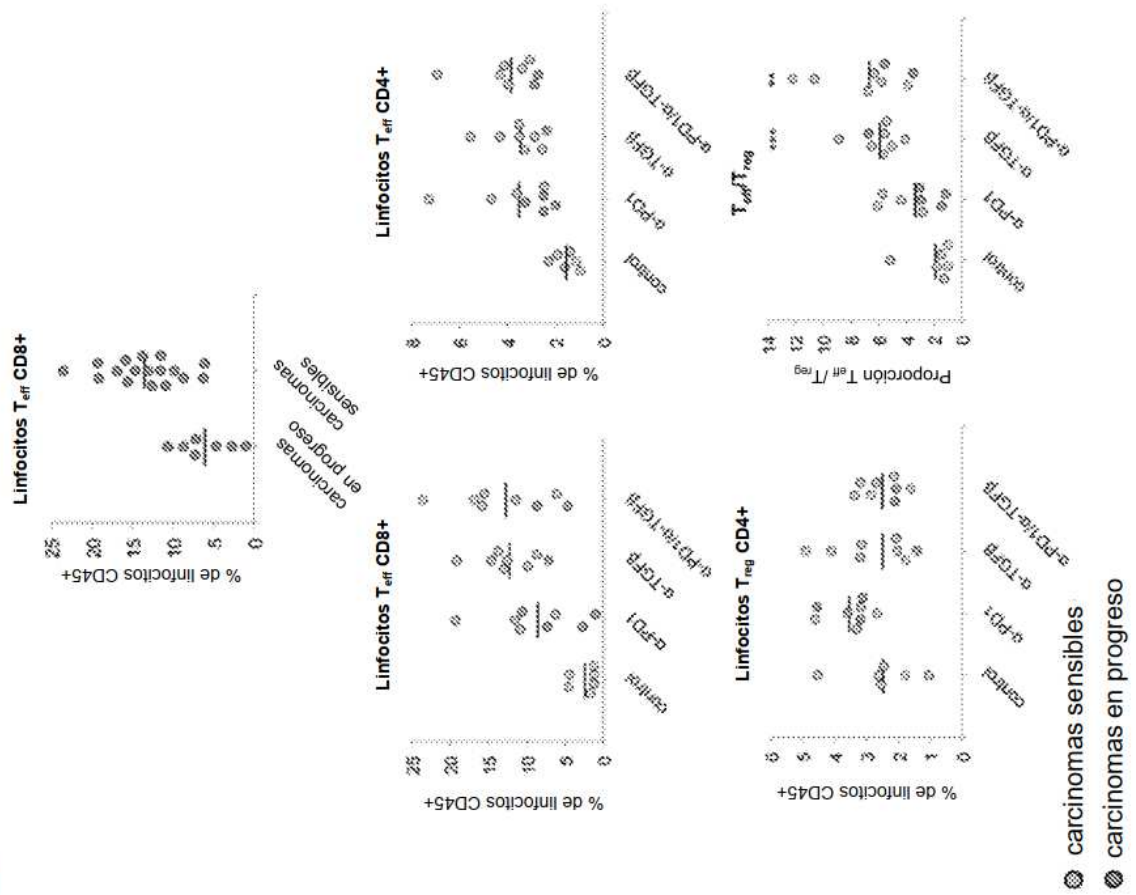


Figura 7

