

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 652**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07797128 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 1989230**

54 Título: **Anticuerpos anti-FGF19 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**10.02.2006 US 772310 P**

**09.03.2006 US 780608 P**

**19.01.2007 US 885866 P**

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

**14.09.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**

**1 DNA WAY**

**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**DESNOYERS, LUC y**

**FRENCH, DOROTHY**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 582 652 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-FGF19 y métodos de uso de los mismos

## 5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad en virtud del 35 USC §119 sobre la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/772.310, presentada el 10 de febrero de 2006, la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/780.608, presentada el 9 de marzo de 2006 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/885.866, presentada el 19 de enero de 2007, cuyos contenidos completos se incorporan en el presente documento por referencia.

## Campo de la invención

15 La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-FGF19, a usos de los mismos y a la detección de FGF19 y/o FGFR4.

## Antecedentes de la invención

20 La familia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) está compuesta de 22 péptidos estructuralmente relacionados que se unen a 4 tirosinas cinasas receptoras (FGFR1-4) y un receptor deficiente en cinasa (FGFR5) (Eswarakumar et al (2005) Cytokine Growth Factor Rev 16, 139-149; Ornitz et al (2001) Genome Biol 2, REVIEWS3005; Sleeman et al (2001) Gene 271, 171-182). La interacción de los FGF con FGFR1-4 da como resultado la homodimerización y autofosforilación del receptor, el reclutamiento de los adaptadores citosólicos, tales como FSR2 y el inicio de múltiples rutas de señalización (Powers et al (2000) Endocr Relat Cancer 7, 165-197; Schlessinger, J. (2004) Science 306, 1506-1507).

Los FGF y FGFR desempeñan papeles importantes en el desarrollo y reparación de tejidos regulando la proliferación, migración quimiotaxis, diferenciación, morfogénesis y angiogénesis celular (Ornitz et al (2001) Genome Biol 2, REVIEWS3005; Augusteet al (2003) Cell Tissue Res 314, 157-166; Steiling et al (2003) Curr Opin Biotechnol 14, 533-537). Diversos FGF y FGFR están asociados a la patogénesis del cáncer de mama, próstata, cuello de útero, estómago y colon (Jeffers et al (2002) Expert Opin Ther Targets 6, 469-482; Mattila et al. (2001) Oncogene 20, 2791-2804; Ruohola et al. (2001) Cancer Res 61, 4229-4237; Marsh et al (1999) Oncogene 18, 1053-1060; Shimokawa et al (2003) Cancer Res 63, 6116-6120; Jang (2001) Cancer Res 61, 3541-3543; Cappellen (1999) Nat Genet 23, 18-20; Gowardhan (2005) Br J Cancer 92, 320-327).

FGF19 es un miembro de la más distante de las siete subfamilias de los FGF. FGF19 es un ligando de alta afinidad de FGFR4 (Xie et al (1999) Cytokine 11:729-735). FGF19 se secreta normalmente por el epitelio biliar e intestinal. FGF19 desempeña un papel en la homeostasia del colesterol mediante la represión de la expresión hepática de colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa 1 (Cyp7 $\alpha$ 1), la enzima limitante de la velocidad para la síntesis de colesterol y ácidos biliares (Gutierrez et al (2006) Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 301-306; Yu et al (2000) J Biol Chem 275, 15482-15489; Holt, JA, et al. (2003) Genes Dev 17(130):158). La expresión ectópica de FGF19 en un modelo de ratón transgénico aumenta la proliferación de hepatocitos, promueve la displasia hepatocelular y da como resultado neoplasia a los 10 meses de edad (Nicholes et al. (2002). Am J Pathol 160, 2295-2307). Se cree que el mecanismo del carcinoma hepatocelular inducido por FGF19 implica la interacción de FGFR4. El tratamiento con FGF19 aumenta la tasa metabólica y revierte la diabetes dietaria y deficiente en leptina. Fu et al (2004) 145:2594-2603. FGF19 se describe también en, por ejemplo, Xie et al. (1999) Cytokine 11:729-735; y Harmer et al (2004) 43:629-640.

50 La expresión de FGFR4 está ampliamente distribuida y se ha comunicado en los músculos esqueléticos en desarrollo, hígado, pulmón, páncreas, adrenal, riñón y cerebro (Kan et al. (1999) J Biol Chem 274, 15947-15952; Nicholes et al. (2002). Am J Pathol 160, 2295-2307; Ozawa et al. (1996) Brain Res Mol Brain Res 41, 279-288; Stark et al (1991) Development 113, 641-651). Se ha comunicado la amplificación de FGFR4 en adenocarcinomas mamarios y ováricos (Jaakkola et al (1993) Int J Cancer 54, 378-382). Se ha correlacionado la mutación y truncamiento de FGFR4 con neoplasias y en algunos casos el pronóstico de adenocarcinomas de próstata y pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, astrocitoma y adenomas de la pituitaria (Jaakkola et al (1993) Int J Cancer 54, 378-382; Morimoto (2003) Cancer 98, 2245-2250; Qian (2004) J Clin Endocrinol Metab 89, 1904-1911; Spinola et al. (2005) J Clin Oncol 23, 7307-7311; Streit et al (2004) Int J Cancer 111, 213-217; Wang (1994) Mol Cell Biol 14, 181-188; Yamada (2002) Neurol Res 24, 244-248).

60 Es evidente que sigue habiendo necesidad de agentes que tengan atributos clínicos que sean óptimos para su desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

65

**Sumario de la invención**

La invención se basa en parte en la identificación de una serie de agentes de unión a FGF19 (tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos). FGF19 se presenta como un agente terapéutico importante y ventajoso y la invención proporciona composiciones y métodos basados en la unión a FGF19. Los agentes de unión a FGF19, tal como se describen en el presente documento, proporcionan agentes terapéuticos y diagnósticos importantes para su uso en afecciones patológicas diana asociadas a la expresión y/o actividad de las rutas de FGF19-FGFR4. Por consiguiente, la invención proporciona métodos, composiciones y kits relacionados con la unión a FGF19 y la detección de la unión de FGF19 y/o FGFR4 tal como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a una región de unión a FGFR4 de FGF19 que se une a un péptido que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos: GFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR (SEQ ID NO: 9) tal como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGF19 que comprende seis secuencias de región hipervariable (HVR) que consisten en: (a) HVR-L1 que comprende la secuencia KASQDINSFSL (SEQ ID NO: 1); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia RANRLVD (aminoácidos 50-56 de la SEQ ID NO: 4); (c) HVR-L3 que comprende la secuencia LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 3); (d) HVR-H1 que comprende la secuencia TYGVH (SEQ ID NO: 5); (e) HVR-H2 que comprende la secuencia VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 6); y (f) HVR-H3 que comprende la secuencia KEYANLYAMDY (SEQ ID NO: 7).

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGF19 que comprende (a) una cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia KASQDINSFSL (SEQ ID NO: 1); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia RANRLVD (aminoácidos 50-56 de la SEQ ID NO: 4); y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 3); y (b) una cadena pesada A que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia TYGVH (SEQ ID NO: 5); (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 6); y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia KEYANLYAMDY (SEQ ID NO: 7).

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFSLWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSL  
TISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO: 4); y comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKD  
NSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:8).

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFSLWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSL  
TISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4).

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKD  
NSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:8).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-FGF19 que compiten con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia:

DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFSLWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSL  
TISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO: 4) y un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDY-  
NAAFISRLSITKD NSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 8) por la unión a FGF19.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-FGF19 que se unen al mismo epítipo (o a un sustancialmente similar) de FGF19 en forma de un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia:

DIKMTQSPSSMYASLGERTIPCKASQDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSL TISS-  
LEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO: 4) y un dominio variable de cadena pesada que tiene la  
secuencia:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKD

5 NSKSQVFFKMNSLLANDTAIFYCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:8).

10 Como se conoce en la técnica y tal como se describe en más detalle a continuación en el presente documento, la  
posición/límite de aminoácido que delinea una región hipervariable de anticuerpo puede variar, dependiendo del  
contexto y de las diversas definiciones conocidas en la técnica (tal como se describe a continuación). Algunas  
posiciones dentro de un dominio variable pueden verse como posiciones hipervariables híbridas en tanto que esas  
posiciones pueden considerarse dentro de una región hipervariable según un conjunto de criterios a la vez que se  
consideran fuera de una región hipervariable según otro conjunto de criterios diferentes. También pueden  
encontrarse una o más de estas posiciones en regiones hipervariables extendidas (tal como se define  
adicionalmente más adelante).

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un  
anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en un  
anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En  
algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un  
20 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> o scFv.

25 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias  
de unión a antígeno de un donante no humano injertadas en una secuencia no humana, humana o humanizada  
heteróloga (por ejemplo, secuencias de dominio marco conservado y/o constante). En una realización, el donante no  
humano es un ratón. En una realización, una secuencia de unión a antígeno es sintética, por ejemplo, obtenida  
mediante mutagénesis (por ejemplo, exploración de presentación en fagos, etc.). En una realización, un anticuerpo  
quimérico de la invención tiene regiones V murinas y la región C humana. En una realización, la región V de cadena  
ligera murina está fusionada a una cadena ligera kappa humana. En una realización, la región V de cadena pesada  
murina se fusiona a una región C de IgG 1 humana.

30 Los anticuerpos humanizados incluyen aquellos que tienen sustituciones en la FR y variantes de maduración por  
afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en las CDR o FR no se limitan a aquellos  
presentes en el anticuerpo donante o receptor. En otras realizaciones, los anticuerpos comprenden además cambios  
en los restos de aminoácido en la región Fc que dan lugar a una función efectora mejorada, incluyendo función de  
35 CDC y/o de ADCC mejoradas y eliminación de células B. Otros anticuerpos incluyen aquellos que tienen cambios  
específicos que mejoran la estabilidad. En otras realizaciones, los anticuerpos comprenden cambios en los restos de  
aminoácido en la región Fc que dan lugar a una función efectora reducida, por ejemplo, función de CDC y/o ADCC  
reducidas y/o eliminación de células B reducida. En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por una  
unión reducida (tal como ausencia de unión) al factor C1q de complemento humano y/o al receptor de Fc en los  
40 linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por una unión reducida  
(tal como la ausencia de unión) a FcγRI, FcγRIIA y/o FcγRIIIA humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos  
son de clase IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y comprende al menos una mutación en E233, L234, L235, G236,  
D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración de acuerdo con el índice EU). En  
algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden la mutación L234A/L235A o D265A/N297A.

45 En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos anti-FGF19 que comprenden cualquiera de las secuencias de  
unión a antígeno proporcionadas en el presente documento, en el que los polipéptidos anti-FGF19 se unen  
específicamente a FGF19.

50 En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado (denominado de manera intercambiable "conjugado de  
anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 divulgados en el presente  
documento conjugado a un agente, tal como un fármaco.

55 Los anticuerpos de la invención se unen a FGF19 y en algunas realizaciones, pueden modular uno o más aspectos  
de los efectos asociados a FGF19, incluyendo, pero sin limitación, la activación de FGFR4, la señalización molecular  
aguas abajo de FGFR4, la alteración de la unión de FGFR4 a FGF19, la multimerización de FGFR4, la expresión de  
un gen de CYP7α1, la fosforilación de FGFR4, MAPK, FRS2 y/o ERK2, la activación de β-catenina, la migración  
celular promovida por FGF19 y/o la alteración de cualquier ruta biológica de FGF19 y/o FGFR4 biológicamente  
60 relevante y/o el tratamiento y/o prevención de un tumor, un trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o el  
tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de FGF19 (tal como expresión y/o  
actividad aumentada de FGF19). El anticuerpo de la invención se une específicamente a FGF19. El anticuerpo se  
une específicamente a una región de unión a FGFR4 de FGF19. El anticuerpo de la invención reduce, inhibe y/o  
bloquea la actividad de FGF19 *in vivo* y/o *in vitro*. El anticuerpo compite por la unión con FGFR4 (reduce y/o bloquea  
la unión de FGFR4 a FGF19).

5 En un aspecto, un anticuerpo anti-FGF19 aislado inhibe, reduce y/o bloquea la expresión inducida por FGF19 de un gen de CYP7 $\alpha$ 1 en una célula expuesta a FGF19; inhibe, reduce y/o bloquea la fosforilación inducida por FGF19 de FGFR4, MAPK, FRS2 y/o ERK2 en una célula expuesta a FGF19; o inhibe, reduce y/o bloquea la migración celular promovida por FGF19. En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En algunas realizaciones, la célula es una célula HCT116.

10 En un aspecto, un anticuerpo aislado anti-FGF19 que inhibe, reduce y/o bloquea la activación de la ruta de Wnt en una célula. En algunas realizaciones, la activación de la ruta de Wnt comprende uno o más de inmunorreactividad de  $\beta$ -catenina, fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina, expresión de genes diana de Wnt, mutación de  $\beta$ -catenina y unión de E-cadherina a  $\beta$ -catenina. Se conoce en la técnica la detección de la activación de la ruta de Wnt y se describen e ilustran algunos ejemplos en el presente documento.

15 En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo, en las que el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento y un vehículo. Esta composición puede comprender además un segundo medicamento, en el que el anticuerpo es un primer medicamento. Este segundo medicamento, para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, puede ser otro anticuerpo, agente quimioterapéutico, agente citotóxico, agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocinas, radioterapia citotóxica, corticoesteroide, anti-emético, vacuna para el cáncer, analgésico, agente anti-vascular o agente inhibidor del crecimiento. En otra realización, se administra un segundo medicamento al sujeto en una cantidad eficaz, en el que el anticuerpo es un primer medicamento. Este segundo medicamento es más de un medicamento y es preferentemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico, agente citotóxico, agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocinas, radioterapia citotóxica, corticoesteroide, anti-emético, vacuna para el cáncer, analgésico, agente anti-vascular o agente inhibidor del crecimiento. Los agentes más particulares incluyen, por ejemplo, irinotecán (CAMPTOSAR®), cetuximab (ERBITUX®), fulvestrant (FASLODEX®), vinorelbina (NAVELBINE®), antagonistas del receptor de EFG tales como erlotinib (TARCEVA®), antagonistas de VEGF, tales como bevacizumab (AVASTIN®), vincristina (ONCOVIN®), inhibidores de mTor (una serina/treonina proteína cinasa), tales como rapamicina y CCI-779 y antagonistas anti-HER1, HER2, ErbB y/o EGFR, tales como trastuzumab (HERCEPTIN®), pertuzumab (OMNITARG™) o lapatinib y otros agentes citotóxicos, incluyendo agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el segundo medicamento es un fármaco anti-estrógenos, tal como tamoxifeno, fulvestrant o un inhibidor de aromatasas, un antagonista para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y para ErbB o el receptor de Efb o Her-1 o Her-2. En algunas realizaciones, el segundo medicamento es tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecán, cetuximab, fulvestrant vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib o trastuzumab y preferentemente, el segundo medicamento es erlotinib, bevacizumab o trastuzumab.

40 En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-FGF19 de la invención.

En un aspecto, la divulgación proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

45 En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Puede usarse cualquiera de diversas células. En una realización, una célula hospedadora es una célula procarionta, por ejemplo, *E. coli*. En una realización, una célula hospedadora es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

55 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para producir un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para producir un anticuerpo anti-FGF19 (que, tal como se define en el presente documento, incluye de longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho método expresar en una célula hospedadora adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo.

60 En un aspecto, la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase; y una composición contenida en el envase, en el que la composición comprende uno o más anticuerpos anti-FGF19 de la invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo (tales como instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento).

65 En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer envase que comprende una composición

que comprende uno o más anticuerpos anti-FGF19 de la invención; y un segundo envase que comprende un tampón. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-FGF19 de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno hepático, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno de atrofia.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno hepático, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno de atrofia.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno hepático, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno de atrofia.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso de una célula hospedadora de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno hepático, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno de atrofia.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno hepático, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno de atrofia.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno hepático, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno de atrofia.

La invención proporciona composiciones útiles para modular patologías asociadas a la expresión y/o actividad de FGF19 y/o FGFR4, tal como expresión y/o actividad aumentada o expresión y/o actividad no deseada, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento, tal como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para eliminar una célula (tal como una célula cancerosa o tumoral), comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear o prevenir el crecimiento de un tumor o un cáncer, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

Los usos médicos de la invención pueden usarse para afectar a cualquier patología adecuada. En el presente documento se describen trastornos ilustrativos e incluyen un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, astrocitoma, cáncer de pituitaria, cáncer de mama, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), carcinomas epiteliales, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de

testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar y carcinoma hepatocelular.

En una realización, una célula usada como diana en un método es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada entre el grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de  
 5 cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello de útero, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer de esófago, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma, una célula de  
 10 leucemia, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer de endometrio, una célula de cáncer de testículos, una célula de colangiocarcinoma, una célula de cáncer de vesícula biliar, una célula de cáncer de pulmón y/o una célula de cáncer de próstata. En una realización, una célula que se usa como diana en un método es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula usada como diana en un método es una célula displásica. En otra realización más, una célula usada como diana en un método es una célula metastásica.

15 En una realización de la invención, la célula que se usa como diana es una célula de hígado cirrótica.

Para los usos médicos de la invención, los métodos pueden comprender además terapias de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además una etapa en la que se expone una  
 20 célula y/o tejido diana (por ejemplo, una célula cancerosa) a tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

Puede usarse cualquier anticuerpo anti-FGF19 adecuado para los métodos implicados en el tratamiento y/o prevención de un trastorno, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de  
 25 anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGF19 es cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento y FGF19. En algunas realizaciones, el complejo es *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones,  
 30 el anticuerpo anti-FGF19 se marca de manera detectable.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para la detección de FGF19, comprendiendo los métodos detectar el complejo FGF19-anti-FGF19 en una muestra biológica. El término "detección", tal como se usa en el presente documento, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (medir los niveles) con o sin referencia a un  
 35 control.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para detectar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGF19, comprendiendo los métodos detectar a FGF19 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, el  
 40 trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGFR4, comprendiendo los métodos detectar a FGFR4 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.  
 45

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGF19 y FGFR4, comprendiendo los métodos detectar a FGFR4 y FGF19 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 se detecta en una primera muestra biológica y la expresión de FGF19 se detecta en una segunda muestra biológica.  
 50

En otro aspecto, los usos médicos de la invención se refieren a métodos para seleccionar el tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGF19, en caso de haberla, en una muestra biológica de un individuo; y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección o tratamiento se basa en la expresión de FGF19 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas  
 55  
 60  
 65

realizaciones, se detecta la expresión de FGF19 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático.

5 En otro aspecto, los usos médicos relacionados de la invención se refieren a métodos para seleccionar el tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGFR4, en caso de haberla, en una muestra biológica de un individuo; y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección o tratamiento se basa en la expresión de FGFR4 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en  
10 relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGFR4 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer  
15 pancreático.

En otro aspecto, los usos médicos de la invención se refieren a métodos para seleccionar el tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGF19 y FGFR4, en caso de haberla, en una muestra biológica de un individuo; y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección o tratamiento se basa en la expresión de FGF19 y FGFR4 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGFR4 y FGF19 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 se detecta en una primera muestra biológica y la expresión de FGF19 se detecta en una segunda muestra biológica. En  
20 algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático.

En otro aspecto, la invención proporciona usos médicos que se refieren a métodos para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno hepático (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19, además en el que la expresión de FGF19 y/o la expresión de FGFR4 se detecta en la muestra biológica del individuo antes, durante o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, la muestra biológica es del cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero. En algunas realizaciones, se detecta la sobreexpresión de FGF19 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGFR4 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. La expresión puede detectarse antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; o antes, durante y después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19.  
35

45 En otro aspecto, la invención proporciona usos médicos que se refieren a métodos para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno hepático (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19, en el que una muestra biológica del cáncer, el tumor y/o el trastorno celular o trastorno hepático expresa FGF19 y/o FGFR4.

50 En realizaciones que implican la detección, la expresión de la señalización molecular aguas abajo de FGFR4 puede detectarse adicionalmente o como una alternativa a la detección de la expresión de FGFR4. En algunas realizaciones, la detección de la señalización molecular aguas abajo de FGFR4 comprende uno o más de detección de la fosforilación de MAPK, FRS2 o ERK2.

55 En algunas realizaciones que implican la detección, la expresión de FGFR4 comprende la detección de la eliminación génica, la amplificación génica y/o la mutación génica de FGFR4. En algunas realizaciones que implican la detección, la expresión de FGF19 comprende la detección de la eliminación génica, la amplificación génica y/o la mutación génica de FGF19.

60 Algunas realizaciones que implican la detección comprenden además la detección de la activación de la ruta de Wnt. En algunas realizaciones, la detección de la activación de la ruta de Wnt comprende uno o más de fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina, expresión de genes diana de Wnt, mutación de  $\beta$ -catenina y unión de E-cadherina a  $\beta$ -catenina. Se conoce en la técnica la detección de la activación de la ruta de Wnt y se describen e ilustran algunos ejemplos en el presente documento.

65 En algunas realizaciones, el tratamiento es para un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer



colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de pituitaria, cáncer de páncreas, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de mama, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), carcinomas epiteliales, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar y carcinoma hepatocelular.

Las muestras biológicas se describen en el presente documento, por ejemplo, en la definición de muestra biológica. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.

En realizaciones que implican la detección de la expresión de FGF19 y/o FGFR4, puede detectarse la expresión de un polinucleótido de FGF19 y/o FGFR4 y/o la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4. En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de FGF19 y/o FGFR4, se detecta la expresión de ARNm de FGF19 y/o FGFR4. En otras realizaciones, se detecta la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4 usando un agente anti-FGF19 y/o un agente anti-FGFR4. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4 usando un anticuerpo. Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado para la detección y/o diagnóstico, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se usa un anticuerpo anti-FGF19 descrito en el presente documento para la detección. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4 usando un anticuerpo usando inmunohistoquímica (IHC). En algunas realizaciones, se puntúa con un 2 o más la expresión de FGF19 usando IHC.

En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de FGF19 y/o FGFR4, puede detectarse la presencia y/o ausencia y/o el nivel de expresión de FGF19 y/o FGFR4. Puede aumentarse la expresión de FGF19 y/o FGFR4. Se entiende que la ausencia de expresión de FGF19 y/o FGFR4 incluye niveles insignificantes o mínimos. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 en la muestra biológica de ensayo es mayor que aquella observada para una muestra biológica de control (o nivel de expresión de control o de referencia). En algunas realizaciones, La expresión de FGF19 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces mayor o mayor en la muestra biológica de ensayo que en la muestra biológica de control. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido de FGF19 se determina en un ensayo inmunohistoquímico ("IHC") para puntuar al menos 2 o más respecto de la intensidad de tinción. En algunas realizaciones, se determina la expresión del polipéptido de FGF en un ensayo IHC para puntuar al menos 1 o más o al menos 3 o más respecto de la intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 en la muestra biológica de ensayo es menor que la observada para una muestra biológica de control (o nivel de expresión de control).

En un aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una o más de las siguientes secuencias polinucleotídicas: GAT CCC CCC TCG TGA GTC TAG ATC TAT TCA AGA GAT AGA TCT AGA CTC ACG AGG TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO: 41); AGC TTT TCC AAA AAA CCT CGT GAG TCT AGA TCT ATC TCT TGA ATA GAT CTA GAC TCA CGA GGG GG (SEQ ID NO: 42); GAT CCC CGA ACC GCA TTG GAG GCA TTA TCA AGA GAA ATG CCT CCA ATG CGG TTC TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO: 43); o AGC TTT TCC AAA AAA GAA CCG CAT TGG AGG CAT TTC TCT TGA TAA TGC CTC CAA TGC GGT TCG GG (SEQ ID NO: 44).

#### 45 Breve descripción de las figuras

FIGURAS 1A y B: ilustran las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 1A6 anti-FGF19 humano. (A) Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4). (B) región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 8). Los aminoácidos se numeran de acuerdo con Kabat. Las posiciones de las HVR se ilustran en las figuras.

FIGURA 2: Se evaluó la expresión de ARNm de FGF19 y FGFR4 en muestras normales y de tumor de colon (A) y pulmón (B) mediante RT-PCR semi cuantitativa. Se normalizaron los valores usando la expresión de GAPDH y se compararon con la muestra de menor expresión para cada tejido. Imágenes representativas de iluminación de campo brillante (paneles de la izquierda) y de campo oscuro (paneles de la izquierda) de la hibridación *in situ* con ribosondas de FGF19 y FGFR4 y de inmunohistoquímica (IHC) de FGF19 (paneles inferiores) en adenocarcinoma de colon (C), carcinoma de pulmón de células escamosas (D) y carcinoma hepatocelular (E). Imágenes representativas de iluminación de campo brillante (paneles de la izquierda) y de campo oscuro (paneles de la izquierda) de la hibridación *in situ* con ribosondas de FGF19 y FGFR4 y de IHC de FGF19 (paneles inferiores) en nódulos de hígado cirrótico (F).

FIGURA 3: Expresión de ARNm de FGF19 y FGFR4 en líneas celulares de tumor y tejido de xenoinjerto. (A) El ARNm de FGF19 y de FGFR4 tenía una expresión relativa elevada en las líneas celulares de tumor de colon Colo205, SW620 y HCT116. Se evaluó la expresión de ARNm de FGF19 y FGFR4 usando RT-PCR semi cuantitativa. Se normalizaron los valores usando la expresión de GAPDH y se compararon con la línea celular de menor expresión para cada gen. (B) Transferencia de Western de proteínas de FGF19 y FGFR4 en un panel de líneas celulares de cáncer de colon. Se confirmó la expresión de proteína de FGF19 en líneas celulares de cáncer de colon mediante inmunoprecipitación y análisis de transferencia de Western. (C), (D) Se inoculó un

subconjunto de líneas celulares de cáncer de colon por vía subcutánea en ratones desnudos. Después de 3 semanas, se extirparon los tumores y se procesaron para inmunotinción de FGF19. Se muestran fotografías de campos representativos a 400X (C) y 400X con un recuadro de 600X (barra = 25  $\mu$ m) (D).

FIGURA 4: FGF19 unido a componentes del complejo de FGFR4. (A) Se incubaron proteínas de FGF19 y FGFR4 con proteoglicano de sulfato de heparina adsorbido en los micropocillos. La unión se detectó con anticuerpos específicos biotinilados seguido de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante y sustrato colorimétrico. (B) Se incubaron proteínas de FGF19 y FGF1 con heparina-agarosa y la lechada de gel se lavó con 1 ml de tampón de unión que contiene diversas concentraciones de NaCl. Las demás proteínas unidas a heparina-agarosa se eluyeron con tampón de muestra de SDS PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western. El carril de control (Cont.) representó la cantidad original de proteína cargada directamente sobre el gel. La proteína FGF19 tenía una especificidad de unión única por FGFR4 capturado sobre una fase sólida (C) o en solución (D). (E) Unión de proteína FGF19 a proteína FGFR4-Fc capturada en fase sólida en presencia de diversos glucosaminoglucanos (Sulf. Hep: sulfato de heparina; CS B: sulfato de condroitina B; CS A: sulfato de condroitina A; CS b: sulfato de condroitina C). (F) Unión de proteína FGF19 a proteína IgG para FGFR4 capturada en fase sólida en presencia de fragmentos de heparina de diversas longitudes. (G) Análisis de Scatchard de la unión de proteína  $^{125}$ I-FGF19 a proteína FGFR4-Fc capturada en fase sólida.

FIGURA 5: El anticuerpo monoclonal anti-FGF19 1A6 inhibió las actividades biológicas de FGF19 *in vitro*. (A) Unión de anticuerpos monoclonales a proteína FGF19 capturada en fase sólida. (B) Unión de proteína FGF19 a proteína FGFR4-Fc capturada en fase sólida en presencia de anticuerpos monoclonales ("mAb") anti-FGF19. (C) El tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 inhibió la activación de FGF19 de una ruta de señalización de FGF. (D) El tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 inhibió la represión de Cyp7 $\alpha$ 1 inducida por FGF19. Se trataron células HEPG2 incubadas durante toda la noche en medio sin suero con proteína FGF19 en presencia o ausencia de anticuerpos. Se evaluó la expresión de Cyp7 $\alpha$ 1 mediante RT-PCR semi cuantitativa usando cebadores y sondas específicos de genes y se normalizó a la expresión de GAPDH. (E) El tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 inhibió la migración celular de HCT116 promovida por FGF19. Se recubrió la superficie de cámaras de Boyden modificadas de 24 pocillos de porosidad de 8  $\mu$ m con colágeno de tipo 1. Se añadieron células en medio sin suero a la cámara superior. Se tiñeron y contaron las células que migraron a la cámara inferior después de la adición del mismo medio que contenía FGF19 y diversas concentraciones de mAb anti-FGF19 1A6. Se promediaron conjuntos de datos por triplicado para cada condición.

FIGURA 6: Identificación de epítomos reconocidos por anticuerpos anti-FGF19. Se incubó proteína FGF19 durante 2 h con anticuerpo acoplado a agarosa. La resina se lavó y digirió con tripsina durante toda la noche a 37 °C. La lechada del gel se lavó y se eluyeron y analizaron los péptidos unidos mediante MALDI-TOF-EM. (A) Análisis por espectrometría de masas de la fracción soluble de FGF19 digerido con tripsina unido a mAb 1A6 acoplado a agarosa. (B) Análisis por espectrometría de masas del péptido triptico de FGF10 eluido a partir de anticuerpo 1A6 acoplado a agarosa. (C) Análisis por espectrometría de masas del péptido triptico de FGF10 eluido a partir de anticuerpo 1A1 acoplado a agarosa. (D) Competición peptídica de mAb anti-FGF19 1D1 que se une a FGF10 capturado en fase sólida. Se incubó el mAb anti-FGF19 1D1 con FGF19-His capturada sobre placas recubiertas de níquel en presencia de péptidos que representan diversas porciones de la proteína FGF19. Se detectó la unión del anticuerpo con una IgG anti-ratón conjugada a HRP y sustrato cromogénico. (E) Mapeo del epítomo de 1A6 (indicado con una flecha) sobre el modelo de interacción FGF19-FGFR4. La superficie de FGFR4 se representa como una forma globular mientras que FGF19 se representa como un lazo.

FIGURA 7: El tratamiento con anticuerpo monoclonal de ratón anti-FGF19 1A6 inhibió el crecimiento de tumor de colon *in vivo*. Se inculó a ratones atímicos por vía subcutánea con  $5 \times 10^6$  células HCT1126 o Colo201. Se aleatorizó a los ratones portadores de tumores establecidos de volumen equivalente ( $\sim 100$  mm $^3$ ) en grupos y se los trató por vía intraperitoneal dos veces a la semana con mAb anti-FGF19 1A6 o un anticuerpo de control. Los resultados se proporcionan como media del volumen tumoral  $\pm$  dtm. Al finalizar los estudios, se extirparon los xenoinjertos de tumores de HCT117 y los xenoinjertos de tumores de Colo201 de ratones tratados con mAb anti-FGF19 1A6 o tratados con anticuerpo de control, se homogenizaron y se analizaron respecto de FGFR4, FRS2, ERK y activación de  $\beta$ -catenina mediante transferencia de Western. (A) Se inhibió el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon de HCT116 mediante tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control. (B) Se inhibió la fosforilación de FGFR4, FRS2, ERK y la activación de  $\beta$ -catenina en xenoinjertos de tumores de HCT116 tratados con mAb anti-FGF19 1A6. (C) Se inhibió el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon de Colo201 mediante tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control. (D) Se inhibió la fosforilación de FGFR4, FRS2, ERK y la activación de  $\beta$ -catenina en xenoinjertos de tumores de Colo201 tratados con mAb anti-FGF19 1A6. Para (A) y (C), las flechas indican la administración de tratamiento. Los resultados se proporcionan como media del volumen tumoral  $\pm$  DT.

FIGURA 8: Secuenciación de epítomo de anticuerpo. Procedimiento de disociación inducida por colisión y secuenciación de péptidos aislados usando un procedimiento de escisión de epítomo. (A) Secuencia de un péptido que comprende un epítomo del mAb anti-FGF19 1A6 (SEQ ID NO: 9). (B) Secuencia de un péptido que comprende un epítomo del mAb anti-FGF19 1A1 (SEQ ID NO: 10).

FIGURA 9: El anticuerpo con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FGF19 1A6 inhibió el carcinoma hepatocelular *in vivo* en un modelo animal de carcinoma hepatocelular transgénico para FGF19. Se trató a los ratones transgénicos para FGF19 con un anticuerpo de control o con el mAb anti-FGF19 1A6 y se recogieron los hígados para una evaluación a grandes rasgos (A). El análisis de MicroCT usando un triglicérido yodado para potenciar los hepatocitos demostró un volumen tumoral no potenciado aumentado en el hígado tratado con control frente al tratado con el mAb anti-FGF19 1A6 (B).

FIGURA 10: El tratamiento con proteína FGF19 promovió la migración celular de HCT116. Se recubrió la superficie de cámaras de Boyden modificadas de 24 pocillos de porosidad de 8  $\mu\text{m}$  con colágeno de tipo 1. Se añadieron células HCT116 en medio sin suero a la cámara superior. La cámara inferior se rellenó con el mismo medio que contenía diferentes concentraciones de FGF19 y se incubaron las placas a 37 °C. Al día siguiente, las células que migraron a la parte inferior del inserto se tiñeron y contaron bajo el microscopio. Se promediaron conjuntos de datos por triplicado para cada condición.

FIGURA 11: EL tratamiento con FGF19 indujo la fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina y provocó la pérdida de la unión de E-cadherina a  $\beta$ -catenina en la línea celular de cáncer de colon HCT116. Se trató a células cancerosas privadas de suero con vehículo ("veh") (control) o FGF19 a 25 y 100 ng/ml durante 10 minutos. Se determinó la fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina mediante inmunoprecipitación ("IP") e inmunotransferencia ("TW"). Se desnudó y volvió a sondar la misma transferencia usando un anticuerpo anti-E-cadherina y posteriormente volvió a sondarse para  $\beta$ -catenina total usando un anticuerpo anti- $\beta$ -catenina. Se muestran transferencias representativas de tres experimentos separados. Se determinó el análisis cuantitativo de fosforilación de  $\beta$ -catenina y de  $\beta$ -catenina unida a E-cadherina calculando la proporción entre la E-cadherina fosforilada y los niveles totales de  $\beta$ -catenina a partir de tres experimentos separados (valores medios  $\pm$  EE).

FIGURAS 12A y B: El tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 redujo los niveles de  $\beta$ -catenina activa en células HCT116. Las células se cultivaron en presencia de suero y se trataron con control (gp120) o mAb anti-FGF19 1A6 (ambos a 20  $\mu\text{g/ml}$ ) durante diversos intervalos de tiempo. (A) Se determinaron los niveles de  $\beta$ -catenina activa ("act- $\beta$ -cat") ( $\beta$ -catenina desfosforilada en N-terminal) mediante inmunotransferencia. Se desnudó la misma transferencia y volvió a sondarse para los niveles totales de  $\beta$ -catenina (" $\beta$ -cat"). Se muestran transferencias representativas de tres experimentos separados. (B) Análisis cuantitativo de los niveles de  $\beta$ -catenina activa 24 h después del tratamiento determinados calculando la proporción entre la  $\beta$ -catenina activa y los niveles de  $\beta$ -catenina total de tres experimentos separados (valores medios  $\pm$  EE). Se determinaron los niveles de  $\beta$ -actina como controles.

FIGURA 13: El tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 indujo la fosforilación en los restos de aminoácido Ser33/Ser37/Ser45 y Thr41 de  $\beta$ -catenina en células HCT116. Las células se cultivaron en presencia de suero y se trataron con MG132 (1 mM) durante 4 h seguido de tratamiento bien con control (gp120) o anticuerpo anti-FGF19 (1A6) (ambos a 20  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h. La fosforilación de  $\beta$ -catenina en Ser33/S37/S45 y Thr41 se analizó mediante inmunotransferencia. Se desnudó la misma transferencia y volvió a sondarse para  $\beta$ -catenina total. Se muestran transferencias representativas de tres experimentos separados. Se determinaron los niveles de  $\beta$ -actina como control.

FIGURA 14: El tratamiento con ARNhc dirigido a FGFR4 suprimió expresión de la proteína FGFR4 y de  $\beta$ -catenina activa en células HCT116. Los vectores *knockdown* para FGFR4 se construyeron diseñando y clonando secuencias de ARNhc en un sistema de vector de expresión retrovírico inducible. Se transfectaron los ADNc y se generaron líneas celulares estables que expresaban el ARNpi en células HCT116 usando selección de puromicina. Se trataron líneas celulares estables que comprendían ARNhc d control y ARNhc dirigido a FGFR4 con o sin doxiciclina (Dox) y se determinaron los niveles de proteína FGFR4 y de  $\beta$ -catenina activa mediante inmunoprecipitación e inmunotransferencia. Se muestran transferencias representativas de tres experimentos separados.

FIGURA 15: Cuantificación indirecta de los niveles de fosforilación N-terminal de  $\beta$ -catenina usando espectrometría de masas de trampa iónica lineal. Se llevó a cabo la espectrometría de masas en tándem dependiente de datos en el péptido N-terminal de  $\beta$ -catenina inmunoprecipitada de células tratadas con MG132 seguido de control (gp120) o mAb anti-FGF19 1A6 usando un instrumento de trampa iónica lineal tal como se describe en los ejemplos. Se generaron puntuaciones de correlación cruzada para cada espectro de CID y se determinó la abundancia relativa de los péptidos. Los datos se normalizaron a las intensidades de señal de otros péptidos no relacionados que no mostraron diferencia en las intensidades de señal respecto de las muestras tratadas y no tratadas.

FIGURA 16: El tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 redujo los niveles de transcripción de genes diana de Wnt en células de cáncer de colon. Se cultivaron células HCT116 en presencia de suero y se trataron con control (gp120) o anticuerpo 1A6 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 6 h. Se analizaron los niveles de expresión de genes diana de  $\beta$ -catenina (ciclina D1, CD44, E-cadherina y c-jun) mediante análisis Taqman. Los análisis de datos se llevaron a cabo usando Sequence Detector 1.6.3 (PE Applied Biosystems) y los resultados se normalizaron al nivel de expresión de RPL19.

## 55 Descripción detallada de la invención

Tal como se define en las reivindicaciones, la invención en el presente documento proporciona anticuerpos anti-FGF19, que son útiles para, por ejemplo, el tratamiento o la prevención de patologías asociadas a la expresión y/o la actividad de FGF19, tal como expresión y/o actividad aumentada o expresión y/o actividad no deseada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-FGF19 de la invención son útiles como reactivos para la detección y/o aislamiento de FGF19, tal como la detección de FGF19 en diversos tejidos y tipos celulares.

La invención proporciona además métodos para producir anticuerpos anti-FGF19, polinucleótidos que codifican

anticuerpos anti-FGF19 y células que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-FGF19.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la detección de FGF19 y/o FGFR4.

## 5 **Técnicas generales**

Las técnicas y procedimientos descritos o citados en el presente documento se entienden bien generalmente y se emplean de manera común usando metodologías convencionales por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL* y *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

### **Definiciones**

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que pueden interferir con 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) a más del 95 % en peso de anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry y más preferentemente a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácido N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, porque al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada se encuentra en una forma o configuración distinta a la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan normalmente el anticuerpo en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

Las expresiones "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat" y variantes de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la complicación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o a una inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente la misma", tal como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparador) de tal forma que un experto en la materia podría considerar que la diferencia entre los dos valores tenga poca o ninguna significación biológica y/o estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferentemente menos de aproximadamente un 50 %, preferentemente menos de aproximadamente un 40 %, preferentemente menos de aproximadamente un 30 %, preferentemente menos de aproximadamente un 20 %, preferentemente menos de aproximadamente un 10 % en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

La "afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por su constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la

técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen lentamente al antígeno y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. Las realizaciones ilustrativas específicas se describen a continuación.

En una realización, la "Kd" o el "valor de Kd" de acuerdo con la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) llevado a cabo con la versión Fab del anticuerpo de interés y su antígeno, tal como se describe mediante el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado y a continuación capturar el antígeno unido con una placa revestida de anticuerpo contra Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante toda una noche placas de microtitulación (Dyner) con 5  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de [ $^{125}\text{I}$ ]-antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incubaba entonces durante toda una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando se secan las placas, se añaden 150  $\mu\text{l}$ /pocillo de solución de centelleo (MicroScint-20; Packard) y las placas se contaron en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan una unión menor o igual al 20 % de la máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización, se mide la Kd o el valor de Kd usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un dispositivo BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con antígeno inmovilizado en microplacas CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5  $\mu\text{g/ml}$  (~0,2  $\mu\text{M}$ ) antes de la inyección a un caudal de 5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las medidas cinéticas se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las velocidades de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación BIAcore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio ( $K_{\text{d}}$ ) se calcula como la proporción  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . Véanse, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad de asociación sobrepasa los  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, puede determinarse la velocidad de asociación usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco 8000-series (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

También puede determinarse una "velocidad de asociación" o " $k_{\text{on}}$ " de acuerdo con la invención con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial usando un dispositivo BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con antígeno inmovilizado en microplacas CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5  $\mu\text{g/ml}$  (~0,2  $\mu\text{M}$ ) antes de la inyección a un caudal de 5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las medidas cinéticas se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las velocidades de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación BIAcore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio ( $K_{\text{d}}$ ) se calculó como la proporción  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . Véanse, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la velocidad de asociación sobrepasa los  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación se determina preferentemente usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco 8000-series (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada. El término "vector", tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido

nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse autónomamente en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinante" o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente.

Un "polinucleótido" o "ácido nucleico" tal como se usa de manera indistinta en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, puede conferirse la modificación a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la síntesis, tal como mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapones", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, pueden reemplazarse cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse mediante grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse a soportes sólidos o semi-sólidos. Los OH en los 5' y 3' terminales pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de tapado orgánicos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. También pueden derivatizarse otros hidroxilos a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-flúor- o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcares, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil ribósido. Pueden reemplazarse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR<sub>2</sub>" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en los que cada uno de R o R' es independientemente H o alquilo (C 1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos citados en el presente documento, incluyendo ADN y ARN.

Un "oligonucleótido", tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que, generalmente, pero no necesariamente, tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos puede aplicarse igual y por completo a los oligonucleótidos.

El término "FGF19" (de manera intercambiable citado "factor de crecimiento de fibroblastos 19"), tal como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido nativo o variante (ya sea nativo o sintético) de FGF19. La expresión "secuencia nativa" abarca específicamente a formas de origen natural o secretadas (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural. La expresión "FGF19 de tipo silvestre" se refiere generalmente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína FGF19 de origen natural. La expresión "secuencia de FGF19 de tipo silvestre" se refiere generalmente a una secuencia de aminoácidos encontrada en un FGF19 de origen natural.

El término "FGFR4" (de manera intercambiable citado "receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 4"), tal como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específica o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido nativo o variante (ya sea nativo o sintético) de FGFR4. La expresión "secuencia nativa" abarca específicamente a formas de origen natural o secretadas (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular),

formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural. La expresión "FGFR4 de tipo silvestre" se refiere generalmente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína FGFR4 de origen natural. La expresión "secuencia de FGFR4 de tipo silvestre" se refiere generalmente a una secuencia de aminoácidos encontrada en un FGFR4 de origen natural.

5 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de manera intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpo (tal como se describe en más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

15 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones del dominio variable difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más elevadamente conservadas de dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cada uno cuatro regiones FR, que en gran medida adoptan una configuración de  $\beta$ -lámina, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de, la estructura de la  $\beta$ -lámina. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestra varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

30 La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de combinación con antígeno y es todavía capaz de reticular antígeno.

35 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. En una especie de Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenaria, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente mediante un enlazante peptídico flexible de tal modo que las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse en una estructura "dímera" análoga a aquella en una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De manera colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

45 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto (o los restos de cisteína) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

55 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

60 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

65 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas las funciones asociadas normalmente con esa porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$  y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo

monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y por lo tanto mantiene la capacidad para unirse a un antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, mantiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión a complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Se usan y están abarcadas en el presente documento una serie de delineaciones de región hipervariable. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las que se usan más comúnmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, por su parte, se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" del modo siguiente: 24-36 (L1), 46-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 49-65 o 50 a 65 (H2) y 93-102 (H3) en la VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et al., anteriormente citado para cada una de estas definiciones.

Los restos "marco conservados" o "FR" son aquellos restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable, tal como se definen en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y las referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricas" tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Un anticuerpo humanizado, tal como se usa en el presente documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de scFv comprende además un enlazante polipeptídico entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que puede unirse de manera selectiva un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético. Preferentemente, el antígeno diana es un polipéptido.



El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con aquella de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se divulgan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante reordenamiento de los dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de restos de CDR y/o marco conservados se describe por: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

"la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que una Ig unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que porta un antígeno y posteriormente eliminar a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha eliminación. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede efectuarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337 o en la Patente de Estados Unidos n.º 6.737.056. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, La actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

Un "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa de FcR humano. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores para las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase la revisión M. en Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y regula la homeostasia de las inmunoglobulinas. El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. El contenido de esa publicación de patente se incorpora específicamente al presente documento por referencia. Véanse, también Shields et al. J. Biol Chem. 9(2): 6591-6604

(2001).

Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). Pueden ensayarse la unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano o en primates a los que se administran los polipéptidos variantes de Fc.

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase adecuada) que se unen a su antígeno afín. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 B1 y el documento WO99/51642. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente al presente documento por referencia. Véanse, también Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Un anticuerpo "bloqueante" o "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben de forma sustancial o completa la actividad del antígeno.

Una "muestra biológica" (denominada de manera intercambiable "muestra" o "muestra de tejido o celular") abarca diversos tipos de muestra obtenidas de un individuo y pueden usarse en un ensayo diagnóstico o de control. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como un espécimen de biopsia o cultivos tisulares o células procedentes de los mismos y la descendencia de las mismas. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier modo después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento respecto de determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos o su inclusión en una matriz semi sólida o sólida con fines de seccionado. La expresión "muestra biológica" abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido. La fuente de la muestra biológica puede ser tejido sólido tal como de un órgano fresco, congelado y/o conservado o una muestra o biopsia o aspirado de tejido; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido cefalorraquídeo, fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no se encuentren mezclados con el tejido de manera natural, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijativos, nutrientes, antibióticos o similares.

Para los fines del presente documento, se entiende que una "sección" de una muestra de tejido es una sola parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una fina lámina de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, se analiza la misma sección de tejido a nivel tanto morfológico como molecular o se analiza respecto tanto de proteínas como de ácidos nucleicos.

La palabra "marcador", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición que se conjuga o fusiona directamente o indirectamente a un reactivo, tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que se conjuga o fusiona. El marcador puede ser detectable en sí (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química del compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Un "medicamento" es un fármaco activo para tratar el trastorno en cuestión o sus síntomas o efectos secundarios.

Un "trastorno" o "enfermedad" es cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen dichas patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.

Las expresiones "trastorno de proliferación celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados a algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno de proliferación celular es cáncer.

"Tumor", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento y proliferación celular neoplásica, ya sea maligna o benigna y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, tal como se cita en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulados. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de este tipo de cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pituitaria, cáncer de esófago, astrocitoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma epidermoide pulmonar, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. La desregulación de la angiogénesis puede dar lugar a muchos trastornos que pueden tratarse mediante composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen afecciones tanto no neoplásicas como neoplásicas. Las neoplasias incluyen, pero sin limitación, aquellas descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen, pero sin limitación, hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras proliferativas, incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, rechazo de injerto corneal, neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante corneal y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SARD, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado a ictus agudo/lesión encefálica cerrada/traumatismo), inflamación sinovial, formación de pannus en AR, miositis osificante, formación de hueso hipertrófica, artrosis (OA), ascitis refractaria, enfermedad ovárica poliquística, endometriosis, enfermedades de fluidos en el 3<sup>er</sup> espacio (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, alumbramiento prematuro, inflamación crónica, tal como EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseada o aberrante (no cancerosa), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertrofiadas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, esclerodermia, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como aquella asociada a pericarditis) y efusión pleural.

La expresión trastornos de "emaciación" (por ejemplo, síndrome de emaciación, caquexia, sarcopenia) se refiere a trastornos causados por una pérdida de peso no deseada y/o no saludable o la pérdida de la masa celular del organismo. En ancianos así como en pacientes de SIDA y cáncer, la enfermedad de emaciación puede dar como resultado una pérdida de peso corporal no deseada, incluyendo los compartimentos tanto grasos como no grasos. Las enfermedades de emaciación pueden ser el resultado de una ingesta de comida inadecuada y/o de cambios metabólicos relacionados con enfermedades y/o el proceso de envejecimiento. Los pacientes de cáncer y los pacientes de SIDA, así como los pacientes que se someten a grandes cirugías o que tienen infecciones crónicas, enfermedades inmunológicas, hipertiroidismo, enfermedad de Crohn, enfermedad psicogénica, insuficiencia cardíaca crónica u otro traumatismo grave, padecen con frecuencia la enfermedad de emaciación, que en ocasiones también se cita como caquexia, un trastorno metabólico y en ocasiones alimentario. La caquexia se caracteriza además por hipermetabolismo e hipercatabolismo. Aunque la caquexia y la enfermedad de emaciación se usan frecuentemente de manera intercambiable para referirse a afecciones de emaciación, hay al menos un cuerpo de investigación que diferencia la caquexia del síndrome de emaciación como una pérdida de masa magra y particularmente, masa celular corporal (Mayer, 1999, J. Nutr. 129 (1S Suppl.):256S-259S). La sarcopenia, otro trastorno similar que puede afectar a individuos envejecidos, se caracteriza normalmente por la pérdida de masa muscular. La enfermedad de emaciación terminal, tal como se ha descrito anteriormente, puede desarrollarse en individuos que padecen caquexia o sarcopenia.

Tal como se usa en el presente documento, el "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando y se puede realizar tanto como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen evitar la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, la mejora o alivio de la patología y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Un "agente anti-angiogénesis" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una molécula de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseada, de forma directa o indirecta. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico, tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF, anticuerpos para receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Los agentes anti-angiogénesis también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc.

Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la tabla 3 que enumera terapia anti-angiogénica en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la tabla 2 que lista factores anti-angiogénicos); y, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la

5

Un "individuo" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales de deporte, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

10

Un "mamífero", para los fines del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

15

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

20

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo y de la capacidad de la sustancia/molécula agonista o antagonista para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista, se vea superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típica pero no necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

25

La expresión "agente citotóxico" cuando se usa en el presente documento 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, <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>R, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngicos, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos y los diferentes agentes antitumorales o anticancerosos divulgados a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

30

35

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetillolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocaptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sacrodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliceamicina, especialmente caliceamicina gamma 1I y caliceamicina omega 1I (véase, por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína de enediina relacionados, aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinomicinas, cromomicinas, dactinomicina, daunomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutimida, mitotano, trilostano; rellenedor de ácido

60

65

fólico, tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espiro-germanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ libre de Cremophor, formulaciones en nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de una pauta terapéutica con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que estimulan el crecimiento del cáncer y a menudo están en forma de tratamiento sistémico o para todo el organismo. Puede tratarse de las propias hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; tamoxifeno), EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® toremifeno; antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), tales como LUPRON® y ELIGARD®, acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestania, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX® anastrozol. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), DIDROCAL® etidronato, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato o ACTONEL® risedronato; así como troxacitabina (un análogo de citosina en el nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia genética, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; LURTOTECAN® inhibidor de topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa dual para ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa FGF19) bien *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tales como una célula que expresa FGF19) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un sitio distinto de fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también se extienden a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer, ambos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando su despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

La "doxorubicina" es un antibiótico de antraciclinas. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

La expresión "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o

5 inmunoadhesina (véanse las definiciones más adelante), que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o modificando por ingeniería genética recombinante el ácido nucleico que codifica al polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todos los K447 eliminados o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

**Composiciones de la invención y métodos para producir las mismas**

10 La presente invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-FGF19; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo anti-FGF19. Tal como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a FGF19 y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a FGF19. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente portadores adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica.

La invención también abarca realizaciones de anticuerpo y polinucleótido aislado. La invención también abarca realizaciones de anticuerpo y polinucleótido sustancialmente puro.

20 Los anticuerpos anti-FGF19 de la invención son preferentemente monoclonales. También están comprendidos dentro del ámbito de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos anti-FGF19 proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios convencionales, tales como digestión enzimática o pueden generarse mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos expuestos más adelante.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica la característica de que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos monoclonales anti-FGF19 de la invención pueden producirse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

35 En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos para FGF19 se generan normalmente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de FGF19 y un adyuvante. Puede prepararse el FGF19 usando métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, se describe más adelante la producción recombinante de FGF19. En una realización, se inmuniza a los animales con un derivado de FGF19 que contiene el dominio extracelular (ECD) de FGF19 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, se inmuniza a los animales con una proteína de fusión FGF19-IgG1. Normalmente se inmuniza a los animales frente a conjugados inmunogénicos o derivados de FGF19 con lípido A de monofosforilo (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y se inyecta por vía intradérmica la solución en múltiples sitios. Dos semanas después se refuerza a los animales. De 7 a 14 días después, se extrae sangre de los animales y se ensaya el suero respecto del título de anti-FGF19. Se refuerza a los animales hasta que alcanzan un máximo.

50 Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Entonces se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma no fusionadas parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando estas sustancias el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

60 Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan altos niveles de producción estable de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas y que sean sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores murinos MOPC-21 y MPC-11 disponibles a través del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU. y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles a través de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. También se han descrito líneas de mieloma

humano y de heteromiéloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

5 El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya respecto de la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra FGF19. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

10 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

20 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

25 Los anticuerpos anti-FGF19 de la invención pueden producirse mediante el uso de bibliotecas combinatorias para explorar respecto de clones de anticuerpo sintéticos con la actividad o las actividades deseadas. En principio, los clones sintéticos de anticuerpos se seleccionan explorando fagotecas que contienen fagos que muestran varios fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionadas a una proteína de envuelta del fago. Dichas fagotecas se panean mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y se separan de este modo de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones que se unen se eluyen entonces del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de exploración de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-FGF19 de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y las secuencias adecuadas de la región constante (Fc) descritas en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), Volúmenes 1-3.

40 El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de ellas de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que presentan en ambos casos tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios funcionales pueden mostrarse funcionalmente en el fago, bien como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que la VH y la VL están unidas covalentemente mediante un péptido corto flexible o como fragmentos Fab, en los que se fusionan cada una a un dominio constante e interactúa no covalentemente, tal como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Tal como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican el scFv y los clones de fago que codifican el Fab se citan colectivamente como "clones de fago de Fv" o "clones de Fv".

50 Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en fagotecas, que pueden explorarse a continuación para seleccionar clones de unión a antígeno, tal como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin exposición previa puede clonarse para proporcionar una sola fuente de anticuerpos humanos para una gran variedad de antígenos propios y no propios sin inmunización, tal como se describe por Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de forma sintética bibliotecas sin exposición previa clonando segmentos del gen V no reordenados procedentes de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias al azar para codificar las regiones CDR3 elevadamente variables y para lograr la reorganización *in vitro* tal como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

60 Se usan fagos filamentosos para mostrar fragmentos de anticuerpo mediante fusión a la proteína de envuelta menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden mostrarse como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL se conectan en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, tal como se describe por Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde el conjunto de una estructura Fab-proteína de recubrimiento se muestra sobre la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la envuelta de tipo silvestre, por ejemplo, tal como se describe en Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res.,

65

19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos se obtienen a partir de células inmunitarias recogidas de seres humanos o de animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-FGF19, se inmuniza al sujeto con FGF19 para generar una respuesta de anticuerpos y se recuperan células de bazo y/o células B circulantes u otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpo humano sesgada en favor de clones anti-FGF19 humano generando una respuesta de anticuerpo anti-FGF19 humano en ratones transgénicos que portan un conjunto de genes de inmunoglobulina humana funcionales (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógeno) de tal forma que la inmunización con FGF19 da lugar a células B que producen anticuerpos humanos contra FGF19. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas a anti-FGF19 puede obtenerse usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de FGF19, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad de FGF19 o adsorción de células a FGF19 marcado con fluorocromo seguida de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Como alternativa, el uso de células de bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpos posible y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que FGF19 no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan construcciones génicas de anticuerpo *in vitro*, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpo no reorganizados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse a partir de diversas especies animales, tales como seres humanos, ratón, rata, lagomorfos, luprinos, caninos, felinos, porcinos, bovinos, equinos y especies aviares, etc.

El ácido nucleico que codifica segmentos génicos variables de anticuerpo (incluyendo segmentos de VH y VL) se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas génicas de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores coincidentes con los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reorganizados tal como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), produciendo de este modo diversos repertorios génicos de V para su expresión. Los genes de V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados en el segmento J tal como se describe en Orlandi et al., (1989) y en Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder, tal como se describe en Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991) y los cebadores directos en la región constante, tal como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degeneración en los cebadores, tal como se describe en Orlandi et al., (1989) o en Sastry et al. (1989). Preferentemente, la diversidad de la biblioteca se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de gen V para amplificar todos los ordenamientos de VH y VL presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmunitaria, por ejemplo, tal como se describe en el método de Marks et al., J. Mod. Biol., 222: 581-597 (1991) o tal como se describe en el método de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción raros en el cebador de la PCR como un marcador en un extremo, tal como se describe en Orlandi et al., (1989) o mediante amplificación PCR adicional con un cebador marcado, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reorganizados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos génicos de V. La mayoría de los segmentos génicos de VH humanos se han clonado y secuenciado (comunicado en Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)) y se han mapeado (comunicado en Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle de H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios génicos de VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden producirse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle de H3 largo de una sola longitud, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado los segmentos de Vk y Vλ (comunicado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para producir repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios génicos de V sintéticos, basados en varios pliegues de VH y VL y de longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos con una diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN que codifican el gen V, pueden reorganizarse los segmentos del gen V de línea germinal *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpo pueden construirse combinando repertorios génicos de VH y VL juntos de varios modos. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores y los vectores se recombinan *in vitro*, por ejemplo, tal como se describe en Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993) o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). La



estrategia de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto mediante la eficiencia de la transformación en *E. coli*. Los repertorios de VH y VL no expuestos previamente se clonan por separado, uno en un vector de fagémido y el otro en uno de fago. Entonces se combinan las dos bibliotecas mediante la infección con fago de bacterias que contienen fagémido, de tal forma que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca se limita solamente por el número de células presentes (aproximadamente  $10^{12}$  clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de tal forma que los genes de VH y VL se recombinan en un solo replicón y se empaquetan conjuntamente en viriones de fago. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de varios anticuerpos de buena afinidad ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^8$  M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88: 7978-7982 (1991) o ensamblarse juntos mediante PCR y después clonarse, por ejemplo, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). El montaje PCR también puede usarse para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más, se usa "montaje PCR en célula" para combinar genes de VH y VL en linfocitos mediante PCR y después clonar repertorios de genes ligados, tal como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas nativas (ya sean naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  M<sup>-1</sup>), pero también puede imitarse la maduración por afinidad *in vitro* construyendo y volviendo a seleccionar a partir de bibliotecas secundarias, tal como se describe en Winter et al., (1994), anteriormente citado. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (comunicada en Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Además, la maduración por afinidad puede efectuarse mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando cebadores de PCR que portan secuencia al azar que sobrepasa la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y explorando en busca de clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un método para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación en fago con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorando en busca de mayor afinidad en varias rondas de reorganización de cadena, tal como se describe en Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de  $10^{-9}$  M.

La secuencia de ácido nucleico que codifica un FGF19 puede diseñarse usando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de FGF19. Como alternativa, puede usarse la secuencia de ADNc (o fragmentos de la misma). Se divulgan secuencias adicionales de FGF19 en, por ejemplo, NM\_022963 y Xie et al. (1999) Cytokine 11:729-735. Los ADN que codifican a FGF19 pueden prepararse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, síntesis química mediante cualquiera de los métodos descritos en Engels et al., Anew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tales como los métodos de triéster, fosfito, fosforamida y H-fosfonato. En una realización, se usan los codones preferidos por la célula hospedadora de expresión en el diseño del ADN que codifica a FGF19. Como alternativa, puede aislarse ADN que codifica FGF19 a partir de una biblioteca genómica o de ADNc.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica a FGF19, se une operablemente la molécula de ADN a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, en el que una célula hospedadora transformada con el vector reconoce a la secuencia de control. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y de control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora. El vector porta generalmente un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Se conocen vectores adecuados para la expresión en células hospedadoras procariontas y eucariotas y algunos se describen además en el presente documento. Pueden usarse organismos eucariotas, tales como levaduras o células procedentes de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica a FGF19 se une operablemente a una secuencia líder secretora que da como resultado la secreción del producto de expresión por la célula hospedadora en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder secretoras incluyen stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuada para su uso en el presente documento la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Las células hospedadoras se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos de la presente invención y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por parte de una célula hospedadora,

independientemente de que de hecho se exprese cualquier secuencia codificante. Los expertos habituales en la materia conocen numerosos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación por  $\text{CaPO}_4$  y electroporación. Se reconoce la transfección exitosa cuando se produce cualquier indicación del funcionamiento de este vector en la célula hospedadora. Se conocen bien en la técnica métodos para la transfección y algunos se describen además en el presente documento.

La transformación significa introducir ADN en un organismo de tal forma que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante un integrador cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se efectúa usando técnicas convencionales adecuadas para dichas células. Se conocen bien en la técnica métodos para la transformación y algunos se describen además en el presente documento.

Las células hospedadoras procariotas usadas para producir FGF19 pueden cultivarse tal como se describe de manera general en Sambrook et al., anteriormente citado.

Las células hospedadoras de mamífero usadas para producir FGF19 pueden cultivarse en diversos medios, lo que se conoce bien en la técnica y algunos de estos se describen en el presente documento.

Las células hospedadoras citadas en la presente divulgación abarcan células en cultivo *in vitro* así como células que se encuentran dentro de un animal hospedador.

La purificación de FGF19 puede lograrse usando métodos reconocidos en la técnica.

El FGF19 purificado puede unirse a una matriz adecuada, tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de metacrilato de hidroxilo, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nailon, vehículos neutros e iónicos y similares, para su uso en la separación cromatográfica por afinidad de clones de presentación en fago. La unión de la proteína FGF19 a la matriz puede lograrse mediante los métodos descritos en *Method in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica comúnmente empleada para unir ligandos de proteínas a matrices de polisacárido, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa implica la activación del vehículo con haluros de cianógenos y el posterior acoplamiento de las aminas alifáticas o aromáticas primarias a la matriz activada.

Como alternativa, puede usarse FGF19 para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresado en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en la clasificación de células o conjugarse a biotina para captura con perlas recubiertas con estreptavidina o usarse en cualquier otro método conocido en la técnica para panear bibliotecas de presentación en fagos.

Las muestras de la fagoteca se ponen en contacto con FGF19 inmovilizado en condiciones adecuadas para unir al menos una porción de las partículas del fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, fuerza iónica, la temperatura y similares se seleccionan para asemejarse a las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen mediante ácido, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991) o por álcalis, por ejemplo, tal como se describe en Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o mediante competición de antígeno de FGF19, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una sola ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden crecerse en cultivo bacteriano y someterse a rondas de selección adicionales.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y de si pueden unirse al antígeno múltiples fragmentos de anticuerpo a un solo fago simultáneamente. Los fagos con cinéticas de disociación rápidas (y débiles afinidades de unión) pueden retenerse mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y una elevada densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza al fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece que el fago que se ha disociado vuelva a unirse. La selección de anticuerpos con cinéticas de disociación lentas (y buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación en fago monovalente, tal como se describe en Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690 y una baja densidad de recubrimiento de antígeno, tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para FGF19. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, tal como se lleva a cabo en algunas de las técnicas de maduración por afinidad descritas anteriormente) es posible que de lugar a muchos mutantes, la mayoría que se unen al antígeno y unos pocos con afinidad mayor. Con FGF19 limitante, podría eliminarse por competición el fago raro de alta afinidad. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con exceso de FGF19 biotinilado, pero con FGF19 biotinilado a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para FGF19. Los fagos de unión de alta afinidad pueden capturarse entonces mediante perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan baja como dos veces a partir de un gran exceso de fagos con

menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación. También pueden seleccionarse por afinidad los clones anti-FGF19.

5 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones de Fv de presentación en fago de la invención se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las secuencias codificantes de la cadena ligera y pesada de interés a partir de un molde de hibridoma o de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfecta en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol Revs.*, 130: 151 (1992).

15 El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN adecuadas pueden obtenerse de Kabat et al., anteriormente citado) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes pueden obtenerse a partir de cualquier especie humana o animal. Se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" tal como se usa en el presente documento un clon de Fv procedente del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como un ser humano) y después fusionado a un ADN de región constante de otra especie animal para formar secuencias codificantes para cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de longitud completa "híbridas". En una realización preferida, se fusiona un clon de Fv procedente de un ADN variable humano a ADN de región constante humana para formar secuencias codificantes para todas las cadenas pesadas y/o ligeras humanas de longitud completa o parcial.

30 También puede modificarse el ADN que codifica el anticuerpo anti-FGF19 procedente de un hibridoma de la invención, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena ligera y pesada humana en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o de clon de Fv puede modificarse adicionalmente uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de clon de Fv o de clon de hibridoma de la invención.

#### **Fragmentos de anticuerpo**

40 La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. En determinados casos hay ventajas en cuanto al uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos.

45 Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítipo de unión a receptor salvajes se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las Patentes de Estados Unidos n.º 5.571.894; y 5.587.458. Los Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están libres de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino terminal o carboxilo terminal de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, anteriormente citado. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

65

**Anticuerpos humanizados**

La presente invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que sea más próxima a la del roedor se acepta como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco conservado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623.

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y muy sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

**Anticuerpos humanos**

Puede construirse anticuerpos anti-FGF19 humanos de la invención combinando clones de secuencias de dominio variable de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación in fago procedentes de ser humano con secuencias de dominio constante conocidas tal como se describe anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales anti-FGF19 humanos de la invención mediante el método de hibridoma. Se han descrito las líneas celulares del mieloma humano y del heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol, 7: 33 (1993).

También puede usarse el reordenamiento génico para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo de partida no humano. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitépica", se reemplazan bien la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano mediante técnicas de presentación in fago tal como se han descrito anteriormente con un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana

en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tal la retirada de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fago primario, es decir, el epítipo rige (deja su impronta) en la selección del compañero de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993).

- 5 A diferencia de la tradicional humanización de anticuerpos no humanos injertando las CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o de CDR de origen no humano.

### ***Anticuerpos biespecíficos***

- 10 Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para FGF19 y la otra es para cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítipos diferentes de la proteína FGF19. Los anticuerpos biespecíficos se pueden utilizar también para localizar agentes citotóxicos en células que expresan FGF19. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a FGF19 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o un hapteno de isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')<sub>2</sub>).

- 20 Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se efectúa normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es laboriosa y el rendimiento de producto es bajo. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991).

- 30 De acuerdo con una estrategia diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se transfectan de manera conjunta en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

- 45 En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

- De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico al de la cadena (o cadenas) lateral reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido por otras más pequeñas (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.

- 65 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los

anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la materia agentes reticulantes adecuados y se divulgan en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

- 5 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.
- 10
- 15 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')<sub>2</sub> totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como de provocar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.
- 20

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por medio de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

25

30

35

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

40

### **Anticuerpos multivalentes**

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos a los de clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en posición amino-terminal respecto de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-(X2)<sub>n</sub>-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazante flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende preferentemente además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

45

50

55

60

65

**Variantes de anticuerpo**

En algunas realizaciones, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Pueden introducirse las modificaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se produce la secuencia.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", tal como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de anticuerpos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales o distintas en o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque esté predeterminado el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí esté determinada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo barrido de ala o mutagénesis al azar en el codón o región diana y se explora la actividad deseada para las inmunoglobulinas expresadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos simples o múltiples de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Dicha alteración incluye eliminar uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de polipéptidos es generalmente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato en la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contiene una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente descritas (por ejemplo, sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también puede producirse mediante la adición de o la sustitución con, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).

En los casos donde el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se citan anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante en el carbohidrato unida a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y en la Patente de Estados Unidos n.º 6.602.684, Umana et al. Se comunican anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel et al. Véanse, también el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) referente a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana et al.) referente a moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

La variante de glucosilación preferida en el presente documento comprende una región Fc, en la que una estructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en esta que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los restos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US

- 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares *knockout*, tales como células CHO *knockout* para el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FU78 (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).
- 10 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la tabla 1 o como se describe adicionalmente a
- 15 continuación en referencia a clases de aminoácidos y se exploran los productos.

Tabla 1

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

- 20 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura del armazón polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:
- 25
- (1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
  - (2) hidrófilas neutras: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
  - 30 (3) ácidas: asp, glu;
  - (4) básicas: his, lys, arg;
  - (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y
  - 35 (6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 40 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental a partir del que se



generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones al producto génico III de M13 empacadas dentro de cada partícula. Entonces se exploran las variantes presentadas en fago respecto de su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se divulga en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariables candidatos para modificación, puede llevarse a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas explicadas en el presente documento. Una vez se han generado dichas variantes, se somete el panel de variantes a exploración, tal como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su posterior desarrollo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o de sitio dirigido), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo aquellas de una cisteína de bisagra. De acuerdo con esta descripción y con las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo usado en los métodos de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos pueden, sin embargo, mantener sustancialmente las mismas características necesarias para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden efectuarse determinadas alteraciones en la región Fc que darán como resultado unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas (es decir, aumentadas o disminuidas), por ejemplo, tal como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); Patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; Patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes en la región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente al presente documento por referencia. Véanse, también Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que son responsables de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se han descrito en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 B1, documento WO99/5164. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente al presente documento por referencia. Véanse, también Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

### ***Derivados de anticuerpos***

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si se une más de un polímero, pueden tener moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

**Exploración de anticuerpos con propiedades deseadas**

Los anticuerpos de la invención se unen a FGF19 y en algunas realizaciones, pueden modular uno o más aspectos de los efectos asociados a FGF19, incluyendo, pero sin limitación, la activación de FGFR4, la señalización molecular aguas abajo de FGFR4, la alteración de la unión de FGFR4 a FGF19, la multimerización de FGFR4, la expresión de un gen de CYP7 $\alpha$ 1, la fosforilación de FGFR4, MAPK, FRS2 y/o ERK2, la activación de  $\beta$ -catenina, la migración celular promovida por FGF19 y/o la alteración de cualquier ruta biológica de FGF19 y/o FGFR4 biológicamente relevante y/o el tratamiento y/o prevención de un tumor, un trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de FGF19 (tal como expresión y/o actividad aumentada de FGF19).

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse adicionalmente mediante una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión de papaína.

En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos producidos en el presente documento se analizan respecto de su actividad biológica. En algunas realizaciones, se prueban los anticuerpos de la presente invención respecto de su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y que pueden usarse en el presente documento incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de competición directa o indirecta usando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente asociado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos de fluorescencia e inmunoensayos de proteína A. Se proporcionan ensayos de unión a antígeno ilustrativos más adelante en la sección de ejemplos.

En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-FGF19 que compiten con un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia: DIKMTQSPSSMYASLGERTVTPCKASQDINSFLSWFQQKPKGSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSL EYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO: 4) y un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia: QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSKQ VFFKMNSLLANDTAIFYCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 8) por la unión a FGF19. Dichos anticuerpos competidores incluyen anticuerpos que reconocen un epítipo de FGF19 que es igual que o que se solapa con el epítipo de FGF19 reconocido por el anticuerpo. Dichos anticuerpos competidores pueden obtenerse explorando sobrenadantes de hibridoma anti-FGF19 respecto de la unión a FGF19 en competición con anticuerpo marcado que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia: DIKMTQSPSSMYASLGERTVTPCKASQDINSFLSWFQQKPKGSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSL EYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO: 4) y un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia: QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFISRLSITKDNSKSKQ VFFKMNSLLANDTAIFYCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 8). Un sobrenadante de hibridoma que contiene anticuerpo competidor reducirá la cantidad de anticuerpo unido marcado detectada en la mezcla de unión de competición objeto en comparación con la cantidad de anticuerpo unido marcado detectado en una mezcla de unión de control que contiene anticuerpo irrelevante (o sin anticuerpo). Son adecuados cualquiera de los ensayos de unión de competición descritos en el presente documento para su uso en el procedimiento anterior.

Pueden obtenerse anticuerpos anti-FGF19 de la invención que poseen las propiedades descritas en el presente documento mediante la exploración de clones de hibridoma anti-FGF19 respecto de las propiedades deseadas mediante cualquier método conveniente. Por ejemplo, si se desea un anticuerpo monoclonal anti-FGF19 que bloquea o no bloquea la unión de FGFR4 a FGF19, el anticuerpo candidato puede ensayarse en un ensayo de competición de unión. Los ensayos de competición se conocen bien en la técnica y se describe uno de dichos ensayos en los ejemplos.

Se conocen en la técnica otros ensayos funcionales para determinar la capacidad inhibidora de los anticuerpos anti-FGF19, algunos de los cuales se ejemplifican en el presente documento.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla anticuerpos alterados que poseen algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que los convierte en candidatos deseables en aplicaciones donde la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante pero algunas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En determinadas realizaciones, se miden las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida para asegurarse de que solo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a Fc $\gamma$ R (careciendo análogamente de actividad ADCC), pero que mantiene la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de

Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, La actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Las determinaciones de la unión a FcRn y del aclaramiento/semivida *in vivo* también se pueden llevar a cabo usando métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos alterados que poseen funciones efectoras aumentadas y/o semivida aumentada.

### 15 **Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes**

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica al anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Hay disponibles muchos vectores. La selección del vector depende, en parte, de la célula hospedadora que se va a usar. En general, las células hospedadoras preferidas son de origen procarionta o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes pueden obtenerse a partir de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariontas:

#### 30 *i. Construcción del vector*

Las secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención pueden obtenerse usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, se insertan las secuencias que codifican los polipéptidos en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariontas. Pueden usarse muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica para los fines de la presente invención. La selección de un vector adecuado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula hospedadora concreta que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo o ambas) y de su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que resida. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora en conexión con estos hospedadores. El vector porta generalmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido procedente de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y a tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos pueden contener también o modificarse para que contengan, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., la Patente de Estados Unidos n.º 5.648.237.

Además, pueden usarse vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que sean compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en conexión con estos hospedadores. Por ejemplo, puede usarse un bacteriófago, tal como λGEM.TM.-11 para producir un vector recombinante que pueda usarse para transformar a células hospedadoras susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariontas se encuentran normalmente dentro de dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la

presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente a ADN ce cistrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor del ADN de origen mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Pueden usarse tanto secuencias promotoras nativas como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y rendimientos superiores de gen diana expresado en comparación con el promotor del polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotor de  $\beta$ -galactamasa y de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Se han publicado sus secuencias nucleotídicas, permitiendo de este modo que un trabajador experto los ligue de manera operativa a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) usando enlazantes o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción necesario.

En un aspecto de la invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de secuencia de señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada para los fines de esta invención debe ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para células procariotas que no reconocen y procesan las secuencias de señal nativas para polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal de procariotas seleccionada, por ejemplo, entre el grupo que consiste en líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, *lpp* o enterotoxina estable al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias de señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora y por lo tanto no requiere de la presencia de secuencias de señal de secreción en cada cistrón. A este respecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Determinadas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas *trxB* de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo un plegamiento y ensamblaje correcto de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para la expresión de anticuerpos de la invención incluyen arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos Gram-negativos y Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se usan células Gram-negativas. En una realización, se usan células de *E. coli* como hospedadores para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; n.º de Depósito de la ATCC 27.325) y derivados de las mismas, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110  $\Delta$ hfu $\Delta$ ( $\Delta$ ton $\Delta$ ) ptr3 lac lq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de Estados Unidos n.º 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar la bacteria adecuada teniendo en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* de manera adecuada como hospedadores cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Típicamente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y pueden incorporarse de manera deseable inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

#### ii. Producción de anticuerpo

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea necesario para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de tal forma que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante un integrador cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se efectúa usando técnicas convencionales adecuadas para dichas células.

Generalmente se usa el tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es la electroporación.

- 5 Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los suplementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, seleccionado basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir de manera selectiva el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina.

También puede incluirse cualquier suplemento necesario más allá de fuentes de carbono, nitrógeno y de fosfato inorgánico a concentraciones adecuadas introducidas solas o como una mezcla con otro suplemento o medio, tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferentemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, aún más preferentemente de aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH en el intervalo de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente desde aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,4 y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Puede usarse otros diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas implica normalmente romper al microorganismo, generalmente mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, pueden eliminarse los restos celulares o células completas mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse en el medio de cultivo y aislarse a partir del mismo. Pueden eliminarse las células del cultivo y filtrarse y concentrarse el sobrenadante de cultivo para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos conocidos comunes, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Hay disponibles varios procedimientos de fermentación a gran escala mediante lote alimentado para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, referentemente de aproximadamente 1.000 litros a aproximadamente 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan hélices agitadoras para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador tiene una capacidad volumétrica de no más de aproximadamente 100 litros y puede variar desde aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, se inicia la inducción de la expresión de proteínas después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, en cuyo estado las células se encuentran en fase casi estacionaria. Puede usarse diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, tal como se conoce en la técnica y como se describe anteriormente. Las células pueden crecer durante periodos más cortos antes de la inducción. Normalmente se induce a las células durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción mayor o menor.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de la fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento adecuado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para cotransformar a las células hospedadoras procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento adecuado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen et al., (1999) J Bio Chem 274:19601-19605;

Georgiou et al., Patente de Estados Unidos n.º 6.083.715; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

5 Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse determinadas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse las cepas de células hospedadoras para efectuar mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, 10  
OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Hay disponibles algunas cepas de *E. coli* deficientes para proteasas y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), anteriormente citado; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos n.º 5.264.365; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos n.º 5.508.192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72(1996).

15 En una realización, Las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se usan como células hospedadoras en el sistema de expresión de la invención.

### iii. Purificación de anticuerpos

20 Pueden emplearse métodos convencionales de purificación de enzimas conocidos en la materia. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatografía, SDS-PAGE, precipitación por sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

25 En un aspecto, Se usa proteína A inmovilizada sobre una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida sobre la que se inmoviliza la proteína A es preferentemente una 30  
columna que comprende una superficie de vidrio o de sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia inespecífica de contaminantes.

35 En la primera etapa de purificación, se aplica la preparación procedente del cultivo celular tal como se ha descrito anteriormente sobre la fase sólida inmovilizada en proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. Entonces se lava la fase sólida para eliminar contaminantes unidos de manera inespecífica a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

### b. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas:

40 Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

#### 45 (i) Componente de secuencia de señal

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido de 50  
interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que se reconozca y procese (es decir, que se escinda por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. En la expresión celular en mamífero, están disponibles las secuencias de señal de mamífero, así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

55 El ADN para dicha región precursora está ligado en marco de lectura al ADN que codifica al anticuerpo.

#### (ii) Origen de replicación

60 En general, no es necesario un componente de origen de replicación para los vectores de expresión en mamífero. Por ejemplo, puede usarse normalmente el origen de SV40 solo porque contiene al promotor temprano.

#### (iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador de 65  
selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas de complemento, en los casos donde sean relevantes o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles en un medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman de manera satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

5 Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneina I y II, preferentemente genes de metalotioneina de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

10 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora adecuada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

15 Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente células hospedadoras que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas conjuntamente con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador de selección, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la Patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

*(iv) Componente promotor*

25 Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operablemente al ácido nucleico del polipéptido de anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión de eucariotas.

35 La transcripción del polipéptido de anticuerpo a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedadora.

40 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la Patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978. Como alternativa, puede usarse como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

*(v) Componente de elemento potenciador*

50 La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta normalmente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$  fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) acerca de elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector a una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido de anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

60 *(vi) Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas contendrán normalmente también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están fácilmente disponibles a partir de las regiones 5' y en ocasiones 3' no traducidas de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción

no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/1102 y el vector de expresión divulgado en este.

5 (vii) *Selección y transformación de células hospedadoras*

Las células hospedadoras para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea celular de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para 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 ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea celular de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea necesario para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

25 (viii) *Cultivo de células hospedadoras*

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en varios medios. Son adecuados los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), las Patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la Solicitud de Patente de Estados Unidos 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco de GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede también introducirse en concentraciones adecuadas que serán conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, el pH y similares, son aquellas usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión y serán evidentes para los expertos en la materia.

45 (ix) *Purificación de anticuerpo*

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos en partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse anticuerpos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación 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 que están basados en las cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  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  $\gamma 3$  humana (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. En los casos donde el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase reversa,



cromatografía sobre sílice, cromatografía en hepatina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

- 5 Después de una etapa (o etapas) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, efectuada preferentemente a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

## 10 **Inmunconjugados**

15 La invención también proporciona inmunconjugados (denominados indistintamente "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento conjugados a 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, fúngicos, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

20 El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para eliminar o inhibir a las células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; Patente de Estados Unidos 4.975.278) permite el suministro dirigido del resto de fármaco a los tumores y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles de toxicidad inaceptables para las células normales así como las células tumorales que se pretende eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (15 de marzo de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506). Se busca de este modo la máxima eficacia con una toxicidad mínima. Se han comunicado tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina de la difteria, toxinas de plantas, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al., (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliceamicina (Lode et al., (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan a anticuerpos grandes o a ligandos de receptores de proteínas.

- 40 ZEVALIN® (ibrutumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal de IgG1 kappa dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y un radioisótopo de <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y unido mediante un quelante enlazante de tiourea (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al., (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma de células B no Hodgkin (NHL), la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo para CD33 hu unido a caliceamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patentes de Estados Unidos n.º 4970198, 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC242 unido a través del enlazante disulfuro SPP al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, ha pasado a ensayos de Fase II para el tratamiento de cáncer que expresan CanAg, tales como de cánceres de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Se conjugaron los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, a los anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en neoplasias malignas hematológicas) (Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

- 60 Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de inmunconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, más arriba). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina,

restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véanse, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Hay disponibles una serie de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ . Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se preparan usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, tal como se describe en Vitetta et al, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/1102.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliceamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas y tricotecenos y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

#### i. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos n.º 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos de fármaco de maitansinoides son restos de fármacos atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco ya que son: (i) relativamente accesibles para prepararlos mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos fermentados, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante enlazantes no disulfuro a anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para producir los mismos y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1, cuyas divulgaciones se han incorporado expresamente al presente documento por referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se observó que el conjugado era elevadamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo *in vivo* de crecimiento tumoral. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazante disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que pudo aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica menor en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan uniéndose químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 (cuya divulgación se incorpora expresamente al presente documento por referencia). Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciaría la citotoxicidad frente al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 y en las demás patentes y publicaciones no de patente citadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

Se conocen muchos grupos de enlace en la técnica para producir conjugados de anticuerpo-maitansinol, incluyendo, por ejemplo, aquellos divulgados en la Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 234 B1,

- Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) y la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004, cuyas divulgaciones se han incorporado expresamente al presente documento por referencia. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC pueden prepararse tal como se divulga en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas o grupos lábiles a esterases, tal como se divulgan en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Los grupos enlazantes adicionales se describen e ilustran en el presente documento.
- Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.
- El enlazante puede unirse a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

#### ii. Auristatinas y dolastatinas

- En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolastatina, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos n.º 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis de GTP y con la división nuclear y celular (Woyke et al., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatinas o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N-terminal (amino) o del extremo C-terminal (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

- Las realizaciones a modo de ejemplo de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal DE y DF, divulgados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", n.º de Serie de Estados Unidos 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004, cuya divulgación se incorpora expresamente por referencia en su totalidad.

- Típicamente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schroder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármacos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: los documentos US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; and Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", n.º de Serie de Estados Unidos 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad (que divulga, por ejemplo, enlazantes y métodos para preparar compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazantes).

#### iii. Caliceamicina

- En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas de caliceamicina. La familia de antibióticos de caliceamicina es capaz de producir rupturas en el ADN bicatenario a concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de caliceamicina, véanse las Patentes de Estados Unidos n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliceamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación,  $\gamma_1'$ ,  $\alpha_2'$ ,  $\alpha_3'$ , N-acetil- $\gamma_1'$ , PSAG y  $\theta_1'$  (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos de American Cyanamid anteriormente mencionadas). Otro fármaco antitumoral al que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliceamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes

mediante internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

#### iv. Otros agentes citotóxicos

- 5 Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse a los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos n.º 5.877.296).
- 10 Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véanse, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN, tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

- 20 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo elevadamente radioactivo. Está disponible varios isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>212</sup>Pb e isótopos radiactivos de Lu; Cuando se usa el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo, <sup>99m</sup>Tc o <sup>123</sup>I
- 25 o un marcador de espín para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como obtención de imágenes por resonancia magnética, IMR), tal como de yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13 nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

- 30 Los marcadores radioactivos u otros puede incorporarse en el conjugado mediante modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como <sup>99m</sup>Tc o <sup>123</sup>I, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re y <sup>111</sup>In puede unirse mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al., (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)
- 35 describe detalladamente otros métodos.

- Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, tal como se describe en Vitetta et al, Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazante puede ser un "enlazante escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico a la célula. Por ejemplo, se puede utilizar una molécula enlazadora lábil en medio ácido, una molécula enlazadora sensible a peptidasa, una molécula enlazadora fotolábil, una molécula enlazadora que contiene dimetilo o disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131
- 40 (1992); Patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

- Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, a través de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.
- 55

#### v. Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

- 60 En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazante (L). La Fórmula I de ADC puede prepararse mediante varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, afecciones y reactivos conocidos por aquellos expertos en la técnica, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazante bivalente, para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazante bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción
- 65

con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.



5

10

15

El enlazante puede estar compuesto de uno o más componentes enlazantes. Los componentes enlazantes a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil)amidobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazantes adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", n.º de Serie de Estados Unidos 10/983.340), presentado el 5 de noviembre de 2004, cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

20

25

En algunas realizaciones, el enlazante puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes enlazantes de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ilustrativos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ilustrativos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un enlazante de aminoácido incluyen aquellos de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes enlazantes de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en cuanto a su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D o una proteasa de plasmína.

30

35

40

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína y (iv) grupos hidroxilo o amino del azúcar donde se glucosila el anticuerpo. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos o restos enlazantes y reactivos enlazantes incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupo maleimido. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazantes mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará entonces, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

45

50

55

Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco enlazante. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazantes o restos de fármacos. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidada o meta-peryodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos adecuados sobre el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghergan y Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Se puede hacer reaccionar dicho aldehído con un resto de fármaco o nucleófilo enlazante.

60

65

Del mismo modo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazantes y reactivos enlazantes incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupo maleimido.

Como alternativa, puede producirse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La sección de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado bien adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazante que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización

en el pre-direccionamiento al tumor en administrándose el conjugado de anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente eliminador y la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

## 5 **Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su almacenaje mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones desecadas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos 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 en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes en combinación de manera adecuada en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metil metacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se han descrito en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000),

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol de vinilo)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de  $\gamma$ -etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

## **Usos**

Un anticuerpo de la presente invención puede usarse en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

La invención proporciona métodos y composiciones útiles para modular patologías asociadas a la expresión y/o la actividad de FGF19 y/o FGFR4, tal como expresión y/o actividad aumentada o expresión y/o actividad no deseada, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la patología se asocia a la expresión aumentada de FGF19 y la patología comprende colestasis o desregulación del metabolismo de ácidos biliares.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular asociado a la expresión y/o la actividad aumentada de FGF19, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

10 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular asociado a la expresión y/o actividad aumentada de FGFR4, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

15 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar y/o prevenir un trastorno hepático, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el trastorno hepático es cirrosis.

20 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar y/o prevenir un trastorno de emaciación, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.

25 Se entiende que puede usarse cualquier anticuerpo anti-FGF19 adecuado en los métodos de tratamiento, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se usa cualquier anticuerpo anti-FGF19 descrito en el presente documento para el tratamiento.

30 Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden unirse a antígenos de otras especies. Por consiguiente, los anticuerpos pueden usarse para la actividad de unión a un antígeno específico, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que reacciona de manera cruzada un anticuerpo de la invención (por ejemplo, chimpancé, babuino, títí común, macaco y mono Rhesus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir las actividades del antígeno poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno de tal forma que se inhibe la actividad del antígeno. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

35 En una realización, puede usarse un anticuerpo de la invención en un método para unirse a un antígeno en un individuo que padece un trastorno asociado a la expresión y/o actividad aumentada del antígeno, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de tal forma que se une al antígeno en el sujeto. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une el anticuerpo de la invención. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante la administración del antígeno o mediante la expresión de un transgén del antígeno). Puede administrarse un anticuerpo de la invención a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, puede administrarse un anticuerpo de la invención a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que reacciona de manera cruzada la inmunoglobulina (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con fines veterinarios o como modelo animal para una enfermedad humana. En referencia a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayando dosificaciones y duraciones de la administración).

50 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retrasar la progresión de, prevenir/retrasar la reaparición de, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas a la expresión y/o la actividad de una o más moléculas de antígeno.

55 En determinadas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une se internaliza por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la eliminación de la célula diana a la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con la polimerización de microtúbulos. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos indicados en el presente documento (tales como un maitansinoide, auristatina, dolastatina o caliceamicina), un isótopo radiactivo o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

60 En cualquiera de los métodos en el presente documento, se puede administrar al sujeto o paciente conjuntamente con el anticuerpo del presente documento una cantidad eficaz de un segundo medicamento (en donde el anticuerpo en el presente documento es un primer medicamento), que es otro agente activo que puede tratar la afección en el sujeto que requiere de tratamiento. Por ejemplo, puede administrarse conjuntamente un anticuerpo de la invención con otro anticuerpo, agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), agentes anti-angiogénicos, agentes inmunosupresores, citocinas, antagonistas de citocinas y/o agentes inhibidores del

crecimiento. El tipo de dicho segundo medicamento depende de diversos factores, incluyendo el tipo de trastorno, tal como cáncer o un trastorno autoinmunitario, de la gravedad de la enfermedad, del estado y edad del paciente, del tipo y la dosis del primer medicamento empleado, etc.

5 En el caso de que el anticuerpo de la invención inhiba el crecimiento tumoral, por ejemplo, puede ser particularmente deseable combinarlo con otros uno o más agentes terapéuticos que también inhiban el crecimiento tumoral. Por ejemplo, puede combinarse un anticuerpo de la invención con un agente anti-angiogénico, tal como un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN®) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN®  
10 trastuzumab o un anticuerpo anti-HER2 que se une al dominio II de HER2, tal como el anticuerpo anti-HER2 OMNITARG™ pertuzumab) en una pauta de tratamiento, por ejemplo, en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. Como alternativa o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo, irradiación de haz externo o terapia con un agente marcado radiactivamente, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen la administración combinada  
15 (en donde los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede tener lugar antes de y/o después de la administración de la terapia o las terapias adjuntas. Además, se espera que la combinación de un anticuerpo de la presente invención con un agente relativamente no citotóxico, tal como otra molécula biológica, por ejemplo, otro anticuerpo, pueda reducir la citotoxicidad frente a combinar el anticuerpo con un agente quimioterapéutico u otro agente que sea altamente tóxico para las células.  
20

El tratamiento con una combinación del anticuerpo en el presente documento con uno o más segundos medicamentos da como resultado preferentemente una mejora en las manifestaciones o síntomas del cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede dar como resultado una mejora en la supervivencia (supervivencia general y/o  
25 supervivencia libre de progresión) en relación a un paciente tratado únicamente con el segundo medicamento (por ejemplo, únicamente un agente quimioterapéutico) y/o puede dar como resultado una respuesta objetiva \*(parcial o completa, preferentemente completa). Además, el tratamiento con la combinación de un anticuerpo del presente documento y uno o más segundos medicamentos da como resultado preferentemente un beneficio terapéutico aditivo y más preferentemente sinérgico (o más que aditivo) para el paciente. Preferentemente, en este método de combinación, el tiempo entre al menos una administración del segundo medicamento y al menos una administración del anticuerpo del presente documento es de aproximadamente un mes o menos, más preferentemente, de aproximadamente dos semanas o menos.  
30

Para el tratamiento de cánceres, el segundo medicamento es preferentemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocinas, radioterapia citotóxica, corticoesteroide, anti-emético, vacuna para el cáncer, analgésico, agente anti-vascular y/o agente inhibidor del crecimiento. El agente citotóxico incluye un agente que interactúa con ADN, los antimetabolitos, los inhibidores de topoisomerasa I o II o el inhibidor del huso o agentes estabilizantes (por ejemplo, preferentemente alcaloides de la vinca, más  
35 preferentemente seleccionados entre vinblastina, desoxivinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vinepidina, vinfosiltina, vinzolidina y vinfunina) o cualquier agente usado en quimioterapia, tal como 5-FU, un taxano, doxorubicina o dexametasona.  
40

En otra realización, el segundo medicamento es otro anticuerpo usado para tratar cánceres, tales como aquellos dirigidos contra el dominio extracelular del receptor de HER2/neu, por ejemplo, trashizumab o uno de sus fragmentos funcionales, inhibidor pan-HER, un inhibidor de Src, un inhibidor de MEK o un inhibidor de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR (tal como uno que inhiba la actividad de tirosina cinasa del EGFR), que es preferentemente el anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado quimérico de ratón-humano C225 o un anticuerpo humanizado procedente de este anticuerpo 225 o agentes naturales derivados, dianilinoftalamidas, pirazolo o  
45 pirrolopiridopirimidinas, quinazolininas, gefitinib, erlotinib, cetuximab, ABX-EFG, canertinib, EKB-569 y PKI-166) o un inhibidor dual de EGFR/HER-2, tal como lapatanib. Los segundos medicamentos adicionales incluyen alemtuzumab (CAMPATH™), FavID (IDKLH), anticuerpos para CD20 con glucosilación alterada, tales como GA-101/GLYCART™, oblimersen (GENA SENSE™), talidomida y análogos de los mismos, tales como lenalidomida (REVLIMID™), imatinib, sorafenib, ofatumumab (HUMAX-CD20™), anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, SGN-40 y anticuerpo anti-  
50 CD80, por ejemplo, galiximab.  
55

El agente anti-emético es preferentemente clorhidrato de ondansetrón, clorhidrato de granisetron, metoclopramida, domperidona, haloperidol, ciclizina, lorazepam, proclorperazina, dexametasona, levomepromazina o tropisetron. La vacuna es preferentemente ADN de GM-CSF y vacunas basadas en células, vacuna de células dendríticas, vacunas víricas recombinantes, vacunas de proteína de choque térmico (HSP), vacunas tumorales alogénicas o autólogas. El agente analgésico es preferentemente ibuprofeno, naproxeno, trisalicilato de colina y magnesio o clorhidrato de oxicodona. El agente anti-vascular es preferentemente bevacizumab o rhuMAb-VEGF. Los segundos medicamentos adicionales incluyen agentes anti-proliferativos, tales como inhibidores de farnesil protein transferasa, inhibidores anti-VEGF, inhibidores de p53 o inhibidores de PDGFR. El segundo medicamento del presente documento también  
60 incluye terapia biológica dirigida, tal como tratamiento con anticuerpos así como terapia dirigida de molécula pequeña, por ejemplo, contra determinados receptores.  
65



Se han identificado y se conocen muchos agentes anti-angiogénicos, incluyendo aquellos listados en el presente documento, por ejemplo, listados en la sección "Definiciones" y en, por ejemplo, Carmeliet y Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Véanse también la Solicitud de Estados Unidos US 200330055006. En una realización, se usa anticuerpo anti-FGF19 en combinación con un anticuerpo (o fragmento) neutralizante anti-VEGF y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear a VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosinas cinasas de VEGFR (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF, variantes de antagonistas de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa o adicionalmente, pueden administrarse conjuntamente dos o más inhibidores de la angiogénesis al paciente además de antagonista de VEGF u otro agente. En cierta realización, pueden administrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes anti-cáncer en combinación con anticuerpo anti-FGF19, el antagonista de VEGF y un agente anti-angiogénico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en el presente documento se han descrito anteriormente, por ejemplo, en la definición de "agente quimioterapéutico".

Los segundos medicamentos a modo de ejemplo incluyen un agente alquilante, un antagonista de folato, un antagonista de pirimidina, un antibiótico citotóxico, un compuesto de platino o un compuesto basado en platino, un taxano, un alcaloide de la vinca, un inhibidor de c-Kit, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor anti-angiogénico, tal como un inhibidor anti-VEGF, un inhibidor de HER-2, un inhibidor de EGFR o un inhibidor dual de EGFR/HER-2 cinasa, un antiestrógeno, tal como fulvestrant y un agente de terapia hormonal, tal como carboplatino, cisplatino, gemcitabina, capecitabina, epirrubicina, tamoxifeno, un inhibidor de aromatasas y prednisona. Lo más preferentemente, el cáncer es cáncer colorrectal y el segundo medicamento es un inhibidor de EGFR, tal como erlotinib, un inhibidor anti-VEGF, tal como bevacizumab o es cetuximab, irinotecán, irinotecán o FOLFOX o el cáncer es cáncer de mama y el segundo medicamento es un modulador anti-estrógenos, tal como fulvestrant, tamoxifeno o un inhibidor de aromatasas, tal como letrozol, exemestano o anastrozol o es un inhibidor de VEGF, tal como bevacizumab o es un agente quimioterapéutico, tal como doxorubicina y/o un taxano, tal como paclitaxel o es un inhibidor anti-HER-2, tal como trashizumab o un inhibidor dual de EGFR/HER-2 cinasa, tal como lapatinib o un regulador negativo de HER-2, tal como 17AAG (derivado de geldanamicina que es un veneno de la proteína de choque térmico [HSP] 90) (por ejemplo, para cánceres de mama que han progresado con terapia de trashizumab). En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón, tal como cáncer microcítico de pulmón y el segundo medicamento es un inhibidor de VEGF, tal como bevacizumab o un inhibidor de EGFR, tal como, por ejemplo, erlotinib o un inhibidor de c-Kit, tal como, por ejemplo, imatinib. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de hígado, tal como carcinoma hepatocelular y el segundo medicamento es un inhibidor de EGFR, tal como erlotinib, un agente quimioterapéutico, tal como doxorubicina o irinotecán, un taxano, tal como paclitaxel, talidomida y/o interferón. Además, un agente quimioterapéutico preferido para la terapia de primera línea del cáncer es taxotere, solo o en combinación con otros segundos medicamentos. Lo más preferentemente, si se administra quimioterapia, esta se administra en primer lugar, seguida de los anticuerpos del presente documento.

Dichos segundos medicamentos pueden administrarse a las 48 horas después de que se administren los anticuerpos del presente documento o a las 24 horas o a las 12 horas o a las 3-12 horas después de dicho agente o pueden administrarse a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado, que es preferentemente de aproximadamente 1 a 2 días. Además, la dosis de dicho agente puede ser subterapéutica.

Los anticuerpos del presente documento pueden administrarse de manera concurrente, secuencial o alterna con el segundo medicamento o tras la ausencia de respuesta con otra terapia. Por lo tanto, la administración combinada de un segundo medicamento incluye la administración conjunta (administración concurrente), usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente existe un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los medicamentos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Todos estos segundos medicamentos pueden usarse en combinación entre sí o solos con el primer medicamento, de tal forma que la expresión "segundo medicamento", tal como se usa en el presente documento no significa que sea el único medicamento aparte del primer medicamento, respectivamente. Por lo tanto, el segundo medicamento no tiene por qué ser un medicamento, sino que puede constituir o comprender más de uno de dichos fármacos.

Estos segundos medicamentos tal como se han expuesto en el presente documento se usan generalmente a las mismas dosis y en las mismas rutas de administración que los primeros medicamentos o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosis de los primeros medicamentos. En caso de que se usen dichos segundos medicamentos, preferentemente, se usan en cantidades menores que si no estuviese presente el primer medicamento, especialmente en dosis posteriores más allá de la dosis inicial con el primer medicamento, para eliminar o reducir los efectos secundarios causados por el mismo.

La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recidiva del crecimiento

tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas. La recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas se usa para describir una afección en la que los pacientes que se someten o se tratan con una o más terapias disponibles en la actualidad (por ejemplo, terapias para el cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpo anti-VEGF, en particular, un régimen terapéutico convencional para el cáncer particular) que no es clínicamente adecuada para tratar a los pacientes o los pacientes ya no reciben ningún efecto beneficioso por la terapia, de tal forma que estos pacientes necesitan terapia eficaz adicional. Tal como se usa en el presente documento, la expresión también puede referirse a una afección el paciente "que no responde/refractario", por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia aunque padecen efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En diversas realizaciones, un cáncer es una recidiva del crecimiento tumoral o una recidiva del crecimiento de células cancerosas en donde el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente o ha aumentado o el tamaño tumoral no se ha reducido significativamente o ha aumentado o no logra una reducción adicional en el tamaño o en el número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son de recidiva del crecimiento tumoral o recidiva del crecimiento de células cancerosas puede efectuarse *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia del tratamiento en células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "recidiva" o "refractario" o "sin respuesta" en dicho contexto. Un tumor resistente al tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de una recidiva del crecimiento tumoral.

La invención proporciona métodos para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mediante la administración de uno o más anticuerpos anti-FGF19 para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas en el sujeto. En determinadas realizaciones, el antagonista puede administrarse posteriormente al agente terapéutico para el cáncer. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-FGF19 se administra simultáneamente con la terapia para el cáncer. Como alternativa o adicionalmente, la terapia de anticuerpo anti-FGF se alterna con otra terapia para el cáncer, que puede llevarse a cabo en cualquier orden. La invención también abarca métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para prevenir la aparición o la recurrencia del cáncer en pacientes predispuestos a padecer cáncer. En general, el sujeto estaba o se está sometiendo concurrentemente a terapia para el cáncer. En una realización, la terapia para el cáncer es el tratamiento con un agente anti-angiogénico, por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente anti-angiogénico incluye aquellos conocidos en la técnica y aquellos encontrados en la sección de "Definiciones" en el presente documento. En una realización, el agente anti-angiogénico es un anticuerpo o fragmento neutralizante anti-VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; los documentos WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y, el documento WO2005012359. Pueden administrarse agentes adicionales en combinación con antagonistas de VEGF y un anticuerpo anti-FGF19 para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas.

Los anticuerpos de la invención (y el agente terapéutico adjunto) se administran mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, los anticuerpos se administran de manera adecuada mediante infusión pulsada, particularmente con dosis en disminución del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición de anticuerpo de la invención se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios. El anticuerpo no necesariamente, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de los anticuerpos de la invención presentes en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores discutidos anteriormente. Estos se usan generalmente a las mismas dosis y con rutas de administración usadas anteriormente en el presente documento o de aproximadamente del 1 al 99 % de las dosis empleadas anteriormente.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosis inicial posible para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante

infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se pueden administrar al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede usarse una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Una pauta de dosificación ilustrativa comprende administrar una dosis inicial de carga de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis semanal de mantenimiento de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Los anticuerpos anti-FGF19 de la invención son útiles en ensayos que detectan la expresión de FGF19 (tales como ensayos diagnósticos o pronósticos) en células o tejidos específicos en los que se marcan los anticuerpos tal como se describe más adelante y/o se inmovilizan sobre una matriz insoluble. Sin embargo, se entiende que puede usarse cualquier anticuerpo anti-FGF19 adecuado en realizaciones que implican la detección y el diagnóstico. En el presente documento se describen algunos métodos para producir anticuerpos anti-FGF19 y los métodos para producir anticuerpos anti-FGF19 se conocen bien en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para la detección de FGF19, comprendiendo los métodos detectar el complejo FGF19-anti-FGF19 en la muestra. El término "detección", tal como se usa en el presente documento, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (medir los niveles) con o sin referencia a un control.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGF19, comprendiendo los métodos detectar el complejo FGF19-anti-FGF19 en una muestra biológica de un individuo que tiene o que se sospecha que tiene el trastorno. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es expresión aumentada o expresión anormal (no deseada).

En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento, en el que el anticuerpo anti-FGF19 comprende un marcador detectable.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento y FGF19. En algunas realizaciones, el complejo es *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGF19 se marca de manera detectable.

Los anticuerpos anti-FGF19 (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos para FGF19 descritos en el presente documento) pueden usarse para la detección de FGF19 en uno cualquiera de una serie de métodos de ensayo de detección bien conocidos.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para detectar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGF19, comprendiendo los métodos detectar a FGF19 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para seleccionar el tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGF19 en una muestra biológica de un individuo, en caso de haberla y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección o tratamiento se basa en la expresión de FGF19 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control.

En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGF19 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19. Se describen en el presente documento métodos para tratar un trastorno con un anticuerpo anti-FGF19 y algunos métodos se ilustran en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno hepático (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19, además en los que la expresión de FGF19 y/o FGFR4 se detectan en células y/o tejido del paciente humano antes, durante o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta la sobreexpresión de FGF19 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de

FGFR4 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. La expresión puede detectarse antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; o antes, durante y después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. Se describen en el presente documento métodos para tratar un trastorno con un anticuerpo anti-FGF19 y algunos métodos se ilustran en el presente documento.

5 Por ejemplo, puede ensayarse una muestra biológica respecto de FGF19 mediante la obtención de la muestra a partir de una fuente deseada, mezclar la muestra con anticuerpo anti-FGF19 para permitir que el anticuerpo forme complejos anticuerpo/FGF19 con cualquier FGF19 presente en la mezcla y detectar cualquier complejo anticuerpo/FGF19 presente en la mezcla. La muestra biológica puede prepararse para su ensayo mediante métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra particular. Los métodos para mezclar la muestra con anticuerpos y los métodos para detectar el complejo anticuerpo/FGF19 se seleccionan de acuerdo con el tipo de ensayo usado. Dichos ensayos incluyen inmunohistoquímica, ensayos competitivos y en sándwich y ensayos de inhibición estérica. Para la preparación de la muestra, puede usarse una muestra de tejido o células de un mamífero (normalmente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, pero sin limitación, células de cáncer, tales como de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. También puede medirse FGF19 en suero. La muestra puede obtenerse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede estar fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. La muestra de tejido puede fijarse (es decir, conservarse) mediante metodologías convencionales (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto habitual en la materia apreciará que la elección de un fijativo se determina según el fin para el cual se va a teñir histológicamente la muestra o analizada de otro modo. Un experto habitual en la materia también apreciará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijativo empleado. A modo de ejemplo, puede usarse formalina neutra tamponada, Bouin o paraformaldehído para fijar una muestra. En general, en primer lugar se fija la muestra y después se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se incluye con parafina u otro medio de corte de tal forma que puede seccionarse la muestra de tejido. Como alternativa, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incluirse y procesarse en parafina mediante metodologías convencionales (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", anteriormente citado). Los ejemplos de la parafina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez se ha incluido la muestra de tejido, puede seccionarse la muestra con un microtomo o similares (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", anteriormente citado). A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden estar comprendidas entre aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de espesor. Una vez seccionadas, las secciones pueden unirse a portaobjetos mediante varios métodos convencionales. Los ejemplos de adhesivos de portaobjetos incluyen, pero sin limitación, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones incluidas en parafina pueden unirse a portaobjetos cargados positivamente y/o a portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Si se ha usado parafina como material de inclusión, las secciones de tejido generalmente se desparafinan y se rehidratan con agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse mediante diversas metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie descendente gradual de alcoholes (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", anteriormente citado). Como alternativa, pueden usarse agentes desparafinantes no orgánicos, tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

Los métodos analíticos para FGF19 usan todos o uno o más de los siguientes reactivos: análogo de FGF19 marcado, análogo de FGF19 inmovilizado, anticuerpo anti-FGF19 marcado, anticuerpo anti-FGF19 inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos marcados también se conocen como "trazadores".

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión de FGF19 y el anticuerpo anti-FGF19. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayos, los ejemplos incluyendo restos que pueden detectarse directamente, tales como marcadores de fluorocromo, quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que se tienen que hacer reaccionar o derivarse para que se puedan detectar.

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión de FGF19 y el anticuerpo anti-FGF19. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayos, los ejemplos incluyendo restos que pueden detectarse directamente, tales como marcadores de fluorocromo, quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que se tienen que hacer reaccionar o derivarse para que se puedan detectar. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina,

marcadores de espín, marcadores de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

Hay disponibles métodos convencionales para unir estos marcadores de manera covalente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, pueden usarse agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidias, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos anteriormente descritos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Method*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferidos en el presente documento son enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, al anticuerpo es un procedimiento de manipulación estándar para un experto habitual en las técnicas de inmunoensayo. Véanse, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 1981), págs. 147-166.

La inmovilización de los reactivos es necesaria para determinados métodos de ensayo. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-FGF19 de cualquier FGF19 que permanezca libre en solución. Esto se logra convencionalmente bien insolubilizando el anticuerpo anti-FGF19 o análogo de FGF19 antes del procedimiento de ensayo, tal como mediante adsorción en una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., documento U.S. 3.720.760), mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación de glutaraldehído) o insolubilizando el anticuerpo anti-FGF19 o el análogo de FGF19 posteriormente, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

Puede examinarse la expresión de proteínas en una muestra usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. La tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido ha demostrado ser un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas inmunohistoquímicas ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de la muestra, puede usarse una muestra de tejido o células de un mamífero (normalmente un paciente humano). La muestra puede obtenerse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede estar fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. La muestra de tejido puede fijarse (es decir, conservarse) mediante metodologías convencionales. Un experto habitual en la materia apreciará que la elección de un fijativo se determina según el fin para el cual se va a teñir histológicamente la muestra o analizada de otro modo. Un experto habitual en la materia también apreciará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijativo empleado.

Puede llevarse a cabo IHC en combinación con técnicas adicionales, tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* de fluorescencia. Hay disponibles dos métodos de IHC generales; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, FGF19) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como un anticuerpo primario marcado con un marcador fluorescente o con una enzima, que puede visualizarse sin interacciones de anticuerpo adicionales. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y después un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. En los casos donde el anticuerpo secundario se conjuga a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario empleado para inmunohistoquímica se marcará normalmente con un resto detectable. Hay disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

Aparte de los procedimientos de preparación de muestras discutidos anteriormente, puede desearse un tratamiento adicional de la sección de tejido antes de, durante o después de la IHC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo métodos de recuperación de epítomos, tales como el calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong et al. *Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de tal forma que el anticuerpo primario se une al antígeno de la proteína diana en la muestra de tejido. Las condiciones adecuadas para lograr eso pueden determinarse mediante experimentación rutinaria. El alcance de la unión del anticuerpo a la muestra se determina usando cualquiera de los marcadores detectables discutidos anteriormente. Preferentemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico, tal como cromógeno de 3,3'-diaminobenzina. Preferentemente, el marcador enzimático se conjuga a anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra anti-conejo).

Los especímenes preparados de este modo pueden montarse y cubrirse. Entonces se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, usando un microscopio y pueden emplearse criterios de intensidad de la tinción, usados

rutinariamente en la técnica.

Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o ensayos en sándwich, están bien establecidos y se usan ampliamente en la industria de los diagnósticos comerciales.

5 Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de FGF19 trazador para competir con el FGF19 de la muestra de ensayo por un número limitado de sitios de unión a antígeno del anticuerpo anti-FGF19. Generalmente, se insolubiliza el anticuerpo anti-FGF19 antes o después de la competición y después se separan el trazador y el FGF19 unido al anticuerpo anti-FGF19 del trazador y FGF19 no unidos. Esta separación se logra decantando (en donde el compañero de unión se insolubilizó previamente) o mediante centrifugación (en donde el  
10 compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de FGF19 de la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido, según se mide por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan curvas de respuesta a la dosis con cantidades conocidas de FGF19 y se comparan con los resultados de ensayo para determinar cuantitativamente la cantidad de FGF19 presente en la muestra de ensayo. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando las enzimas se usan como marcadores detectables.

15 Otra especie de ensayo competitivo, denominado un ensayo "homogéneo", no requiere de una separación de fase. En este caso, se prepara un conjugado de una enzima con el FGF19 y se usa de tal forma que cuando el anticuerpo anti-FGF19 se une al FGF19 en presencia del anticuerpo anti-FGF19 se modifica la actividad enzimática. En este caso, el FGF19 o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una  
20 enzima, tal como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para su uso con el anticuerpo anti-FGF19 de tal forma que la unión del anticuerpo anti-FGF19 inhibe o potencia la actividad enzimática del marcador. Este método en sí se practica ampliamente con el nombre de EMIT.

25 Los conjugados estéricos se usan en métodos de impedancia estérica para ensayos homogéneos. Estos conjugados se sintetizan uniendo covalentemente un hapteno de bajo peso molecular a un fragmento pequeño de FGF19 de tal forma que el anticuerpo al hapteno es sustancialmente incapaz de unirse al conjugado a la vez que el anticuerpo anti-FGF19. Según este procedimiento de ensayo, el FGF19 presente en la muestra de ensayo se unirá al anticuerpo anti-FGF19, permitiendo de este modo que el anti-hapteno se una al conjugado, dando como resultado un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es  
30 un fluoróforo.

Los ensayos en sándwich son particularmente útiles para la determinación de FGF19 o de anticuerpos anti-FGF19. En los ensayos en sándwich secuenciales, se usa un anticuerpo anti-FGF19 inmovilizado para adsorber el FGF19 de la muestra de ensayo, se retira la muestra de ensayo, tal como mediante lavado, el FGF19 unido se usa para adsorber un segundo anticuerpo anti-FGF19 marcado y el material unido se separa entonces del trazador residual. La cantidad de trazador unida es directamente proporcional al FGF19 de la muestra de ensayo. En ensayos en sándwich "simultáneos", la muestra de ensayo no se separa antes de añadir el anti-FGF19 marcado. Un ensayo en sándwich secuencial que usa un anticuerpo monoclonal anti-FGF19 como un anticuerpo y un anticuerpo policlonal anti-FGF19 como el otro es útil para probar las muestras respecto de FGF19.  
35

40 Lo anterior son simplemente ensayos de detección a modo de ejemplo para FGF19. Se incluyen dentro del alcance de la invención otros métodos actuales o desarrollados en un futuro que usen anticuerpo anti-FGF19 para la determinación de FGF19, incluyendo los bioensayos descritos en el presente documento.

45 En un aspecto, la invención proporciona métodos para detectar (por ejemplo, la presencia o ausencia de o la cantidad de) un polinucleótido (por ejemplo, polinucleótidos de FGF19) en una muestra biológica de un individuo, tal como un sujeto humano. Pueden emplearse diversos métodos para detectar polinucleótidos e incluyen, por ejemplo, RT-PCR, Taqman, métodos de amplificación, micromatriz de polinucleótidos y similares.

50 Los métodos para la detección de polinucleótidos (tales como ARNm) se conocen bien e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de FGF19 marcadas), transferencia de Northern y técnicas relacionadas y diversos ensayos de amplificación de ácido nucleico (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para FGF19 y otros métodos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SPIA, Ribo-SPIA, SISBA, TMA y  
55 similares).

Las muestras biológicas de mamíferos pueden ensayarse de manera conveniente respecto de, por ejemplo, ARNm de FGF19 usando Northern, transferencia por puntos o análisis PCR. Por ejemplo, se conocen bien en la técnica ensayos de RT-PCR, tales como ensayos de PCR cuantitativos. En una realización ilustrativa de la invención, un método para detectar ARNm de FGF19 en una muestra biológica comprende producir ADNc a partir de la muestra mediante transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando un polinucleótido de FGF19 como cebadores sentido y antisentido para amplificar los ADNc de FGF19 en la misma; y detectar la presencia o ausencia del ADNc de FGF19 amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permitan determinar la cantidad (niveles) de ARNm de FGF19 en una muestra biológica (por  
60 ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativa de un gen constitutivo, tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del

ADNc de FGF19 amplificado.

Las sondas y/o los cebadores pueden estar marcados con un marcador detectable, tales como, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de FGF19 en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa proteínas de FGF19. Tal como entenderá el experto en la técnica, pueden prepararse una gran variedad de cebadores y sondas diferentes (por ejemplo, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento) y usarse de manera eficaz para amplificar, clonar y/o determinar la presencia o ausencia de y/o la cantidad de ARNm de FGF19.

Los métodos opcionales de la invención incluyen protocolos que comprenden la detección de polinucleótidos, tales como polinucleótidos de FGF19, en una muestra tisular o celular usando tecnologías de micromatriz. Por ejemplo, para el uso de micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de ensayo y de control de muestras de tejido de ensayo y de control se retrotranscriben y marcan para generar sondas de ADNc. Entonces se hibridan las sondas a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz se configura de tal manera que la secuencia y posición de cada miembro de la matriz son conocidas. Por ejemplo, puede disponerse en forma de matriz una selección de genes tienen el potencial de expresarse en determinadas patologías sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro concreto de la matriz indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido enfermo puede proporcionar información valiosa. La tecnología de micromatriz utiliza técnicas de hibridación de ácido nucleico y tecnología informática para evaluar el perfil de expresión de ARNm de miles de genes en un solo experimento. (Véase por ejemplo, el documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (Véanse, por ejemplo, el documento U.S. 5.700.637, la Patente de Estados Unidos 5.445.934 y la Patente de Estados Unidos 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) para una explicación de la fabricación de la matriz). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos génicos que se sintetizan directamente o se puntea sobre vidrio u otros sustratos. Normalmente están representados miles de genes en una sola matriz. Un experimento de micromatriz típico implica las siguientes etapas: 1. preparación de diana marcada fluorescentemente a partir de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada a la micromatriz, 3. lavado, tinción y escaneo de la matriz, 4. análisis de la imagen escaneada y 5. generación de los perfiles de expresión génica. Actualmente se usan dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente de 25 a 70 meros) y matrices de expresión génica que contienen productos de la PCR preparados a partir de ADNc. Al formar una matriz, los oligonucleótidos pueden prefabricarse y puntearse en la superficie o sintetizarse directamente en la superficie (*in situ*).

El sistema GeneChip® de Affymetrix es un sistema de micromatriz comercial que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sonda/gen: Los oligonucleótidos, normalmente 25 meros, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías de síntesis química de fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligos diferentes y cada oligo está presente en millones de copias. Ya que las sondas oligonucleotídicas se sintetizan en ubicaciones conocidas sobre la matriz, pueden interpretarse los patrones de hibridación y las intensidades de señal en términos de identidad génica y de niveles de expresión relativa por el programa informático Affymetrix Microarray Suite. Cada gen se representa sobre la matriz mediante una serie de diferentes sondas oligonucleotídicas. Cada par de sonda consiste en un oligonucleótido perfectamente emparejado y un oligonucleótido desemparejado. La sonda perfectamente coincidente tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y por lo tanto mide la expresión del gen. La sonda desemparejada difiere de la sonda perfectamente emparejada en una sola sustitución de base en la posición de la base central, alterando la unión del transcrito génico diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no específica que contribuye a la señal medida para el oligo perfectamente emparejado. El programa informático Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas desemparejadas de aquellas de las sondas perfectamente emparejadas para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se seleccionan basándose en la información actual de GenBank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas en el extremo 3' del gen. Se usa un Horno de Hibridación GeneChip (horno de "roisserie") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación de fluidos lleva a cabo el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizado y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo se controla independientemente mediante el programa informático Microarray Suite usando protocolos de fluidos preprogramados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. La estación de trabajo informática con el programa informático Microarray Suite controla la estación de fluidos y el escáner. El programa informático Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones de fluidos usando protocolos preprogramados de hibridación, lavado y tinción para la matriz de sondas. El programa también recoge y convierte los datos de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos adecuados. Finalmente, el programa informático detecta cambios en la expresión génica entre experimentos mediante un análisis de comparación y da formato a la salida en archivos .txt, que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis adicional de los datos.

En algunas realizaciones, se detecta la eliminación génica, la mutación génica o la amplificación génica de FGF19. La eliminación génica, la mutación génica o la amplificación pueden medirse mediante uno cualquiera de una gran

- variedad de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77:5201-5205 (1980)), transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), usando una sonda marcada de manera adecuada, métodos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (HGC)
- 5 usando una sonda marcada de manera adecuada. Además, estos métodos pueden emplearse para detectar la eliminación génica del ligando de FGF19, la mutación del ligando o la amplificación génica. Tal como se usa en el presente documento, "detectar la expresión de FGF19" abarca la detección de la eliminación génica, la mutación génica o la amplificación génica de FGF19.
- 10 Además, se puede examinar el estado de metilación del gen de FGF19 en una muestra de tejido o de células. La desmetilación y/o hipermetilación aberrantes de las islas de CpG en las regiones reguladoras 5' del gen sucede frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas y puede dar como resultado la expresión alterada de diversos genes. Se conocen bien en la técnica diversos ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, se puede utilizar, en estrategias de hibridación de Southern, enzimas de restricción sensibles a la
- 15 metilación que no pueden escindir secuencias que contienen sitios de CpG metilados para evaluar el estado de metilación de las islas de CpG. Además, la MSP (PCR específica de metilación) puede elaborar rápidamente el perfil del estado de metilación de todos los sitios de CpG presentes en una isla de CpG de un gen dado. Este procedimiento implica la modificación inicial del ADN mediante bisulfito de sodio (que convertirá todas las citosinas no metiladas en uracilo) seguido de amplificación usando cebadores específicos para ADN metilado frente a no metilado. También pueden encontrarse protocolos que implican la interferencia de metilación, por ejemplo, en
- 20 Current Protocols In Molecular Biology, unidad 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995; De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks et al, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536); y Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998). Tal como se usa en el presente documento, "detectar la expresión de FGF10" abarca la detección de la metilación génica de FGF19.
- 25 Los ejemplos de la presente solicitud divulgan que FGFR4 se expresa en tumores humanos primarios de hígado, pulmón y colon y en líneas celulares de cáncer de colon y además que FGF19 y FGFR4 se expresan conjuntamente en tumores humanos primarios de hígado, pulmón y colon y en líneas celulares de cáncer de colon. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se detecta la expresión del polipéptido y/o polinucleótido de FGFR4 (sola o en conjunción (simultánea y/o secuencialmente) con la expresión de FGF19) en una muestra biológica. Tal como se describe anteriormente y en la técnica, actualmente se cree que FGF10 se une al receptor FGFR4. Usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos divulgados en el presente documento, puede detectarse la expresión polinucleotídica y/o polipeptídica de FGFR4. A modo de ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente pueden emplearse para detectar la presencia de una o más de dichas moléculas en la muestra. Tal como se usa en
- 30 el presente documento, "en conjunción" pretende abarcar cualquier detección simultánea y/o secuencial. Por lo tanto, se contempla que en las realizaciones en las que se está examinando una muestra biológica no solamente respecto de la presencia de FGF19, sino también respecto de la presencia de FGFR4, pueden prepararse portaobjetos separados a partir del mismo tejido o muestra y ensayarse cada portaobjetos con un reactivo que se une a FGF19 y/o a FGFR4, respectivamente. Como alternativa, puede prepararse un solo portaobjetos a partir de la muestra de tejido o de células y pueden usarse anticuerpos dirigidos contra FGF19 y FGFR4 en conexión con un protocolo de tinción multicolor para permitir la visualización y detección de FGF19 y FGFR4.
- 35 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGFR4, comprendiendo los métodos detectar a FGFR4 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.
- 45 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGF19 y FGFR4, comprendiendo los métodos detectar a FGFR4 y FGF19 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es expresión aumentada o expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 se detecta en una primera muestra biológica y la expresión de FGF19 se detecta en una segunda muestra biológica.
- 50 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para seleccionar el tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGFR4 en una muestra biológica de un individuo, en caso de haberla y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección o tratamiento se basa en la expresión de FGFR4 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta la
- 60 expresión de FGFR4 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19.
- 65



En otro aspecto, la invención proporciona métodos para seleccionar el tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGF19 y FGFR4 en la muestra biológica, en caso de haberla y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección o tratamiento se basa en la expresión de FGF19 y FGFR4 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGF19 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión aumentada de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión reducida de FGFR4 en la muestra biológica del individuo se detecta en el individuo en relación a un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGFR4 y FGF19 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 se detecta en una primera muestra biológica y la expresión de FGF19 se detecta en una segunda muestra biológica.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno hepático (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19, además en los que la expresión de FGF19 y/o FGFR4 se detectan en células y/o tejido del paciente humano antes, durante o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta la sobreexpresión de FGF19 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGFR4 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. La expresión puede detectarse antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; o antes, durante y después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19.

En algunas realizaciones que implican la detección, la expresión de la señalización molecular aguas abajo de FGFR4 se detecta adicionalmente o como una alternativa a la detección de la expresión de FGFR4. En algunas realizaciones, la detección de la señalización molecular aguas abajo de FGFR4 comprende uno o más de detección de la fosforilación de MAPK, FRS2 o ERK2.

Algunas realizaciones que implican la detección comprenden además la detección de la activación de la ruta de Wnt. En algunas realizaciones, la detección de la activación de la ruta de Wnt comprende uno o más de fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina, expresión de genes diana de Wnt, mutación de  $\beta$ -catenina y unión de E-cadherina a  $\beta$ -catenina. Se conoce en la técnica la detección de la activación de la ruta de Wnt y se describen e ilustran algunos ejemplos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el tratamiento es para un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de pituitaria, cáncer de páncreas, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de mama, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), carcinomas epiteliales, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar y carcinoma hepatocelular.

Las muestras biológicas se describen en el presente documento, por ejemplo, en la definición de muestra biológica. En alguna realización, la muestra biológica es suero o de un tumor.

En realizaciones que implican la detección de la expresión de FGF19 y/o FGFR4, puede detectarse la expresión de un polinucleótido de FGF19 y/o FGFR4 y/o la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4. En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de FGF19 y/o FGFR4, se detecta la expresión de ARNm de FGF19 y/o FGFR4. En otras realizaciones, se detecta la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4 usando un agente anti-FGF19 y/o un agente anti-FGFR4. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4 usando un anticuerpo. Puede usarse cualquier anticuerpo adecuado para la detección y/o diagnóstico, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se usa un anticuerpo anti-FGF19 descrito en el presente documento para la detección. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de un polipéptido de FGF19 y/o FGFR4 usando un anticuerpo usando inmunohistoquímica (IHC). En algunas realizaciones, se puntúa con un 2 o más la expresión de FGF19 usando IHC.

En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de FGF19 y/o FGFR4, puede detectarse la presencia y/o ausencia y/o el nivel de expresión de FGF19 y/o FGFR4. Puede aumentarse la expresión de FGF19 y/o FGFR4. Se entiende que la ausencia de expresión de FGF19 y/o FGFR4 incluye niveles insignificantes o mínimos. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 en la muestra biológica de ensayo es mayor que aquella observada para una muestra biológica de control (o nivel de expresión de control o de referencia). En algunas realizaciones, La expresión de FGF19 es al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces mayor o mayor en la muestra biológica de ensayo que

5 en la muestra biológica de control. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido de FGF19 se determina en un ensayo inmunohistoquímico ("IHC") para puntuar al menos 2 o más respecto de la intensidad de tinción. En algunas realizaciones, se determina la expresión del polipéptido de FGF en un ensayo IHC para puntuar al menos 1 o más o al menos 3 o más respecto de la intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 en la muestra biológica de ensayo es menor que la observada para una muestra biológica de control (o nivel de expresión de control).

10 En algunas realizaciones, Se detecta la expresión de FGF19 en suero y la expresión de FGFR4 se detecta en una muestra de tumor. En algunas realizaciones, se detectan la expresión de FGF19 y la expresión de FGFR4 en una muestra de tumor. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGF19 en suero o en una muestra de tumor y la señalización aguas abajo de FGFR4 y/o la expresión de FGFR4 se detectan en una muestra tumoral. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGF19 en suero o en una muestra de tumor y se detecta la activación de la ruta de Wnt en una muestra de tumor. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGF19 en suero o en una muestra de tumor, se detecta en una muestra de tumor la señalización molecular aguas abajo de FGFR4 y/o la expresión de FGFR4 y/o la activación de la ruta de Wnt.

**Artículos de fabricación**

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es útil en por sí sola o cuando se combina con otras composiciones eficaces para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección, tal como el cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones del primer y el segundo anticuerpo pueden usarse para tratar una afección concreta, por ejemplo, cáncer. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), suero salino tamponado con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

40 Lo siguiente son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

**Ejemplos**

Se usaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos 1-12.

45 *Expresión génica*

50 Se extrajo ARN total de muestras de tejido congeladas usando RNA STAT-60 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Tel-Test "B" Inc.). Se aisló el ARN total de las células cultivadas mediante el kit RNeasy usando el protocolo del fabricante (Qiagen). El ADN contaminante se retiró usando el kit DNA-Free (Ambion; n.º de cat 1906)) y se usan las muestras para la PCR en tiempo real. Los cebadores y las sondas fluorogénicas específicas para los ARNm de FGF19, FGFR4 y RPL19 humanos (tabla 2) se diseñaron usando Primer Express 1.1 (PE Applied Biosystems) y se usaron para cuantificar la expresión génica. Las señales génicas específicas se normalizaron a la señal del gen constitutivo RPL19. Se promediaron conjuntos de datos por triplicado para cada condición.

55

Tabla 2

	<u>Cebador directo</u>	<u>Cebador inverso</u>	<u>Sonda</u>
CYP7a1	CCATGATGCAA ACCTCCAAT (SEQ ID NO:11)	ACCCAGACAGCG CTCTTTGA (SEQ ID NO:12)	TGTCATGAGACCT CCGGGCCTTCC (SEQ ID NO:13)

GAPDH	AATTTGCCGTGA GTGGAGTC  (SEQ ID NO:14)	CAGTGGCAAAGT GGAGATTGT  (SEQ ID NO:15)	CCATCAACGACC CCTTCATTGACCT C  (SEQ ID NO:16)
FGF19	AGACCCCAAGTC TTGTCAATAAC  (SEQ ID NO:17)	AATATCATGTTGG AAAACCAAGTG  (SEQ ID NO:18)	CCGCTGCTTCCAC ACAGCAA  (SEQ ID NO:19)
FGFR4	GCTCTTGACGGC AGCATT  (SEQ ID NO:20)	CGCCATTTGCTCC TGTTT  (SEQ ID NO:21)	GCAGGCTTCCAG CTTCTC  (SEQ ID NO:22)
RPL19	AGCGGATTCTCA TGGAACA  (SEQ ID NO:23)	CTGGTCAGCCAG GAGCTT  (SEQ ID NO:24)	TCCACAAGCTGA AGGCAGACAAGG  (SEQ ID NO:25)

*Hibridación in situ*

5 Se generaron sondas sentido o antisentido marcadas con <sup>33</sup>P-UTP correspondientes a FGFR4 humano (nucleótidos 435 a 1183 de NM\_022963) o a FGF19 (nucleótidos 495 a 1132 de NM\_005117) mediante reacción en cadena de la polimerasa (Mauad et al. (1994) Am J Pathol 145, 1237-1245). Se desparafinaron las secciones, se desproteizaron en 4 mg/ml de proteinasa K durante 30 min a 37 °C y se procesaron adicionalmente para hibridación *in situ* (Holcomb et al. (2000) Embo J 19, 4046-4055). Las sondas se hibridaron a las secciones a 55 °C durante toda la noche y las sondas no hibridadas se retiraron mediante tratamientos con RNasa A. Se mojaron los portaobjetos en emulsión NBT2 (Eastman Kodak), se expusieron durante 4 semanas a 4 °C, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina.

*Inmunoprecipitación e inmunotransferencia*

15 Se homogenizaron las muestras de tejido (50 mg) en 500 µl de tampón de extracción (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 137 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1 %, glicerol al 10 %, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, cóctel inhibidor completo de proteasa (Roche Applied Sciences)). Se extrajeron las proteínas totales de células cultivadas sobre hielo durante 30 min con el tampón de extracción. Los lisados se centrifugaron (10.000 x g, 15 min) y después se aclararon con agarosa Cibacron Blue y proteína G-agarosa (GE Healthcare Life Sciences) durante toda la noche a 4 °C. Los lisados (100 µg de proteína) se incubaron en 1 ml de PBS/Triton al 0,1 % con 2 µg de los anticuerpos acoplados a agarosa de interés durante 1 h a 4 °C. Se lavó la lechada del gel con el mismo tampón con el mismo tampón y se eluyó con 10 µl de tampón de elución (Pierce Biotechnology). Las muestras se analizaron mediante transferencia de Western usando 2 µg de anticuerpo para FGF19 biotinilado (BA969; R&D systems), de anticuerpo para FGFR4 (Genentech, Inc.) y reactivos secundarios conjugados a IRDye 800 y visualizados usando el escáner Odyssey (Li-Cor Biotechnology).

*Inmunohistoquímica*

30 Las secciones de tejido incluidas en parafina fijadas con formalina se trataron para la recuperación de antígeno usando Trilogy (Cell Marque) y después se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo para FGF19 (1D1; Genentech Inc). La inmunotinción se logró usando un anticuerpo secundario biotinilado, un reactivo ABC-HRP (Vector Labs) y un sustrato de peroxidasa colorimétrico DAB potenciado por metal (Pierce Laboratories).

*Ensayo de migración celular*

35 Se recubrió la superficie de filtros de membrana de PET en formato de 24 pocillos con una porosidad de 8 µm (BD Biosciences) durante toda la noche a 4 °C con 50 µl de colágeno de tipo 1 (50 µg/ml; Sigma) en ácido acético 0,02

M. Se añadieron las células ( $5 \times 10^4$ ) en medio esencial mínimo sin suero que contenía BSA al 0,1 % a la cámara superior. La cámara inferior se rellenó con el mismo medio y se incubaron las placas a 37 °C. Al día siguiente se limpió la cámara superior con una torunda de algodón y se tiñeron las células que migraron a la parte inferior del inserto y se contaron en un microscopio. Se promediaron conjuntos de datos por triplicado para cada condición.

5

#### *Ensayo de unión a receptor en fase sólida*

Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorb durante toda la noche a 4 °C con 50 µl de anticuerpo específico de fragmento Fc $\gamma$  anti-inmunoglobulina humana a 2 µg/ml (Jackson Immunoresearch) y se usó para capturar 1 µg/ml de proteínas quiméricas de FGFR-Fc (R & D Systems). Los sitios de unión no específica se saturaron con PBS/BSA al 3 % y se incubó FGF19 durante 2 h en PBS/BSA al 0,3 % en presencia de glucosaminoglucanos (Seikagaku Corporation) u oligosacáridos (Neoparin Inc.). La unión de FGF19 se detectó usando un anticuerpo policlonal específico de FGF19 biotinilado (BAF969; R & D Systems) seguido de estreptavidina-HRP y sustrato colorimétrico TMB.

15

#### *Ensayo de arrastre de receptor*

Se incubaron proteínas quiméricas FGFR-Fc (400 ng) con 400 ng de FGF19 o 400 ng de FGF1 y heparina (200 ng) en medio esencial modificado de Dulbecco:F12 de Ham al 50:50 que contenía HEPES 10 mM, pH 7,4 y BSA al 0,1 % durante 1 h. Se añadió proteína G-agarosa (20 µl) y se incubó adicionalmente durante 30 min. La matriz se lavó con PBS/Triton-X100 al 0,1 %, se eluyó con tampón de muestra de SDS-PAGE que contenía agente reductor y se analizó mediante transferencia de Western usando anticuerpo para FGF19 biotinilado (BAF969) o anticuerpo para FGF1 biotinilado (BAF232; R&D systems).

20

#### *Ensayo de unión de fase sólida HSPG*

Se adsorbió proteoglicano de heparán sulfato (Sigma) a placas de 96 pocillos Maxisorb durante toda la noche a 4°C. Se saturaron los sitios de unión no específicos con PBS/BSA al 3 % y se incubaron los pocillos con FGF19 o FGF1 (diluciones seriadas 1:3 desde 1 µg/ml hasta 0,00017 µg/ml) (R & D Systems) durante 1 h. La unión no específica se determinó en presencia de un exceso de heparina (10 µg/ml). La unión se detectó con anticuerpos específicos biotinilados y sustrato colorimétrico TMB. La unión específica se calculó restando la unión no específica de la unión total.

30

#### *Ensayo de unión de heparina agarosa*

35

Se incubaron FGF19 y proteína FGF1 (cada uno a 400 ng/ml) con 20 µl de heparina-agarosa (GE Healthcare Life Sciences) en medio esencial modificado de Dulbecco: F12 de Ham a 50:50 que contenía HEPES 10 mM, pH 7,4 y BSA al 0,1 % durante 1 h. La lechada del gel se lavó con 1 ml de Tris 20 mM, pH 7,4 que contenía diversas concentraciones de NaCl y después con 1 ml del mismo tampón que contenía NaCl 20 mM. Las proteínas unidas se eluyeron con tampón de muestra de SDS-PAGE que contenía agente reductor y se analizó mediante transferencia de Western.

40

#### *Generación de anticuerpos monoclonales para FGF19*

Se inmunizó secuencialmente a ratones Balb/c con FGF19-His. En particular, se inmunizó a los ratones Balb/c en cada almohadilla de la pata trasera 9 veces (a intervalos de dos semanas) con 2,0 µg de hu FGF-19-His resuspendido en MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Inc., Hamilton, Mont.). Tres días después del refuerzo final, se recogieron los bazos y las células plasmáticas del nódulo linfático se fusionaron con células de mieloma murino P3X63Ag8.U.1 (ATCC CRL1597), usando polietilenglicol al 35 %. Los hibridomas se seleccionaron en medio HAT. Diez días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo de hibridoma se exploraron respecto de mAb que se uniesen al hu FGF19 mediante ELISA. Se clonaron dos veces las líneas celulares que producían anticuerpos contra FGF19 humano mediante dilución limitante. Los hibridomas productores de anticuerpo para FGF19 seleccionados se subclonaron dos veces para asegurar que fuesen monoclonales. Los clones se inocularon para la producción de ascitis y se purificaron los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad de proteína A-agarosa.

55

El ARN total se extrajo de las células de hibridoma que producían los anticuerpos, usando métodos convencionales. Se amplificaron los dominios ligero variable (VL) y pesado variable (VH) usando RT-PCR con los cebadores degenerados para la cadena pesada y ligera. Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos N-terminal de la región VL y VH. Respectivamente, se diseñaron cebadores inversos de LC y HC para hibridarlos a una región en el dominio ligero constante (CL) y el dominio pesado constante 1 (CH1), que está altamente conservado entre especies. Los VL y VH amplificados se clonaron en vectores de expresión de mamífero. La secuencia polinucleotídica de los insertos se determinó usando métodos de secuenciación rutinarios.

60

#### *Análisis de la afinidad y cinética de unión de anticuerpos*

65

Para la cinética de unión, Se usó la medición de resonancia de plasmón superficial (SRP) con un dispositivo

5 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Brevemente, se activaron microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-FGF19 o FGFR4 se diluyó con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml antes de inyectarlo a un caudal de 5 µl/minuto para lograr  
 10 aproximadamente 500 unidades de respuesta (UR) de anticuerpo acoplado. A continuación, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las medidas cinéticas se inyectaron diluciones en serie de factor dos de moléculas de FGF19-His o FGFR4 (0,7 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % a 25°C a un caudal de 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y las velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) se calcularon usando un modelo de unión simple de uno a uno de Langmuir (Programa informático BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se calculó como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ .

#### *Escisión de epítomos de anticuerpo*

15 Se incubó proteína FGF19 (10 µg) durante 2 h en Tris 50 mM, pH 7,4 con 50 µl de anticuerpo acoplado a agarosa. La resina se lavó y se digirió con 0,1 µg de tripsina (Promega) durante toda la noche a 37 °C en bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8. La lechada de gel se lavó y se eluyeron los péptidos unidos con ácido trifluoroacético (TFA) al 10 % y se analizó mediante MALDI-TOF-EM (Voyager; Applied Biosystems). Los péptidos candidatos se sometieron a disociación inducida por colisión (QSTAR) y se secuenciaron manualmente para confirmar la  
 20 identificación del mapeo de masas (figura S1).

#### *Ensayo de unión a anticuerpo en fase sólida*

25 Se saturaron los sitios de unión no específica de placas recubiertas de níquel HisGrab (Pierce) con PBS/BSA al 3 %. Los pocillos se incubaron con 1 µg/ml de FGF19-His en PBS/BSA al 0,3 % durante 1 h. Las placas se lavaron e incubaron durante 1 h con anticuerpos para FGF19 (a concentraciones en el intervalo de 1 µg/ml a 0,000017 µg/ml) en presencia o ausencia de péptidos de FGF19 en PBS/BSA al 0,3 %. Los anticuerpos unidos se detectaron usando una IgG anti-ratón conjugada a HRP (Jackson Immunoresearch) y el sustrato colorigénico de peroxidasa TMB (KPL).

#### *Análisis de expresión de CYP7α1*

30 Se sometió a ayuno a células HEP3B durante toda la noche en medio esencial modificado de Dulbecco:F12 de Ham (50:50) y se trataron con 100 ng/ml de FGF19 durante 6 h en presencia o ausencia de los anticuerpos 1A6, 1A1 o anticuerpo de control de isotipo emparejado (cada uno a concentraciones en el intervalo de 10 µg/ml a 0,04 µg/ml). La expresión de CYP7α1 se evaluó mediante RT-PCR semicuantitativa usando cebadores y sondas específicos de genes (Taqman ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) y se normalizó a la expresión de GAPDH. Se promediaron  
 35 conjuntos de datos por triplicado para cada condición.

#### *Fosforilación de FGFR4/MAPK*

40 Se trató a células HEP3B sometidas a ayuno durante toda la noche en medio sin suero con 40 ng/ml de FGF19 durante 10 min en presencia o ausencia de anticuerpos. Las células se lisaron en tampón R27A (Upstate) complementado con NaF 10 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y comprimido inhibidor de proteasa completo (Roche). Se prepararon los lisados, se sometieron a electroforesis y se analizaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos específicos para fosfo-FRS2, fosfo-MAPK y MAPK (Cell Signaling) y anticuerpo  
 45 específico para FRS2 (Santa Cruz).

#### *Experimentos de xenoinjertos*

50 Todos los protocolos con animales fueron aprobados por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se inoculó a ratones hembra BALB/c atímicos de seis a ocho semanas de edad (Charles Rivers Inc.) por vía subcutánea con  $5 \times 10^6$  células (200 µl/ratón). Después de 7 días, se aleatorizó a los ratones portadores de tumores de volúmenes equivalentes (~100 mm<sup>3</sup>) en grupos (n=10) y se trataron por vía intraperitoneal dos veces a la semana. Los tumores se midieron con un calibre electrónico (Fowler Sylvac Ultra-Cal Mark III) y se calculó el volumen tumoral medio usando la fórmula:  $(A^2 \times L)/2$  (A, el diámetro menor; L, el diámetro mayor). Se analizó la  
 55 diferencia estadística usando la prueba de la t de Student para distribuciones normales. Se consideraron significativos los valores de  $P < 0,05$ .

#### *Fosforilación de FGFR4, FRS2 y β-catenina en xenoinjertos de tumores*

60 Se homogenizaron tumores extirpados de animales tratados con control (gp120) y con anticuerpos anti-FGF19 (1A6) en tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, EDTA 1 mM, desoxicolato de sodio al 0,25 %, NaF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y comprimido mini inhibidor de proteasa (Roche). Se determinaron las concentraciones de proteína de los lisados usando el reactivo de ensayo de proteínas BCA (Pierce). Se incubaron cantidades iguales de proteínas (100 mg de proteína) con 1 µg de anticuerpo anti-FGFR4  
 65 (clon 1G7; Genentech inc.) o anticuerpo anti-FRS2 (UpState) inmovilizado sobre proteína A-sefrosa durante 2 h a 4° C con rotación suave. La matriz se lavó con tampón de lisis y se eluyeron los inmunocomplejos en tampón

Laemmli 2x, se hirvió y se microcentrifugó. Las proteínas se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo de fosfotirosina (dilución 1:1000, 4G10, UpState). Después de lavar e incubar con anticuerpo secundario, se visualizaron las proteínas inmunorreactivas mediante el sistema de detección ECL (Amersham). Se evaluaron los niveles de fosforilación de ERK2 sin inmunoprecipitación previa usando anticuerpo fosfo-ERK2 (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotech) y la fosforilación de  $\beta$ -catenina se evaluó sin inmunoprecipitación previa usando un anticuerpo dirigido contra  $\beta$ -catenina fosforilada en N-terminal (dilución 1:1000, UpState). Se denudaron las membranas (Pierce) y se volvieron a sondar con anticuerpos adecuados para determinar la proteína total.

#### 10 *Obtención de imágenes de Micro-CT y análisis de carcinomas hepatocelulares en ratones TG para FGF19*

Se identificaron los tumores hepáticos mediante obtención de imágenes de micro-ct con Fenestra-LC, un agente de contraste específico para el hígado. Fenestra-LC es un triglicérido yodado que imita a los restos de quilomicrones y explota las rutas metabólicas de lípidos endógenas, dando como resultado una acumulación del contraste en los hepatocitos. Estos agentes se han usado previamente como medios para identificar tumores hepáticos (Lee et al., 1997; Weichert et al., 1996). A los 6 meses de edad, se inyectó a los ratones transgénicos para FGF19 con Fenestra-LC (Advanced Research Technologies Inc. Saint Laurent, Quebec, Canadá), a 20  $\mu$ l/g iv y se permitió una captación hepática consciente de 3 horas antes de eutanasiar a los ratones y reseccionar los hígados para un análisis a grandes rasgos, pesarlos, análisis *ex vivo* de micro-CT (sistema  $\mu$ CT 40; Scanco Medical, Bassersdorf, Suiza) y tinción histológica. Los hígados completos se transfirieron cuidadosamente sobre gamuzas y se sumergieron en aceite de soja (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) en la preparación para la obtención de imágenes de micro-CT. Para cada hígado, se obtuvieron escáneres de 90 minutos con un tamaño de voxel isotrópico de 30  $\mu$ m, con 512 proyecciones a un tiempo de integración de 300 ms, energía de 45 keV y una corriente del tubo de 177 mA. Los archivos de imágenes volumétricas se analizaron usando el programa informático de análisis de imágenes de AnalyzeDirect (Lenexa, KS). Se usó un umbral de intensidad de  $\sim$ 16 unidades de Hounsfield (UH) para segmentar la masa de tejido de la señal de fondo (aceite de soja). Se empleó un segundo umbral (26 UH) para estimar los volúmenes de tejido hepático asociados al tejido hepático funcional que acumularon el agente de contraste, dando como resultado regiones hiper-intensas que definen el tejido hepático normal. Los tejidos hepáticos de ratones transgénicos para FGF19 en donde había atenuación mínima debida a pequeñas concentraciones del agente de contraste, incluyendo la vasculatura, la vesícula biliar y los conductos biliares y las lesiones carcinomatosas hepatocelulares, aparecieron menos intensas. Una media del total de los volúmenes hepáticos de baja intensidad de ratones FVB de tipo silvestre, que no tenían carcinomas hepatocelulares, se restó tanto de los grupos de control transgénicos para FGF19 como de los grupos tratados para obtener los volúmenes asociados únicamente a tumores. Los datos se expresaron como un porcentaje del volumen tumoral del volumen hepático total.

#### 35 *Análisis estadístico*

La significación estadística se analizó usando la prueba de la t de Student de dos colas. Se consideraron significativos los valores de  $P < 0,05$ . Los datos se expresan como la media  $\pm$  D.T.M.

40 Se usaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos 13-17:

#### *Células*

45 Las células HCT116 (ATCC, Rockville, MD) se mantuvieron de manera rutinaria a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5 % en RPMI 1640 que contenía suero fetal sin tetraciclina al 10 % y 4 mmol/l de L-glutamina. Las células privadas de suero se incubaron con vehículo o con FGF19 25-100 ng/ml, 10 min). En experimentos separados, las células se trataron bien con anticuerpo de control (gp120) o con anticuerpo de FGF19 (1A6, 10  $\mu$ g/ml) durante 3-24 h. Para evaluar adicionalmente los efectos en la activación de  $\beta$ -catenina, se pretrataron las células con un inhibidor de proteasoma, MG132 (Biomol, Plymouth Meeting, PA) a una concentración de 1  $\mu$ M durante 4 h seguido de tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 durante 24 h para evaluar la fosforilación de Ser33/Ser37, Ser45 y Thr41 en  $\beta$ -catenina. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS frío y se lisaron para análisis de proteínas o de ARN.

#### 55 *Análisis de inmunoprecipitación y de transferencia de Western*

60 Las células se lisaron en tampón RIPA modificado (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; IGEPAL al 1 %; EDTA 1 mM; desoxicolato de sodio al 0,25 %; NaF 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM; cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) y se aclaró mediante centrifugación. Se determinaron las concentraciones de proteína de los lisados usando el reactivo de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). Se incubaron cantidades iguales de proteínas con anticuerpo específico inmovilizado sobre proteína A-sefarosa (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 4°C con rotación suave. Las perlas se lavaron exhaustivamente con tampón de lisis y se eluyeron los inmunocomplejos en tampón de Lemmli 2X, se hirvieron y se microcentrifugaron. Las proteínas se resolvieron en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos primarios específicos. Después de lavar e incubar con anticuerpos secundarios, se visualizaron las proteínas inmunorreactivas mediante el sistema de detección ECL (Amersham, Arlington Ht. IL). Los anticuerpos usados para la inmunoprecipitación e inmunotransferencia fueron mAb anti- $\beta$ -catenina de BD Transduction (San Diego, CA), anticuerpo anti- $\beta$ -catenina activa dirigido contra  $\beta$ -catenina

desfosforilada en N-terminal, anti-fosfotirosina (4G10) y anticuerpo anti-E-cadherina de UpState Biotech (Charlottesville, VA), anticuerpo anti-fosfo- $\beta$ -catenina (especifico para Ser33/Ser37 y Ser45/Thr41) de Cell Signaling (Danvers, MA) y mAb anti-FGFR4 (1G7) (Genentech, Inc.). En los casos indicados, se desnudaron las membranas (Pierce) y se volvieron a sondar con otro anticuerpo. Las densidades de las bandas de proteína específicas se analizaron usando Adobe Photoshop cs2, versión 9 (Adobe Systems, Mountain View, CA). Los análisis cuantitativos de fosforilación de tirosina y de Ser/Thr de  $\beta$ -catenina y de E-cadherina se llevaron a cabo determinando la relación entre proteína total y la fosforilación usando los datos de tres experimentos separados.

#### *Cromatografía líquida-espectrometría de masas/espectrometría de masas (CL-EM//EM)*

La cuantificación indirecta de los niveles de fosforilación en N-terminal de  $\beta$ -catenina se llevó a cabo usando espectrometría de masas de trampa iónica lineal. Se inmunoprecipitó la  $\beta$ -catenina de células pretratadas con MG132 seguido de tratamiento con mAb de control (gp120) o anti-FGF19 1A6 y se separaron usando SDS-PAGE de Tris-Gly. Los geles se tiñeron con Coomassie y se cortaron las bandas de  $\beta$ -catenina y se redujeron en DTT 10 mM durante 30 min a temperatura ambiente y se alquilaron las cisteínas con yodoacetamida 50 mM durante 15 min a temperatura ambiente antes de la digestión triptica. Los péptidos se digirieron en tripsina (10 ng/ $\mu$ l) en bicarbonato de sodio 50 mM, pH 8,0 y se cargaron las mezclas de péptidos (3 ml) en un cartucho de atrapamiento de 0,25 x 30 mm empaquetado con perlas Vydac 214MS bajo-TFA C4. Este cartucho se colocó en línea con una columna de resolución de 0,1 x 100 mm empaquetada con perlas Vydac 218MS C18. La columna de resolución se construyó usando un capilar de sílice fundido "picofrit" (New Objective) estirado hasta una punta recubierta de metal de 15 mm, que formó un emisor de micro-electropulverización. Los péptidos se eluyeron con gradientes de 1 hora de acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1 % a un caudal de 0,3 ml/min. La espectrometría de masas en tándem dependiente de los datos se llevó a cabo usando un instrumento de trampa iónica lineal (LTQ; Finnigan). Se usó el programa de búsqueda de bases de datos Sequest para generar puntuaciones de correlación cruzada para cada espectro de CID. Se confirmaron las proteínas emparejadas por solo un péptido mediante interpretación manual de los espectros de disociación inducidos por colisión. Los péptidos polifosforilados se confirmaron manualmente. Entonces se integraron las áreas de los picos para determinar la abundancia relativa de péptidos.

#### *Análisis de expresión de genes diana de Wnt*

El ARN total se aisló usando el kit de aislamiento de ARN de Qiagen (Qiagen, CA) y se trató con DNasa (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de ARN se determinó usando un espectrofotómetro ND-1000 (Wilmington, DE). La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo para determinar la abundancia relativa de ARNm de gen diana de Wnt (ciclina D1, CD44, E-cadherina, c-jun). Se marcaron las sondas con FAM (extremo 5') y TAMRA (extremo 3'). Las secuencias de cebadores y sondas fueron las siguientes:

directo de ciclina D1 humana: GCT GCT CCT GGT GAA CAA GC (SEQ ID NO: 26);

Inverso: TGT TCA ATG AAA TCG TGC GG (SEQ ID NO: 27);

Sonda: CAA GTG GAA CCT GGC CGC AAT GAC (SEQ ID NO: 28);

directo de CD44 humano: GAA AAA TGG TCG CTA CAG CAT CT (SEQ ID NO: 29);

Inverso: GGT GCT ATT GAA AGC CTT GCA (SEQ ID NO: 30);

Sonda: CGG ACG GAG GCC GCT GAC C (SEQ ID NO: 31);

directo de E-cadherina humana: GAC TTG AGC CAG CTG CAC AG (SEQ ID NO: 32);

Inverso: GTT GGT GCA ACG TCG TTA CG (SEQ ID NO: 33);

Sonda: CCT GGA CGC TCG GCC TGA AGT G (SEQ ID NO: 34);

directo de c-jun humano: CGT TAA CAG TGG GTG CCA ACT (SEQ ID NO: 35);

Inverso: CCC GAC GGT CTC TCT TCA AA (SEQ ID NO: 36);

Sonda: ATG CTA ACG CAG CAG TTG CAA ACA (SEQ ID NO: 37);

Proteína L-19 específica ribosomal humana (RPL-19):

Directo: AGC GGA TTC TCA TGG AAC A (SEQ ID NO: 38);

Inverso: CTG GTC AGC CAG GAG CTT (SEQ ID NO: 39);

Sonda: TCC ACA AGC TGA AGG CAG ACA AGG (SEQ ID NO: 40).

Las reacciones de amplificación (50 µl) contenían 100 ng de molde de ARN, 5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>, tampón A 1x, 1,2 mmol/l de dNTP, 2,5 U de polimerasa TaqGold, 20 U de inhibidor de RNasa, 12,5 U de transcriptasa inversa MuLV, 2 µmol/l de cada cebador directo e inverso y 5 µmol/l de sonda (Perkin Elmer). Las condiciones de ciclado térmico (detector de secuencia ABI Prism 7700 de Perkin Elmer) fueron 48°C durante 30 minutos, 95°C durante 10 minutos y 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto durante 40 ciclos. Los análisis de datos se llevaron a cabo usando Sequence Detector 1.6.3 (PE Applied Biosystems) y los resultados para los genes de interés se normalizaron al gen RPL19.

10 *Estudios de ARNhc*

Se usó el sistema de vector inducible pHUSH que comprende un plásmido lanzadera de expresión de ARNhc y un armazón de vector vírico que contiene un casete de TetR-IRES-Puro (Hoefflich, KP et al, Cancer res 66:999-1006 (2006)). Se construyeron vectores *knockdown* para FGFR4 diseñando secuencias de ARNpi a medida, convirtiéndolas en ARNhc y probando su eficacia en experimentos de transfección conjunta transitoria en células 293T. Se clonaron las siguientes secuencias de ARHhc en pShuttle-H1 y se transfirió el casete de H1-ARNhc en pHUSH-GW mediante una reacción de recombinación Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA):

20 ARNhc2 de FGFR4 directo: GAT CCC CCC TCG TGA GTC TAG ATC TAT TCA AGA GAT AGA TCT AGA CTC ACG AGG TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO: 41);

Inverso: AGC TTT TCC AAA AAA CCT CGT GAG TCT AGA TCT ATC TCT TGA ATA GAT CTA GAC TCA CGA GGG GG (SEQ ID NO: 42);

25 ARNhc5 de FGFR4 directo: GAT CCC CGA ACC GCA TTG GAG GCA TTA TCA AGA GAA ATG CCT CCA ATG CGG TTC TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO: 43);

Inverso: AGC TTT TCC AAA AAA GAA CCG CAT TGG AGG CAT TTC TCT TGA TAA TGC CTC CAA TGC GGT TCG GG (SEQ ID NO: 44);

30 Control de hEGFP directo: GAT CCC CGC AGC ACG ACT TCT TCA AGT TCA AGA GAC TTG AAG AAG TCG TGC TGC TTT TTT GGA AA (SEQ ID NO: 45);

35 Inverso: AGC TTT TCC AAA AAA GCA GCA CGA CTT CTT CAA GTC TCT TGA ACT TGA AGA AGT CGT GCT GCG GG (SEQ ID NO: 46).

Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación.

40 *Generación de clones celulares inducibles por ARNhc*

Se transfectaron células HCT116 usando LipofectAmine 2000 plus (Invitrogen). Ya que el gen de resistencia a puomicina codificado en el vector se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo de β-actina, se usaron 5 µg/ml de puomicina para seleccionar las células transfectadas que expresan en ARNhc. Se aislaron los clones estables, se trataron con 1 µg/ml de doxiciclina (BD Clontech, San Jose, CA) durante 7 días para inducir la expresión de ARNpi. Se evaluó el *knockdown* funcional de la proteína FGFR4 mediante transferencia de Western.

*Análisis estadístico*

50 Se usó la prueba de la t de Student de dos colas para comparar datos entre dos grupos. Se usó análisis de una vía de la varianza y la prueba de Dunnett para comparar datos entre tres o más grupos. El valor de p < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

**Ejemplo 1: Análisis de la expresión de FGF19 y FGFR4 en tejidos humanos**

55 Se evaluó la expresión de FGF19 y FGFR4 en adenocarcinomas de colon humanos, carcinomas de pulmón epidermoides (SCC) y carcinomas hepatocelulares (HCC). FGF19 se sobreexpresó en 6 de 10 adenocarcinomas de colon (Fig. 2A) y en 7 de 10 SCC de pulmón en relación a tejidos normales (Fig. 2B). En comparación con los tejidos normales, la expresión de FGFR4 no se alteró significativamente en los tumores de colon, pero apareció regulada negativamente en SCC (Fig. 2A y 2B).

60 Para localizar la expresión de ARNm de FGF19 y FGFR4 en tejidos tumorales, se llevó a cabo hibridación *in situ*. El ARN mensajero para ambos genes fue prominente en células epiteliales neoplásicas en adenocarcinomas de colon y SCC de pulmón (Fig. 2C y D). En una micromatriz de tejido compuesta de 35 casos de adenocarcinoma de colon, 26 (74 %) tenían señal positiva para ARNm de FGF19 y 27 (77 %) tenían señal positiva para ARNm de FGFR4. El tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 se dirige tanto a FGF19 no procedente de tumor como a FGF19 procedente de tumor y por lo tanto el tratamiento anti-FGF19 puede tener un beneficio clínico en tumores positivos a FGF19 que



carecen de expresión de FGF19. La tabla 3 muestra la presencia o ausencia de expresión conjunta de ARNm de FGFR4 y/o FGF19 en las muestras de micromatriz de tejido de adenocarcinoma de colon:

Tabla 3: Adenocarcinoma de colon

	FGFR4+	FGFR4-
FGF19+	21 (60 %)	5 (14 %)
FGF19-	6 (17 %)	3 (9 %)

5 El solapamiento entre la presencia de FGF19 y FGFR4 en adenocarcinomas de colon se observó en una mayoría de muestras de tumores. De 14 casos de SCC de pulmón, 14 (100 %) tenían señal positiva para ARNm de FGF19 y 13 (93 %) tenían señal positiva para ARNm de FGFR4. Además, las células epiteliales neoplásicas mostraron una fuerte tinción de proteína FGF19 mediante inmunohistoquímica tanto en adenocarcinomas de colon (Fig. 2C) como en SCC de pulmón (Fig. 2D). Estas frecuencias de expresión relativamente altas sugirieron un solapamiento significativo entre la presencia de FGF19 y FGFR4 en los SCC de pulmón.

15 Debido a que la expresión sistémica de FGF19 en ratones transgénicos promueve los carcinomas hepatocelulares (HCC) (Nicholes et al., 2002), también se evaluó la expresión de ARNm de FGF19 y FGFR4 en muestras de hígado. De 50 casos de carcinoma hepatocelular, 23 (46 %) mostraron señal positiva para ARNm de FGF19 y 30 (60 %) para ARNm de FGFR4. Ambos genes se expresaron en hepatocitos neoplásicos (ejemplos representativos mostrados en la Fig. 2E). Los hepatocitos neoplásicos también mostraron una fuerte tinción de la proteína FGF19 mediante inmunohistoquímica (Fig. 2E). La tabla 4 muestra la presencia o ausencia de expresión conjunta de ARNm de FGFR4 y/o FGF19 en las muestras de micromatriz de tejido de adenocarcinoma de colon:

Tabla 4: HCC

	FGFR4+	FGFR4-
FGF19+	21 (41 %)	4 (8 %)
FGF19-	11 (22 %)	15 (29 %)

Se observó solapamiento entre la expresión de FGFR4 y FGF19 en un gran porcentaje de muestras.

25 Estos resultados demostraron que FGF19 y FGFR4 se expresan en varios tipos de cánceres humanos.

Debido a que la cirrosis a menudo precede al carcinoma hepatocelular, se evaluó la expresión de ARNm de FGF19 en el hígado cirrótico. Estas muestras mostraron fuertes señales de ARNm y proteína FGF19 en hepatocitos de nódulos regenerativos (Fig. 2F), lo que sugiere que la expresión de FGF19 tiene lugar de manera temprana durante la progresión neoplásica del hígado.

35 También se evaluó la expresión de ARNm de FGF19 en varios tipos de tumores epiteliales primarios mediante hibridación *in situ*. Se detectó la expresión de ARNm de FGF19 en 16/38 (42 %) de los casos de adenocarcinoma de mama, 39/70 (56 %) de los casos de adenocarcinoma de ovario y 8/79 (10 %) casos de adenocarcinoma pancreático. Estos resultados demostraron que el ARNm de FGF19 se expresó en varios tipos de tumores primarios. Además, se exploró un panel de adenocarcinoma de colon respecto de la expresión de proteína FGFR4 usando inmunohistoquímica y 18/20 muestras fueron positivas para la expresión de FGFR4.

#### 40 **Ejemplo 2: FGF19 y FGFR4 se expresan en líneas celulares y xenoinjertos de tejidos de tumores humanos**

Se analizó la expresión de ARNm y de proteína de FGF19 y FGFR4 en un panel de líneas celulares tumorales de colon, mama e hígado. Se observó expresión de ARNm de FGF19 en un subconjunto de líneas celulares de cáncer de colon, incluyendo Colo201, Colo205, SW620, SW480 y HCT116 (Fig. 3A). SNU185, SNU398, MCF7 y todas las líneas celulares de cáncer de colon expresaron ARNm de FGFR4. Se determinó la expresión de proteína de FGF19 y FGFR4 en un panel de líneas celulares de cáncer usando análisis de transferencia de Western. Con la excepción de HT29, que no expresó proteína FGF19, los niveles de proteína de FGF19 y FGFR4 coincidieron con su expresión de ARNm en estas líneas celulares (Fig. 3B). La movilidad electroforética de FGF19 secretada por las líneas celulares fue coherente con la masa molecular esperada de 24 kDa. Sin embargo, también se detectaron bandas de menor masa molecular adicionales, que posiblemente representaban proteína truncada.

50 Para verificar que la expresión de proteína FGF19 se mantiene *in vivo*, se evaluaron xenoinjertos tumorales procedentes de líneas celulares de cáncer mediante inmunohistoquímica (Fig. 3C y 3D). El tejido tumoral de xenoinjerto de Colo205 tenía una fuerte expresión de FGF19 en todas las células epiteliales neoplásicas a lo largo del tumor, pero no en el estroma de ratón asociado o en el tejido normal adyacente. Los xenoinjertos de SW620 y de HCT116 mostraron inmunoreactividad positiva en las células neoplásicas dispersas. La inmunohistoquímica del xenoinjerto de la línea celular HT29 negativa a FGF19 no mostró tinción. Estos resultados sugirieron que las líneas celulares de cáncer de colon expresan FGF19 tras su cultivo *in vitro* en placas de cultivo así como en una configuración de xenoinjerto subcutáneo *in vivo*.

#### 55 **Ejemplo 3: FGF19 no es un factor de unión a heparina**

Se llevaron a cabo ensayos de unión a glucosaminoglucano para evaluar directamente si interactúan la proteína FGF19 y la heparina. En un ensayo de unión de fase sólida, FGF19 demostró una unión dependiente de la dosis al proteoglucano heparán sulfato purificado adsorbido a la superficie (Fig. 4A). Por el contrario, FGF19 no se unió al material recubierto. En un ensayo de derribo, FGF19 se unió fuertemente a la matriz de afinidad de heparina-agarosa. Tal como se había comunicado previamente, FGF19 se desorbió únicamente con tampones que contenían concentraciones de NaCl mayores de 1 M. Por el contrario, FGF19 no se unió significativamente a heparina-agarosa a la menor concentración de NaCl ensayada (20 mM) y no pudo detectarse proteína después del lavado con concentraciones mayores de NaCl (Fig. 4B). Juntos, estos resultados indican que FGF19 no se unió significativamente al glucosaminoglucano y por lo tanto no pueden considerarse como un factor de unión a heparina.

#### **Ejemplo 4: FGF19 se une específicamente a FGFR4**

Los estudios de inmunoprecipitación conjunta anteriores sugieren que la especificidad de unión a receptor de FGF19 está restringida a FGFR4 (Xie et al., 1999). Para examinar la especificidad de unión de FGF19 más completamente, se evaluó su interacción con todos los FGFR humanos conocidos en sus diferentes formas de corte y empalme alternativo, incluyendo el FGFR5 (FGFR1L) recientemente identificado (Sleeman et al., 2001). En un ensayo en fase sólida, la unión dependiente de la dosis de FGF19 estaba restringida a FGFR4 (Fig. 4C). En un ensayo de derribo de receptor, FGF19 se unió a todos los FGFR mientras que la interacción de FGF19 se limitó a FGFR4 (Fig. 4D). Estos resultados son coherentes con las observaciones previas (Ornitz et al., 1996; Xie et al., 1999) y pone el acento además en la especificidad de unión única de FGF19 por FGFR4.

#### **Ejemplo 5: La unión de FGF19 a FGFR4 está modulada por glucosaminoglucano**

Se analizó la especificidad del requerimiento de glucosaminoglucano para la unión de FGF19 a FGFR4 usando un ensayo de unión a receptor de fase sólida. Tal como se observa en la Fig. 4E, la heparina constituyó el promotor más potente de la interacción de FGF19 con FGFR4 ( $CE_{50} = 0,0025 \mu\text{g/ml}$ ), seguido de heparán sulfato ( $CE_{50} = 0,9 \mu\text{g/ml}$ ), sulfato de condroitina B ( $CE_{50} = 1 \mu\text{g/ml}$ ) y sulfato de condroitina A ( $CE_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$ ). El sulfato de condroitina C no promovió la unión de FGF19 a FGFR4.

También se analizó el efecto de diversas longitudes del polisacárido de heparina en la promoción de la unión a FGFR4. El octasacárido de heparina mostró únicamente un efecto mínimo en la unión de FGFR4 a la concentración más alta (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 4F). Se observó promoción dependiente de la dosis de FGF19 a FGFR4 con deca-sacárido de heparina y con fragmentos más largos y este efecto fue proporcional al peso molecular de la heparina. En su conjunto, estos resultados demostraron que la heparina es el glucosaminoglucano más potente que apoya la unión de FGF19 a FGFR4 y que la actividad de la heparina fue proporcional a su peso molecular.

#### **Ejemplo 6: FGF19 se une a FGFR4 con alta afinidad**

Se evaluó la afinidad de unión de FGF19 a FGFR4 mediante incubación con concentraciones crecientes de [ $^{125}\text{I}$ ]FGF19 con FGFR4 inmovilizado y heparina en presencia o ausencia de un exceso de ligando no marcado. FGF19 demostró una unión dependiente de la dosis y saturable a FGFR4 (Figura 4G, recuadro). Se determinó una  $K_D$  de 0,25 nM para la unión de FGF19 a FGFR4 usando análisis de Scatchard, lo que confirma que el ligando y el receptor interactúan con alta afinidad.

#### **Ejemplo 7: Generación de anticuerpo monoclonal anti-FGF19**

Se generó un panel de anticuerpos monoclonales de ratón anti-FGF19 tal como se ha descrito anteriormente. La secuencia polinucleotídica de los insertos se determinó usando métodos de secuenciación rutinarios. Las secuencias de aminoácidos de VL y VH del mAb anti-FGF19 1A6 se muestran en la Figura 1.

#### **Ejemplo 8: Análisis de la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal anti-FGF19 usando ensayos de resonancia de plasmón superficial e inmunoabsorbentes ligados a enzimas**

Para determinar la afinidad de unión de los mAb de ratón anti-FGF19, se llevó a cabo una medición mediante resonancia de plasmón superficial (SRP) con un dispositivo BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Anticuerpo	Kd	Kon	Koff
1A6 (anti-FGF19)	< 9pM	$5,6 \times 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$< 5 \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
1D1 (anti-FGF19)	32 nM	$2,4 \times 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$7,7 \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
1A1 (anti-FGF19)	~ 300 nM	$1 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$3 \times 10^{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$

En los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, los mAb anti-FGF19 1A1 y 1A6 se unieron a FGF19 con una

CE50 comparable de 40 pM mientras que el mAb anti-FGF19 1D1 se unió con una CE50 de 400 pM (Fig. 5A). En un ensayo de unión a receptor de fase sólida, 1A6 bloqueó la unión de FGF19 a FGFR4 con una CI50 de 3 nM (Fig. 5B). 1A1, 1D1 y un anticuerpo de control irrelevante no inhibieron esta interacción.

#### 5 **Ejemplo 9:** El anticuerpo anti-FGF19 bloqueó la señalización de FGF19 en un ensayo basado en células

Se llevaron a cabo varios ensayos basados en células para determinar si los anticuerpos anti-FGF19 bloqueaban la interacción de FGF19 y FGFR4.

10 FGF19 desempeña un papel en la homeostasia del colesterol mediante la represión de la expresión hepática de  
 colesterol-7-a-hidroxilasa 1 (Cyp7 $\alpha$ 1), la enzima limitante de la velocidad para la síntesis de colesterol y ácidos  
 biliares (Gutierrez et al (2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 301-306; Yu et al (2000) *J Biol Chem* 275, 15482-  
 15489). Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-FGF19 1A1 y 1A6 o el anticuerpo de control negativo de  
 15 isotipo emparejado (a concentraciones en el intervalo de 10  $\mu$ g/ml a 0,04  $\mu$ g/ml) para bloquear la regulación negativa  
 de Cyp7 $\alpha$ 1 inducida por FGF19 usando células HEP3B de carcinoma hepatocelular (Schlessinger, *Science*  
 306:1506-1507 (2004)) tal como se ha descrito anteriormente. En ausencia de anticuerpo anti-FGF19, el tratamiento  
 con FGF19 redujo la expresión de Cyp7 $\alpha$ 1 en un 75 % (Fig. 5D). El tratamiento con 1,1  $\mu$ g/ml de mAb de ratón anti-  
 FGF19 1A6 suprimió la represión de Cyp7 $\alpha$ 1 inducida por FGF19. Por el contrario, el tratamiento con el mAb de  
 20 ratón anti-FGF19, clon 1A1 solo redujo la represión en un 50 % a la concentración máxima ensayada (10  $\mu$ g/ml),  
 pero no a concentraciones menores de anticuerpo. La presencia de un anticuerpo de control no afectó a la actividad  
 de FGF19. La CI50 para la inhibición del anticuerpo anti-FGF19 1A6 de la regulación negativa de la expresión génica  
 de CYP7 $\alpha$ 1 fue de aproximadamente 0,4  $\mu$ g/ml. La CI50 para la inhibición del anticuerpo anti-FGF19 1A1 de la  
 regulación negativa de la expresión génica de CYP7 $\alpha$ 1 fue de aproximadamente 10  $\mu$ g/ml.

25 También se ensayó la capacidad del mAb anti-FGF19 1A6 para bloquear la activación de la ruta de FGF inducida  
 por FGF19 en células de carcinoma hepatocelular Hep3B (Eswarakumar et al (2005) *Cytokine Growth Factor Rev*  
 16:139-149; Schlessinger, J (2004) *Science* 306:1506-1507). Se trató a células de carcinoma hepatocelular Hep3B  
 privadas de suero con FGF19 en ausencia o presencia de un anticuerpo de control negativo o con diversas  
 concentraciones de los anticuerpos monoclonales anti-FGF19 1A6 o 1D1 (a 30, 10 y 3,3 ng/ml) y se determinó la  
 30 fosforilación de FRS2 y MAPK tal como se describió anteriormente. El tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 bloqueó  
 significativamente la fosforilación de FRS2 y MAPK inducida por FGF19 a todas las dosis probadas (Fig. 5C). Por el  
 contrario, el tratamiento con el anticuerpo de control y el mAb anti-FGF19 1D1 no mostró una actividad inhibitoria  
 significativa.

35 Debido a que FGFR4 desempeña un papel en la migración celular, se evaluó la actividad quimiotáctica de FGF19  
 (Wang et al (2005) *Clin Cancer Res* 10:6169-6178). En un ensayo de cámara de Boyden modificado, FGF19  
 promovió la migración celular de HCT116 de una manera dependiente de la dosis, alcanzando un máximo a 16  
 ng/ml (Fig. 10). Los mAb anti-FGF19 se ensayaron respecto de su capacidad para inhibir la migración celular  
 promovida por FGF19. A 0,1  $\mu$ g/ml, el tratamiento con mAb anti-FG19 1A6 inhibió la migración celular inducida por  
 40 FGF19 (Fig. 5E). El tratamiento con concentraciones mayores de 1A6 redujo la migración celular por debajo del nivel  
 basal de migración celular de HCT116, probablemente inhibiendo el FGF19 tanto añadido de manera exógena como  
 producido de manera endógena.

45 Estos resultados demostraron que el anticuerpo anti-FGF19 1A6 era un potente inhibidor de la actividad de FGF19 *in vitro*.

#### **Ejemplo 10:** El determinante de unión del anticuerpo 1A6 se localiza en la interfaz de unión de FGF19 con FGFR4

50 Se usó una estrategia de espectrometría de masas para localizar los epítomos de los mAb anti-FGF19 1A6 y 1A1 y  
 para evaluar si los componentes conformacionales de FGF19 contribuyeron a su unión. En primer lugar se intentó  
 aislar un péptido que contenía el epítomo a partir de una digestión triptica de FGF19 usando una matriz de afinidad  
 de 1A6 acoplada a agarosa. Esta estrategia no fue satisfactoria, probablemente debido a que la fragmentación de  
 FGF19 comprometió la integridad conformacional del epítomo de 1A6. Para probar esta hipótesis, se modificó el  
 procedimiento y se incubó FGF19 con los anticuerpos acoplados a agarosa y entonces se digirió la proteína  
 55 adsorbida con tripsina. El análisis de la digestión total demostró una fragmentación completa del FGF19 adsorbido,  
 sin que 1A6 enmascarase cualquiera de los sitios de escisión de tripsina (Fig. 6A). Se lavó exhaustivamente la  
 matriz y los péptidos unidos se eluyeron e identificaron mediante espectrometría de masas. Los péptidos adsorbidos  
 de manera no específica se identificaron usando un anticuerpo de control irrelevante acoplado a agarosa en un  
 experimento paralelo.

60 Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 6. El mAb anti-FGF19 1A6 acoplado a agarosa reconoció  
 específicamente el péptido G133-R155 de FGF19 (Fig. 6B y 8A). El mAb anti-FGF19 1A1 acoplado a agarosa  
 reconoció específicamente el péptido G156-R180 (Fig. 6C y 8B).

65 Debido a que la conjugación del mAb anti-FGF19 1D1 a agarosa suprimió su unión a FGF19, se usó un ensayo de  
 competición de péptidos para identificar su epítomo. Únicamente los aminoácidos A183-G192 de FGF19 compitieron

con la unión del mAb 1D1 (Fig. 6D). Este péptido no compitió por la unión del mAb 1A1 a FGF19. Debido a que se usaron péptidos solapantes en este ensayo de competición, se deduce que el epítipo de 1D1 se localiza en los 4 últimos aminoácidos distales de FGF19 (SFEK).

- 5 Los epítopos de los mAb 1A1, 1D1 y 1A6 se mapearon en el modelo estructural descrito previamente de interacción de FGF19 con FGFR4 (Harmer et al (2004) Biochemistry 43, 629-640). Los epítopos de 1A1 y 1D1 están localizados en una porción distal de FGF19 que no está representada en este modelo debido a la ausencia de estructura ordenada. Sin embargo, el epítipo 1A6 se localiza en la interfaz de unión de FGF19 con FGFR4 (Figura 6E). Estos resultados sugieren que el mAb anti-FGF19 1A6 bloquea directamente el sitio de unión a receptor de FGF19.

10

**Ejemplo 11:** El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-FGF19 inhibió el crecimiento tumoral *in vivo*

Para determinar si la neutralización de FGF19 podría inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*, se ensayaron anticuerpos anti-FGF19 en modelos de xenoinjerto de tumor tal como se han descrito anteriormente. Se seleccionaron las líneas celulares de cáncer de colon HCT116 y Colo201 debido a que expresaban tanto FGF19 como FGFR4 (Fig. 3A) y forman tumores *in vivo*. Además, el anticuerpo anti-FGF19 1A6 mostró una actividad de bloqueo en la migración de células HCT116 inducida por FGF19 *in vitro*.

15

Se trató a ratones con tumores de xenoinjertos de HCT116 establecidos dos veces a la semana con 5 mg/kg de mAb anti-FGF19 1A6 o un anticuerpo de control. En el día 35, el tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 suprimió significativamente el crecimiento tumoral en un 57 % ( $p = 0,07$ ,  $n=5$ ) en comparación con el grupo tratado con anticuerpo de control (Fig. 7A). Este estudio se repitió usando una dosis mayor de anticuerpo 1A6 (15 mg/kg; 2x por semana) y se observó una supresión del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (inhibición del crecimiento del 60 %,  $p = 0,01$ ,  $n=5$ ).

20

25

Para verificar que el mAb anti-FGF19 1A6 inhibía el crecimiento tumoral mediante el bloqueo de la actividad de FGF19, se examinaron los tumores al final del estudio respecto de marcadores de señalización de FGFR4. La activación de FGFR4, FRS2, ERK y  $\beta$ -catenina estaba significativamente reducida en tumores de animales tratados con mAb anti-FGF19 1A6 en comparación con los animales tratados con el anticuerpo de control (Fig. 7B).

30

A continuación, se usaron xenoinjertos de Colo201, una línea celular de cáncer de colon que expresa mayores niveles de FGF19 que HCT116 (Fig. 1A). El tratamiento (30 mg/kg; 2X/semana) con mAb anti-FGF19 1A6 suprimió significativamente el crecimiento de tumores de Colo201 establecidos (en el día 27, inhibición del crecimiento del 64 %,  $p = 0,03$ ,  $n=5$ ) en comparación con el anticuerpo de control (Fig. 7C). El análisis de los tumores extirpados demostró que el tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 redujo significativamente la activación de FGFR4, FRS2, ERK y  $\beta$ -catenina en xenoinjertos de tumores en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control (Fig. 7D). Estos resultados demostraron la eficacia del mAb anti-FGF19 1A6 en modelos de cáncer de colon y demostraron su actividad con la inhibición de la activación de FGFR4, FRS2, ERK y  $\beta$ -catenina dependiente de FGF19.

35

40

**Ejemplo 12:** El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-FGF19 previno los carcinomas hepatocelulares y la pérdida de peso en ratones transgénicos para FGF19

La sobreexpresión de FGF19 en los músculos esqueléticos de ratones transgénicos dio como resultado el desarrollo de carcinomas hepatocelulares a los 10-12 meses de edad (Nicholes et al., Am J Pathol. 160:2295-2307, 2002). Para confirmar que FGF19 actúa como promotor tumoral en este modelo, se trató a ratones transgénicos para FGF19 con un iniciador tumoral, dietilnitrosamina (DEN), que aceleró la formación de tumores en un 50 %. Para determinar si el mAb anti-FGF19 1A6 podría prevenir los carcinomas hepatocelulares, se trató a los ratones transgénicos para FGF19 acelerados con DEN con 1A6 o con anticuerpo de control (anti-gp120) durante 6 meses. Al final del tratamiento, todos los ratones tratados con control tenían carcinomas hepatocelulares evidentes multifocales a lo largo de los lóbulos hepáticos mientras que los animales tratados con mAb anti-FGF19 1A6 o bien no tenían tumores hepáticos o, en un caso ( $n^{\circ}$  1862), únicamente un solo pequeño tumor en la superficie diafragmática del lóbulo mediano (Fig. 9A). El peso de los hígados de los ratones tratados con mAb anti-FGF19 1A6 (media =  $1,71 \pm 0,05$  gramos) fueron significativamente menores que los de los ratones tratados con control (media =  $3,15 \pm 0,58$  gramos;  $p = 0,014$ ), pero no fueron significativamente diferentes de los ratones de tipo silvestre FVB (media =  $1,56 \pm 0,08$  gramos;  $p = 0,82$ ). Además, el volumen tumoral se determinó mediante análisis de micro-CT, corregido respecto del volumen tumoral con hígado de FVB normal y se representó gráficamente como un porcentaje del volumen hepático total (Fig. 9B). El porcentaje de volumen tumoral de los ratones tratados con mAb anti-FGF19 1A6 (media =  $7,5 \pm 3,2$  %) fue significativamente menor que el de los ratones tratados con gp120 de control (media =  $23,8 \pm 6,8$  %;  $p = 0,05$ ). Además, el peso de los tumores se correlacionó fuertemente con el porcentaje de volumen tumoral ( $r^2 = 0,993702$ ). Estos datos demostraron claramente que el mAb anti-FGF19 1A6 neutralizó de manera eficaz el FGF19 circulante para prevenir la formación de tumores en ratones transgénicos para FGF19.

50

55

60

Debido a que FGF19 provoca pérdida de peso cuando se sobreexpresa como transgén en ratones (Tomlinson et al. Endocrinology. Mayo de 2002;143(5):1741-7), se evaluaron los pesos corporales de ratones en los dos grupos de tratamiento. Se pesó semanalmente a los ratones y se compararon los pesos corporales entre grupos de tratamiento. A los 3 meses de edad, los ratones tratados con control (peso medio de  $27,98 \text{ g} \pm 0,8351$ ;  $N=5$ )

65

pesaban significativamente menos que los tratados con mAb anti-FGF19 1A6 (peso medio  $21,32 \pm 0,5036$ ;  $N = 6$ ) ( $p < 0,0001$ ). Los pesos de los ratones TG para FGF19 tratados con 1A6 fueron similares a los pesos de ratones de tipo silvestre FVB normales que se evaluaron en un experimento diferente (peso medio  $33,22 \pm 1,838$ ,  $N = 6$ ). Estos datos demostraron que el tratamiento con mAb anti-FGF19 1A6 suprimió de manera eficaz la pérdida de peso inducida por FGF19 en ratones transgénicos para FGF19.

**Ejemplo 13:** El tratamiento con FGF19 indujo fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina y provocó la pérdida de unión de E-cadherina a beta-catenina en células HCT116

Los carcinomas hepatocelulares hallados en ratones transgénicos que expresan FGF19 tienen células neoplásicas que muestran inmunorreactividad con anticuerpos para beta-cadherina ( $\beta$ -catenina o b-cat) (Nicoles et al., anteriormente citado). Además, se ha sugerido que la señalización de Wnt puede iniciar o promover la señalización de FGF en diversos tipos celulares y órganos durante diversos procesos celulares, incluyendo la carcinogénesis colorrectal en seres humanos y que la activación conjunta de las rutas de señalización de Wnt y FGF en tumores da lugar a fenotipos más malignos (véanse las referencias 7-12 en Cancer Biol & Therapy 5:9, 1059-64, 2006). Por lo tanto, se ensayó el efecto de FGF19 o de la inhibición de la señalización de FGF19 en la ruta de señalización de Wnt usando el tratamiento con FGF19, el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-FGF19 1A6 o el *knockdown* de ARNhc dirigido a FGFR4 en células de cáncer de colon humano (HCT116). Se evaluó la fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina, la unión de  $\beta$ -catenina-E-cadherina y los niveles de  $\beta$ -catenina activa en las células tratadas usando ensayos de inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

El tratamiento de las células de cáncer de colon (HCT116) con FGF19 (25-100 ng/ml) dio como resultado un aumento significativo en la fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina en un espacio de tiempo tan breve como de 10 min (Figura 11) en comparación con los controles tratados con vehículo. Se ha demostrado que a unión de  $\beta$ -catenina a cadherinas para formar adhesiones célula-célula estables está regulada por la fosforilación de tirosina de  $\beta$ -catenina. Por lo tanto, se evaluaron los niveles de E-cadherina en células tratadas con FGF19 desnudando y resonando la transferencia de fosforilación de tirosina usando anticuerpo anti-E-cadherina. Los resultados mostraron una pérdida sustancial de unión de E-cadherina a  $\beta$ -catenina en células tratadas con FGF19. Se obtuvieron resultados similares cuando se inmunoprecipitó E-cadherina y el análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo usando anticuerpo anti- $\beta$ -catenina. La reducción de la unión de E-cadherina fue inversamente proporcional a los niveles de fosforilación de tirosina aumentados observados en las células tratadas con FGF19.

**Ejemplo 14:** La inhibición de FGF19 usando el anticuerpo anti-FGF19 1A6 redujo los niveles de  $\beta$ -catenina activa en células CHT116

Los estudios anteriores habían determinado que la degradación de  $\beta$ -catenina regulada por Wnt es esencial para la carcinogénesis (Polakis et al., Genes Dev 14:1837-51, 2000) y que las señales de Wnt se transmiten a través de una  $\beta$ -catenina desfosforilada en N-terminal (Staal FJT et al, EMBO Reports 3:63-68, 2002). Mediante el uso de un anticuerpo específico para  $\beta$ -catenina desfosforilada en los restos Ser37 y Thr41, se examinó si FGF19 o la inhibición de FGF19 afecta a la señalización de Wnt en células HCT116. El tratamiento de células HCT116 con FGF19 no afectó a los niveles de  $\beta$ -catenina activa a ninguna dosis o en ningún momento, lo que indica que FGF19 endógeno activó a  $\beta$ -catenina a niveles saturados de un modo autocrino. Sin embargo, el tratamiento de células HCT116 con anticuerpo anti-FGF19 1A6 redujo significativamente los niveles de  $\beta$ -catenina activa en instantes tan tempranos como 3 h después del tratamiento y redujo de manera sostenida los niveles de  $\beta$ -catenina activa durante hasta 24 h (reducción del  $71,8 \pm 1,5$  % frente a gp120,  $p < 0,001$ ) en comparación con las células tratadas con anticuerpo de control (gp120) (Figura 12).

**Ejemplo 15:** El tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 indujo la fosforilación de Ser33/Ser37/Ser45 y Thr41

Ya que la inhibición de FGF19 redujo los niveles de  $\beta$ -catenina activa en células HCT116, a continuación se evaluó si el tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 dio como resultado un aumento en la fosforilación N-terminal de Ser-Thr de  $\beta$ -catenina y por lo tanto se dirigía a  $\beta$ -catenina para la ubiquitinación y degradación proteasómica. Las células HCT116 pretratadas con un inhibidor del proteasoma (MG132, 1  $\mu$ M) durante 4 h seguido de tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-FGF19 1A6 mostró un aumento significativo en la fosforilación de Ser33/Ser37 y Ser45/Thr41 en comparación con las células tratadas con inhibidor del proteasoma más anticuerpo de control (gp120) (Figura 13). La cuantificación de la fosforilación de Ser33/37 (determinada calculando la proporción entre la proteína  $\beta$ -catenina total y el nivel de proteína fosforilada) mostró un aumento del  $123,4 \pm 7$  % ( $p < 0,05$ ) en las células tratadas con anticuerpo anti-FGF19 1A6 frente a las células tratadas con anticuerpo de control anti-gp120. De manera similar, la fosforilación de Ser45/T41 estaba aumentada en un  $166,8 \pm 11$  % en las células tratadas con anticuerpo monoclonal anti-FGF19 1A6 frente a las células tratadas con anticuerpo anti-gp120 de control ( $p < 0,05$ ).

La fosforilación de Ser-Thr en el extremo N-terminal de  $\beta$ -catenina se analizó adicionalmente usando espectrometría de masas de trampa iónica lineal. Se determinaron las intensidades de señal de péptido de  $\beta$ -catenina no fosforilado usando espectrometría de masas de trampa iónica lineal en células pretratadas con un inhibidor del proteasoma seguido de tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 1A6 o anticuerpo de control anti-gp20. Los datos se normalizaron a péptidos no relacionados (que contenían todos los 4 sitios de fosforilación) que no mostraron diferencia en las

intensidades de señales respecto de las muestras tratadas y no tratadas. El péptido de  $\beta$ -catenina aislado de células tratadas con anticuerpo anti-FGF19 1A6 mostró una menor intensidad de señal en comparación con el péptido de  $\beta$ -catenina aislado de las células tratadas con el anticuerpo de control anti-gp20 (Figura 14), indicando claramente un aumento en la fosforilación del extremo N-terminal de  $\beta$ -catenina en las células tratadas con anticuerpo monoclonal anti-FGF19 1A6.

**Ejemplo 16:** La reducción de la expresión de FGFR4 usando ARNhc dio como resultado niveles reducidos de  $\beta$ -catenina activa

Para determinar si la inhibición del receptor FGFR4 podría imitar el efecto de la inhibición de FGF19 resultante del tratamiento con anticuerpos anti-FGF19, se generaron líneas celulares que expresaban de manera estable ARNhc dirigido a FGFR4 y ARNhc dirigido a EGFP tal como se ha descrito anteriormente. La línea celular estable que expresaba ARNhc dirigido a FGFR4 mostró un *knockdown* eficaz de la expresión de proteína FGFR4. El análisis de inmunotransferencia de los lisados celulares de una línea celular estable que expresaba ARNhc dirigido a FGFR4 mostró una reducción prácticamente completa de los niveles de  $\beta$ -catenina activa en comparación con una línea celular estable de control que expresa ARNhc dirigido a EGFP (Figura 15).

**Ejemplo 17:** El tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 redujo los niveles de transcripción de genes diana de Wnt en células de cáncer de colon

Se determinaron los niveles de expresión de genes diana de Wnt (ciclina D1, CD44, E-cad, c-jun) usando PCR en tiempo real en células HCT116 tratadas con anticuerpo anti-FGF19 1A6. Tal como se muestra en la figura 16, el tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 1A6 redujo los niveles de expresión de ARNm de ciclina D1, CD44, E-cad y c-jun a las 6 h en comparación con la expresión de esos genes en células tratadas con anticuerpo de control (anti-gp120).

*Lista de referencias parcial*

Anthony, P.P. (1979). *J Toxicol Environ Health.*, 5, 301-13.

Bange, J., Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Haring, H.U., Knayzev, P., Iacobelli, S., Hofler, H. y Ullrich, A. (2002). *Cancer Res*, 62.840-7.

Burgess, W.H. y Maciag, T. (1989). *Annu Rev Biochem.*, 58, 575-606.

Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. y Radvanyi, F. (1999). *Nat Genet*, 23, 18-20.

Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M. y Bergsagel, P.L. (2001). *Blood*, 97, 729-36.

Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. y Bergsagel, P.L. (1997). *Nat Genet.*, 16, 260-4.

Dorkin, T.J., Robinson, M.C., Marsh, C., Bjartell, A., Neal, D.E. y Leung, H.Y. (1999). *Oncogene*, 18, 2755-61.

Eswarakumar, V.P., Lax, I. y Schlessinger, J. (2005). *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, 139-49. Publicación Electrónica, 1 de febrero de 2005.

Gowardhan, B., Douglas, D.A., Mathers, M.E., McKie, A.B., McCracken, S.R., Robson, C.N. y Leung, H.Y. (2005). *Br J Cancer*, 92, 320-7.

Harmer, N.J., Pellegrini, L., Chirgadze, D., Fernandez-Recio, J. y Blundell, T.L. (2004). *Biochemistry*, 43, 629-40.

Holcomb, I.N., Kabakoff, R.C., Chan, B., Baker, T.W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H.B., Wright, B.D., Skelton, N.J., Frantz, G.D., Tumas, D.B., Peale, F.V., Jr., Shelton, D.L. y Hebert, C.C. (2000). *Embo J*, 19, 4046-55.

Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang da, Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., Goodwin, B. y Jones, S.A. (2003). *Genes Dev.*, 17, 1581-91. Publicación electrónica del 18 de junio de 2003.

Holzmann, K., Kohlhammer, H., Schwaenen, C., Wessendorf, S., Kestler, H. A., Schwoerer, A., Rau, B., Radlwimmer, B., Dohner, H., Lichter, P., Gress, T. y Bentz, M. (2004). *Cancer Res*, 64, 4428-33.

- Huang, Y.Q., Li, J.J., Nicolaidis, A., Zhang, W.G. y Friedman-Kien, A.E. (1993). *Anticancer Res.*, 13, 887-90.
- Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P. y Nevanlinna, H. (1993). *Int J Cancer.*, 54, 378-82.
- 5 Jang, J.H., Shin, K.H. y Park, J.G. (2001). *Cancer Res*, 61, 3541-3.
- Jang, J.H., Shin, K.H., Park, Y.J., Lee, R.J., McKeegan, W.L. y Park, J.G. (2000). *Cancer Res*, 60, 4049-52.
- 10 Jeffers, M., LaRoche, W.J. y Lichtenstein, H.S. (2002). *Expert Opin Ther Targets*, 6, 469-82. Kan, M., Wu, X., Wang, F. y McKeegan, W.L. (1999). *J Biol Chem*, 274, 15947-52.
- Kiuru-Kuhlefelt, S., Sarlomo-Rikala, M., Larramendy, M.L., Soderlund, M., Hedman, K., Miettinen, M. y Knuutila, S. (2000). *Mod Pathol.*, 13, 433-7.
- 15 Kobayashi, M., Ikeda, K., Hosaka, T., Sezaki, H., Someya, T., Akuta, N., Suzuki, F., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y. y Kumada, H. (2006). *Cancer.*, 106, 636-47.
- Krejci, P., Dvorakova, D., Krahulcova, E., Pachernik, J., Mayer, J., Hampl, A. y Dvorak, P. (2001). *Leukemia*, 15, 228-37.
- 20 Lee, F.T., Jr., Chosy, S.G., Naidu, S.G., Goldfarb, S., Weichert, J.P., Bakan, D.A., Kuhlman, J.E., Tambeaux, R.H. y Sproat, L.A. (1997). *Radiology.*, 203, 465-70.
- Liscia, D.S., Merlo, G.R., Garrett, C., French, D., Mariani-Costantini, R. y Callahan, R. (1989). *Oncogene*, 4, 1219-24.
- 25 Marsh, S.K., Bansal, G.S., Zammit, C., Barnard, R., Coope, R., Roberts-Clarke, D., Gomm, J.J., Coombes, R.C. y Johnston, C.L., (1999). *Oncogene*, 18, 1053-60.
- 30 Mattila, M.M., Ruohola, J.K., Valve, E.M., Tasanen, M.J., Seppanen, J.A. y Harkonen, P.L. (2001). *Oncogene*, 20, 2791-804.
- Mauad, T.H. van Nieuwkerk, C.M., Dingemans, K.P., Smit, J.J., Schinkel, A.H., Notenboom, R.G., van den Bergh Weerman, M.A., Verkruijsen, R.P., Groen, A.K., Oude Elferink, R.P. et al. (1994). *Am J Pathol*, 145, 1237-45.
- 35 Morimoto, Y., Ozaki, T., Ouchida, M., Umehara, N., Ohata, N., Yoshida, A., Shimizu, K. e Inoue, H. (2003). *Cancer*, 98, 2245-50.
- Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E., Hillan, K., Wright, B., Frantz, G.D., Pham, T.A., Dillard-Telm, L., Tsai, S.P., Stephan, J.P., Stinson, J., Stewart, T. t French, D.M. (2002). *Am J Pathol*, 160, 2295-307.
- 40 Ornitz, D.M. e Itoh, N. (2001). *Genome Biol*, 2, REVIEWS3005.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G. & Goldfarb, M. (1996). *J Biol Chem.*, 271, 15292-7.
- 45 Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R. y Mohammadi, M. (1999). *Cell.*, 98, 641-50.
- Popovici, C., Zhang, B., Gregoire, M.J., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D. y Pebusque, M.J. (1999). *Blood*. 93, 1381-9.
- 50 Powers, C.J., McLeskey, S.W. y Wellstein, A. (2000). *Endocr Relat Cancer*, 7, 165-97.
- Qian, Z.R., Sano, T., Asa, S.L., Yamada, S., Horiguchi, H., Tashiro, T., Li, C.C., Hirokawa, M., Kovacs, K. y Ezzat, S. (2004). *J Clin Endocrinol Metab.*, 89, 1904-11.
- 55 Richelda, R., Ronchetti, D., Baldini, L., Cro, L., Viggiano, L., Marzella, R., Rocchi, M., Otsuki, T., Lombardi, L., Maiolo, A.T. y Neri, A. (1997). *Blood.*, 90, 4062-70.
- 60 Ruohola, J.K., Viitanen, T.P., Valve, E.M., Seppanen, J.A., Loponen, N.T., Keskitalo, J.J., Lakkakorpi, P.T. y Harkonen, P.L. (2001). *Cancer Res*, 61, 4229-37.
- Schlessinger, J. (2004). *Science.*, 306, 1506-7.
- 65 Shimokawa, T., Furukawa, Y., Sakai, M., Li, M., Miwa, N., Lin, Y.M. y Nakamura, Y. (2003). *Cancer Res*, 63, 6116-20.

Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D. y Murison, J.G. (2001). *Gene.*, 271, 171-82.

5 Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W. y Ullrich, A. (2004). *Int J Cancer*, 111, 213-7. Wang, J., Stockton, D.W. e Ittmann, M. (2004). *Clin Cancer Res.*, 10, 6169-78.

Weichert, J.P., Longino, M.A., Spigarelli, M.G., Lee, F.T., Jr., Schwendner, S.W. y Counsell, R.E. (1996). *Acad Radiol.*, 3, 412-7.

10 Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J. y Fletcher, J.A. (1998). *Nat Genet.*, 18, 84-7.

15 Xie, M.H., Holcomb, I., Deuel, B., Dowd, P., Huang, A., Vagts, A., Foster, J., Liang, J., Brush, J., Gu, Q., Hillan, K., Goddard, A. y Gurney, A.L. (1999). *Cytokine*, 11, 729-35.

Yamada, S.M., Yamada, S., Hayashi, Y., Takahashi, H., Teramoto, A. y Matsumoto, K. (2002). *Neurol Res.*, 24, 244-8.

20 Yu, C., Wang, F., Jin, C., Huang, X. y McKeehan, W.L. (2005). *J Biol Chem.*, 280, 17707-14. Publicación electrónica de 4 de marzo de 2005.

25 Zaharieva, B.M., Simon, R., Diener, P.A., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knonagel, H., Rist, M., Wilber, K., Hering, F., Schonenberger, A., Flury, R., Jager, P., Fehr, J.L., Mihatsch, M.J., Gasser, T., Sauter, G. y Toncheva, D.I. (2003). *J Pathol*, 201, 603-8.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención.

30



## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-FGF19 aislado que se une específicamente a FGF19 humano, en donde el anticuerpo se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos GFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR (SEQ ID NO: 9), en donde el anticuerpo bloquea la unión de FGF19 a FGFR4.
2. El anticuerpo anti-FGF19 de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende seis secuencias de región hipervariable (HVR) que consiste en:
- (a) HVR-L1 que comprende la secuencia KASQDINSFSL (SEQ ID NO: 1);  
 (b) HVR-L2 que comprende la secuencia RANRLVD (aminoácidos 50-56 de la SEQ ID NO: 4);  
 (c) HVR-L3 que comprende la secuencia LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 3);  
 (d) HVR-H1 que comprende la secuencia TYGVH (SEQ ID NO: 5);  
 (e) HVR-H2 que comprende la secuencia VIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 6); y  
 (f) HVR-H3 que comprende la secuencia KEYANLYAMDY (SEQ ID NO: 7).
3. El anticuerpo anti-FGF19 de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende:
- un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia:
- DIKMTQSPSSMYASLGERVTIPCKASQDINSFSLWFQKQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF  
 SGGSGSQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR (SEQ ID NO:4);
- y/o
- un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia:
- QVQLKQSGPGLVQPSQSLISITCTVSGFSLTTYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYN  
 AAFISRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVA (SEQ ID NO:8).
4. Un anticuerpo anti-FGF19 aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que una forma de IgG de longitud completa del anticuerpo se une específicamente a FGF19 humano con una  $k_{on}$  de  $6 \times 10^5$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) o superior y/o en el que la  $K_{off}$  es de  $5 \times 10^{-6}$  ( $s^{-1}$ ) o superior.
5. Un anticuerpo anti-FGF19 aislado que (i) se une al mismo epítipo en FGF19 humano que el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o (ii) compite por la unión a FGF19 humano con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo o un inmunocombinado.
7. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. Una composición que comprende un anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición comprende además un segundo medicamento, en donde el anticuerpo es un primer medicamento.
10. Un kit que comprende un anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
11. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para su uso en un método para tratar un tumor, un cáncer, un trastorno proliferativo o la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células tumorales en un individuo que necesite dicho tratamiento, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19.
12. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 11, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y carcinoma hepatocelular.
13. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de las reivindicaciones 11 o 12, en donde el método comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo medicamento, en donde dichos anticuerpo o composición anti-FGF19 son un primer

medicamento.

- 5 14. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 13, en donde el segundo medicamento se administra antes de o después de la administración de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19 o se administra de manera concurrente con dichos anticuerpo o composición anti-FGF19.
- 10 15. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde además la expresión de FGF19 o la expresión de FGFR4 se detectan en una muestra biológica *in vitro* del individuo antes, durante o después de la administración de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19.
- 15 16. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para su uso en un método para tratar un trastorno hepático o para modular un trastorno asociado a la expresión o la actividad de FGF19 o a la expresión o la actividad de FGFR4 en un individuo que necesite dicho tratamiento, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19.
- 20 17. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 16, en donde el trastorno hepático es cirrosis o el trastorno asociado a la expresión o la actividad de FGF19 o a la expresión o la actividad de FGFR4 es colestasis o desregulación del metabolismo de los ácidos biliares.
- 25 18. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para su uso en un método para tratar un trastorno de emaciación en un individuo que necesite dicho tratamiento, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19.
- 30 19. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 18, en donde el individuo tiene un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.
- 35 20. Un método para detectar un trastorno asociado a la expresión y/o la actividad de FGF19 o la expresión y/o la actividad de FGF19 y la expresión y/o la actividad de FGFR4, comprendiendo el método detectar FGF19 o FGF19 y FGFR4 en una muestra biológica *in vitro* de un individuo usando un anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para detectar un complejo de FGF19-anticuerpo anti-FGF19.
- 40 21. El método de la reivindicación 20, en el que la expresión de FGF19 o la expresión de FGF19 y FGFR4 es expresión aumentada en relación a la expresión en una muestra de control.
- 45 22. El método de las reivindicaciones 20 o 21, en donde el trastorno es un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.
- 50 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, en donde el trastorno es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y/o cáncer pancreático.
- 55 24. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para su uso en un método para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular en un individuo que necesita dicho tratamiento, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19, en donde la expresión de FGF19 y la expresión de FGFR4 se detectan en una muestra biológica antes, durante o después de la administración de dichos anticuerpo o composición anti-FGF19.
- 60 25. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 24, en donde el cáncer es carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer de mama o cáncer pancreático.
- 65 26. El anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 24 o 25, en donde el uso comprende además administrar una cantidad eficaz de un segundo medicamento, en donde el anticuerpo es el primer medicamento.
27. El método de la reivindicación 20, que además comprende una etapa posterior de seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección del tratamiento se basa en la expresión de FGF19 y/o de FGFR4 detectada en la etapa de detección.
28. El método de la reivindicación 27, en el que se detecta la expresión de FGF19 y/o de FGFR4 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19.

**Secuencias VL**

**n.º de Kabat** 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto- CDR L1

mu1A6 D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R V T I P C K A S Q D I N S F L S W F Q

**n.º de Kabat** 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2

mu1A6 Q K P G K S P K T L I Y R A N R L V D G V P S R F S G S G S G Q D Y S L T I S S L E Y

**n.º de Kabat** 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3

mu1A6 E D M G I Y Y C L Q Y D E F P L T F G A G T K V E I K R

**FIG. 1A**

Secuencias VH

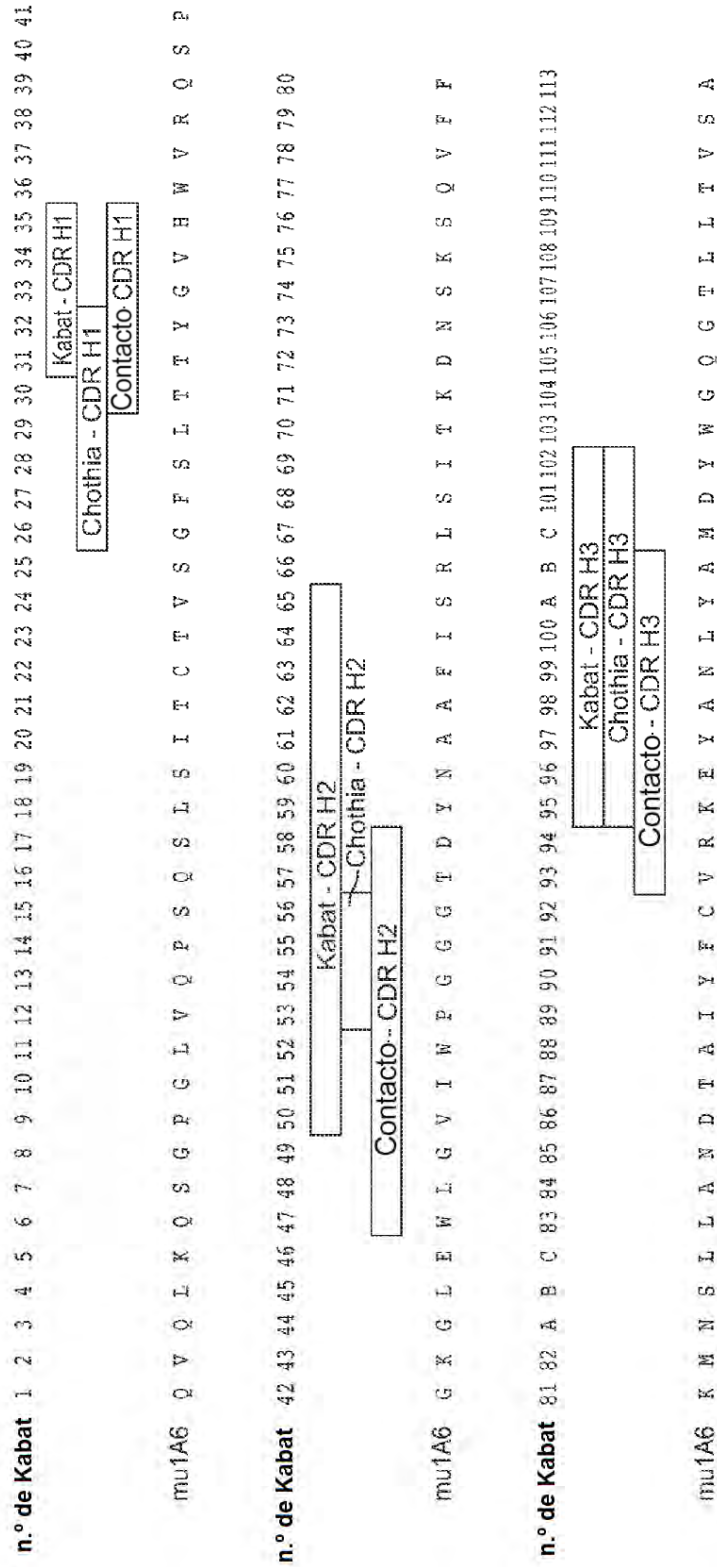
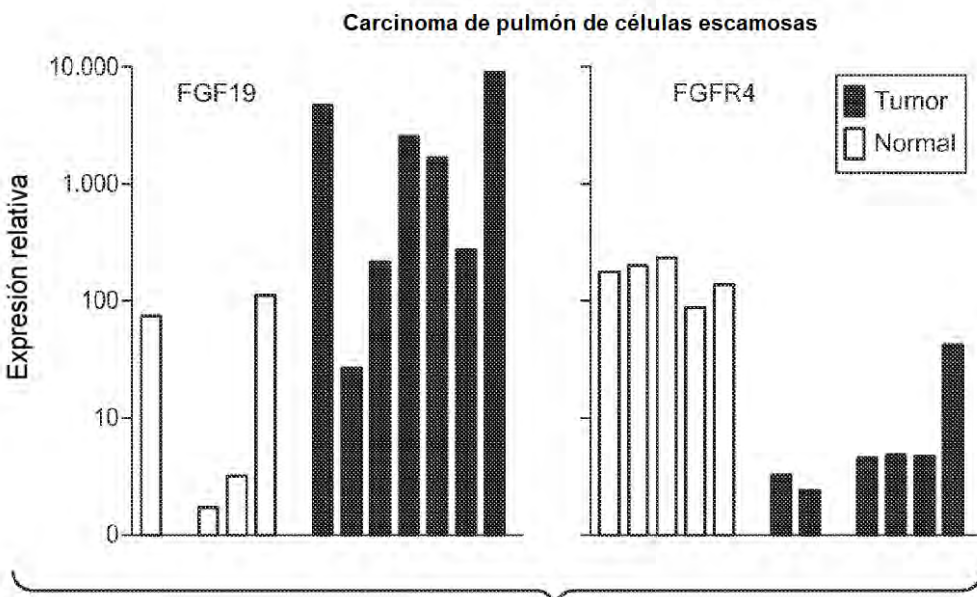
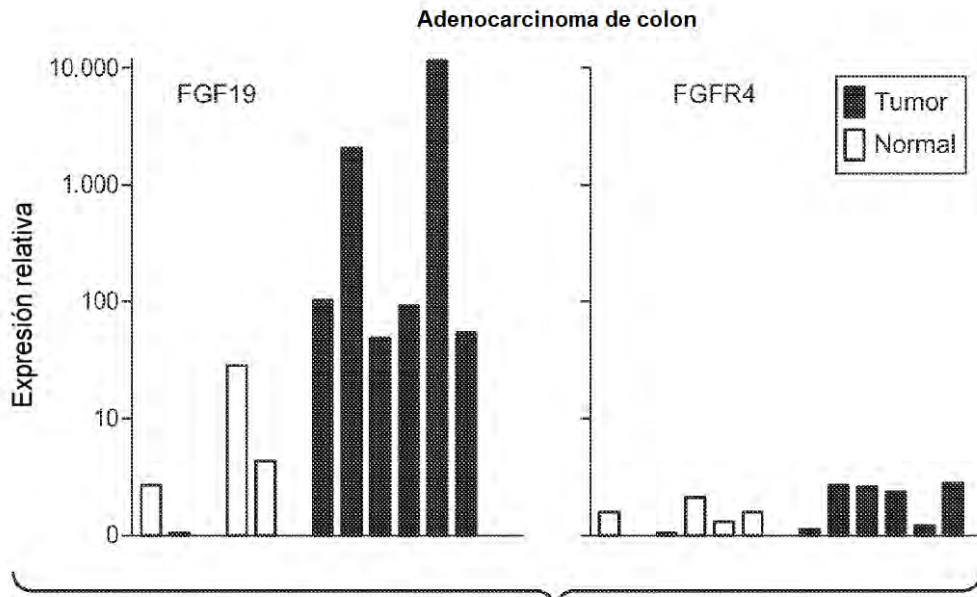
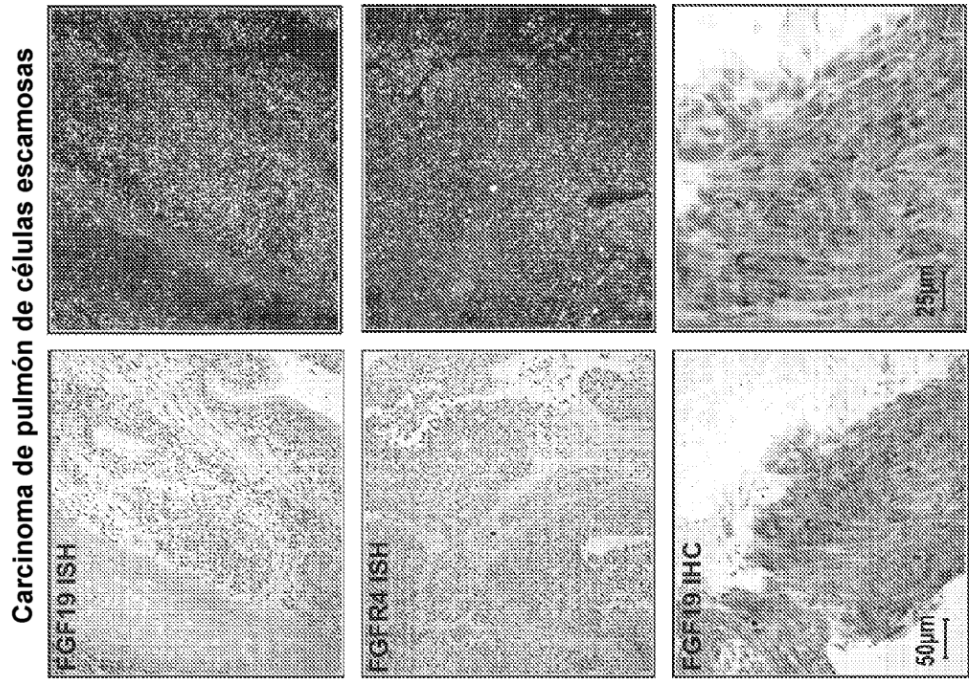
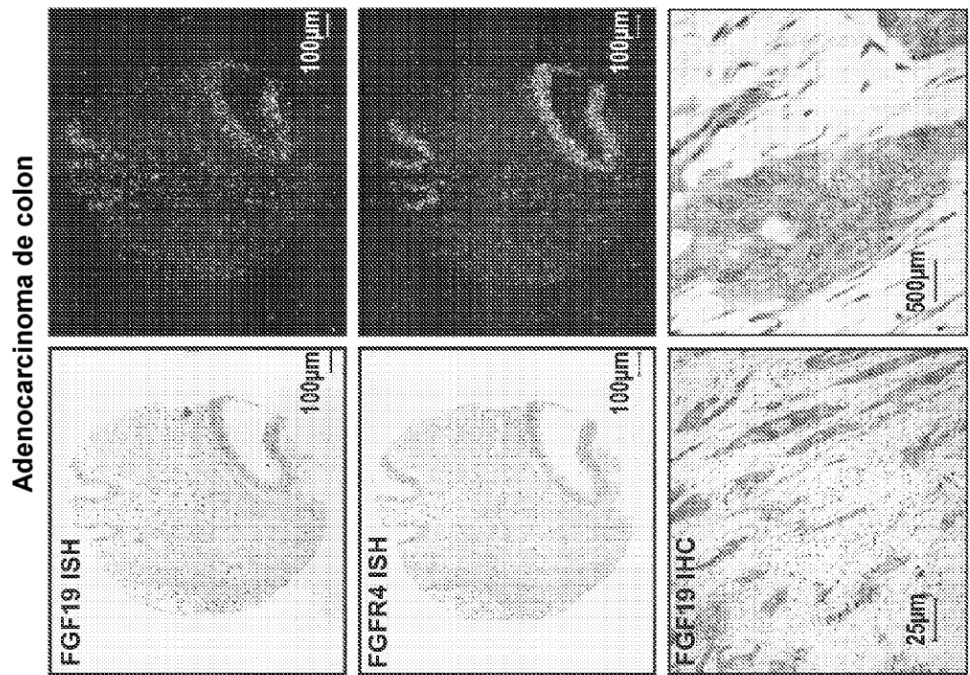


FIG. 1B

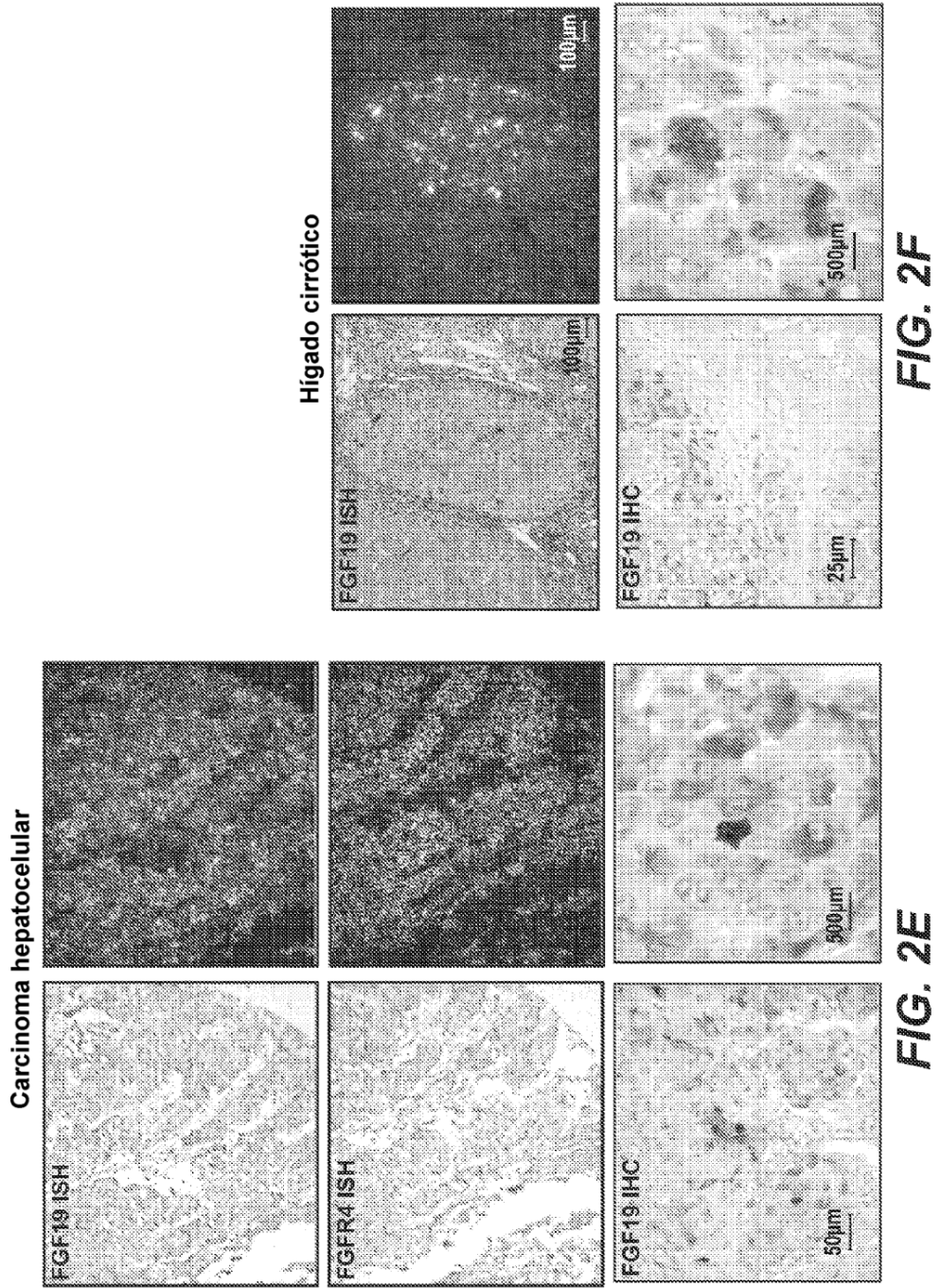


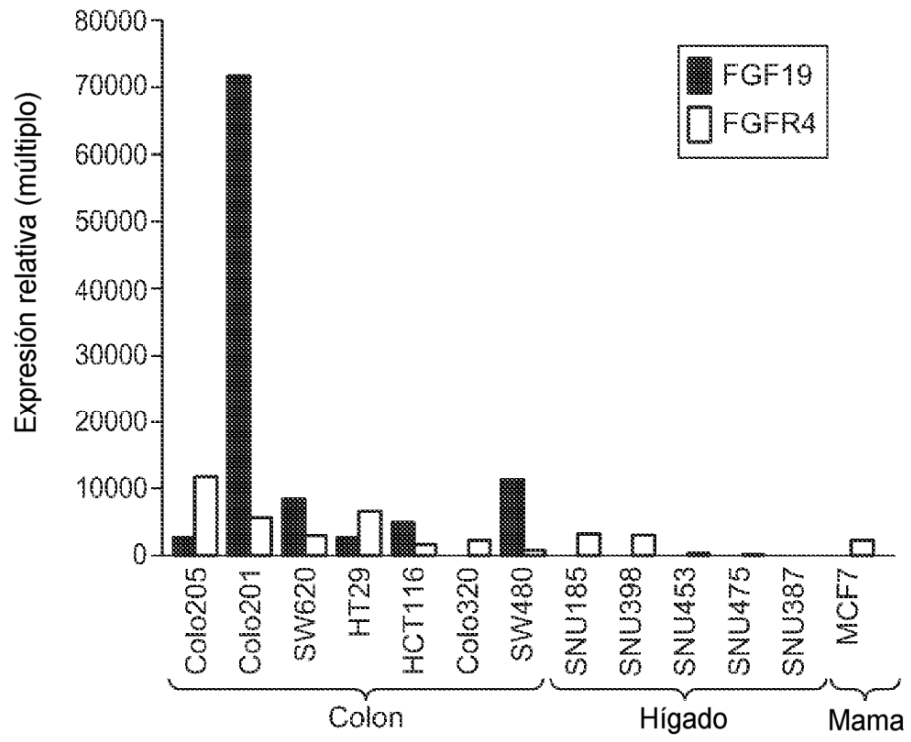


**FIG. 2D**



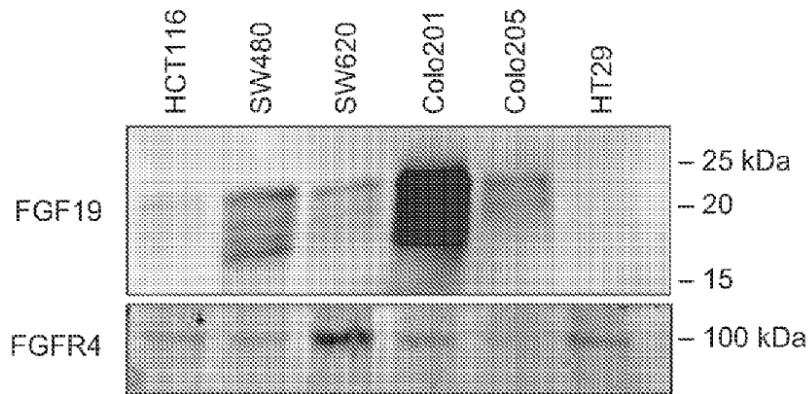
**FIG. 2C**



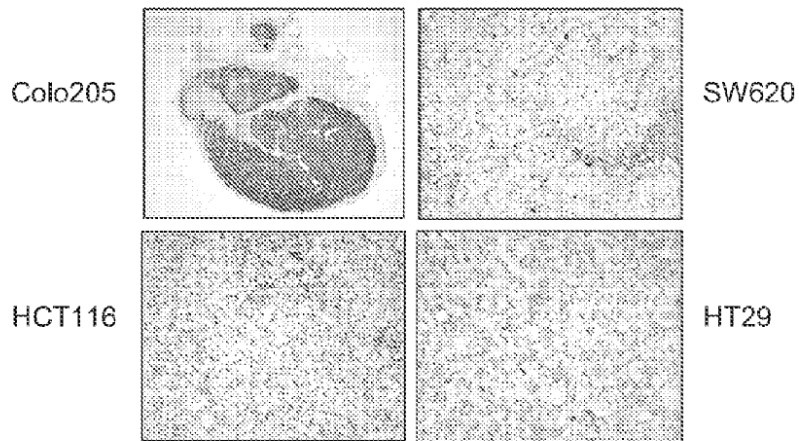


**FIG. 3A**

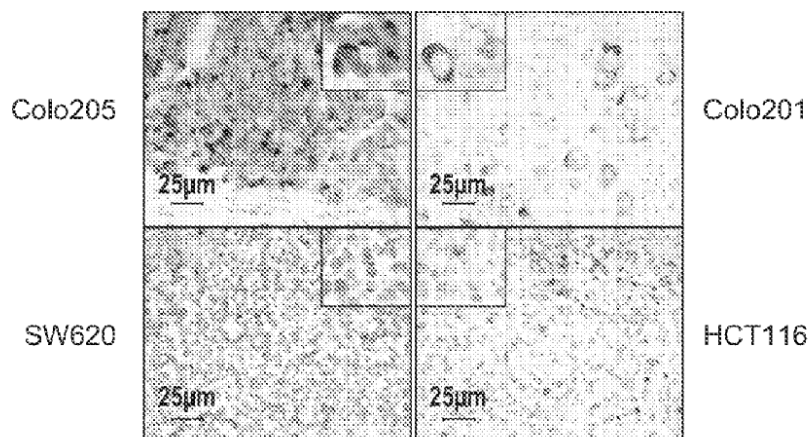




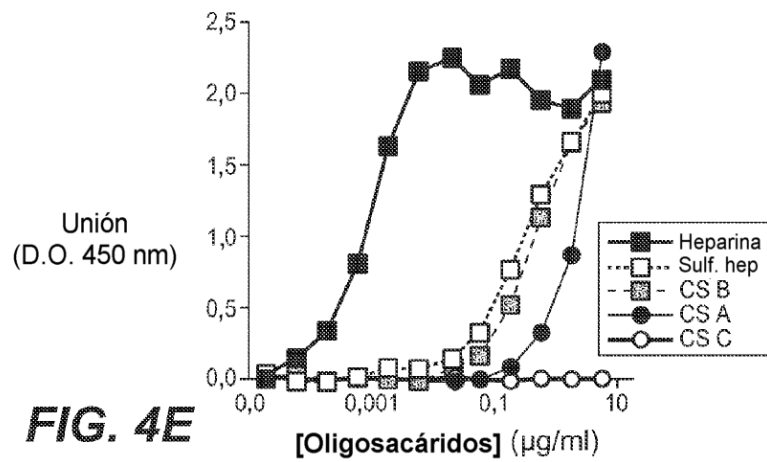
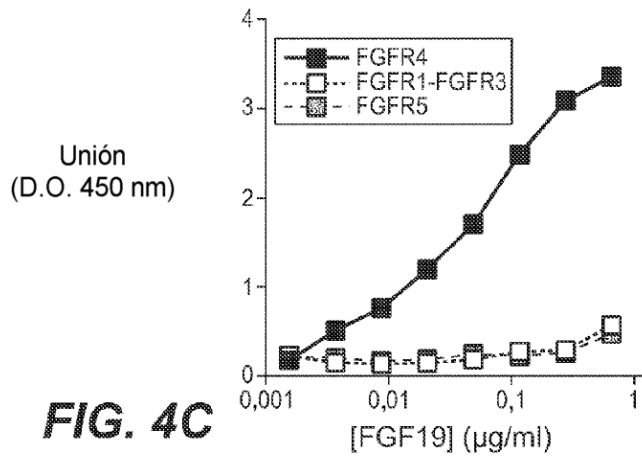
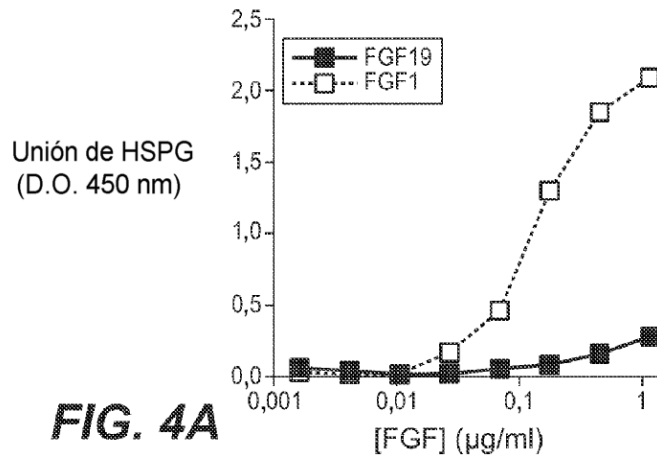
**FIG. 3B**

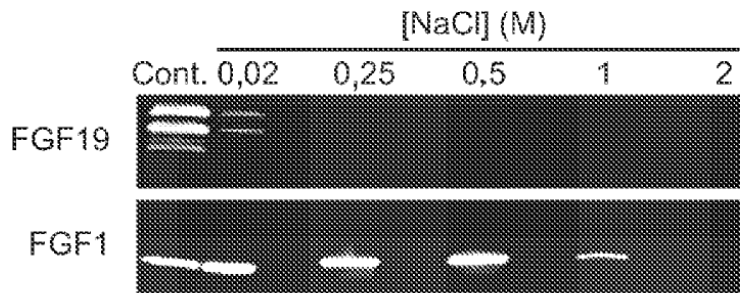


**FIG. 3C**

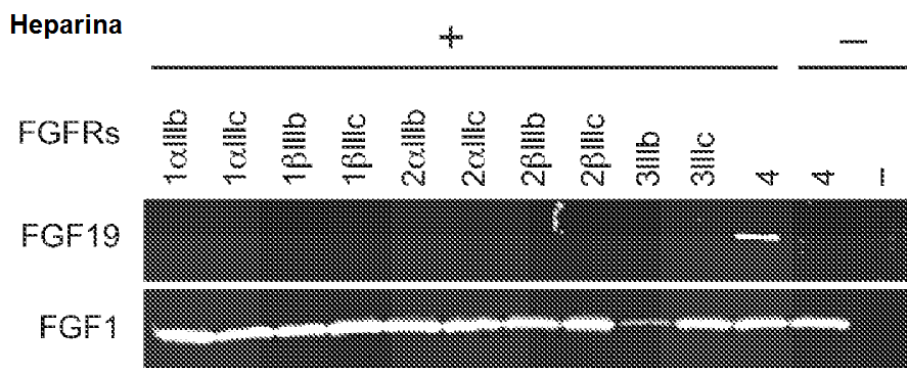


**FIG. 3D**

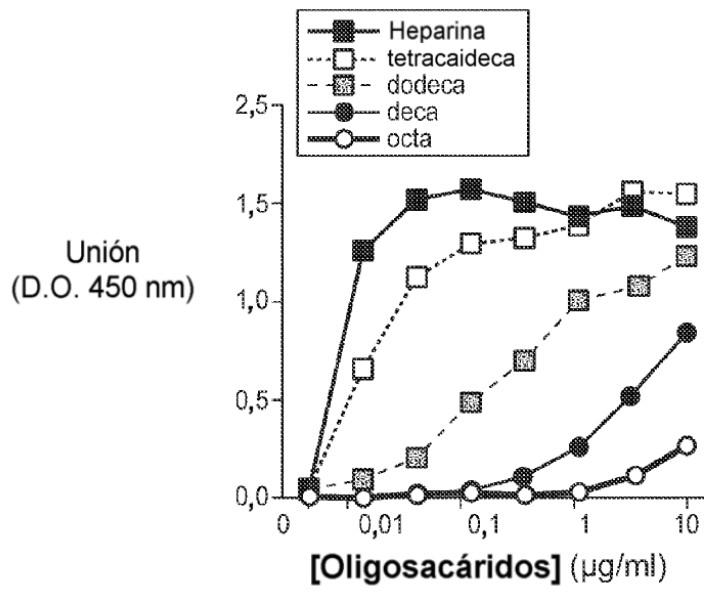




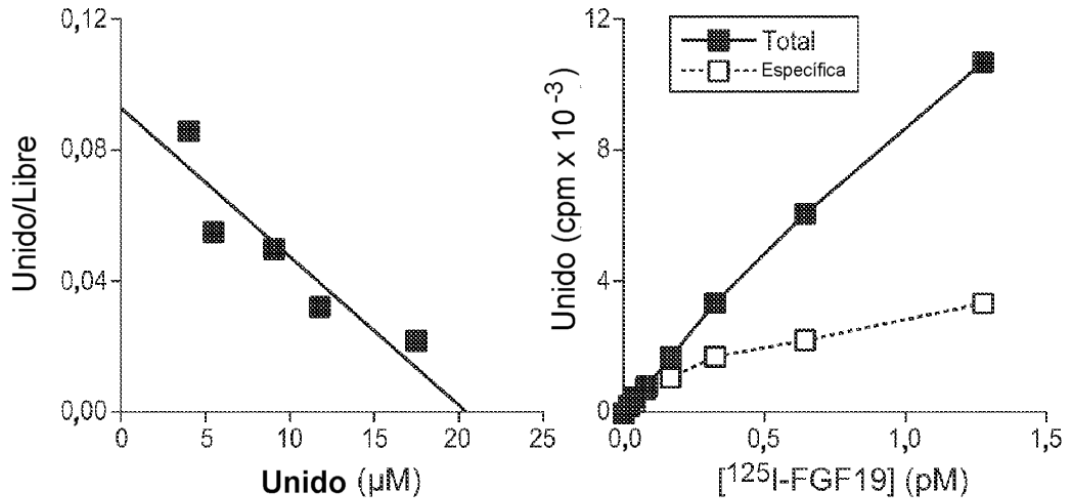
**FIG. 4B**



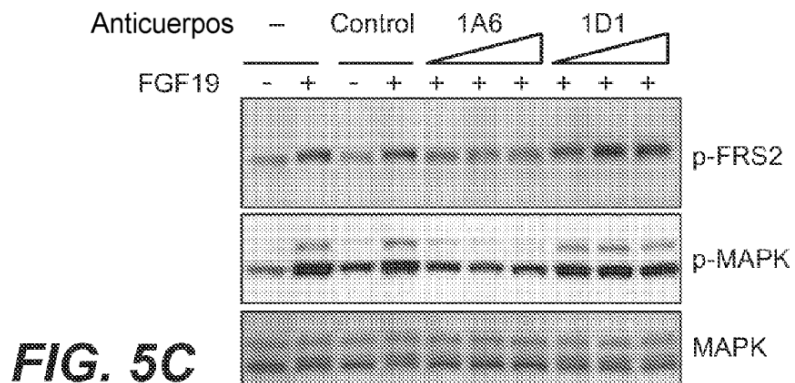
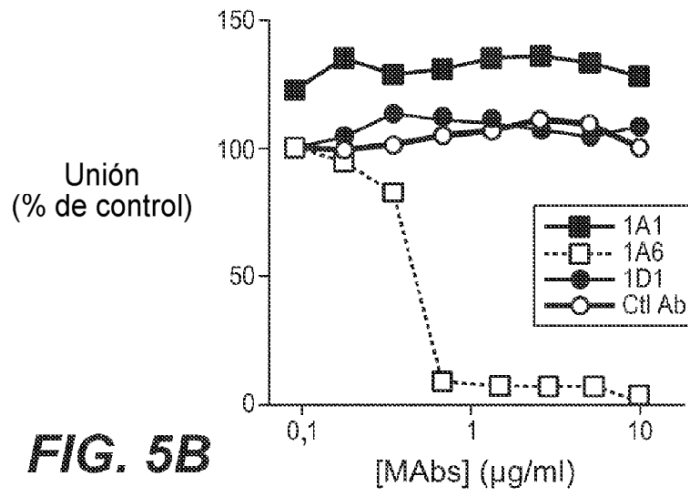
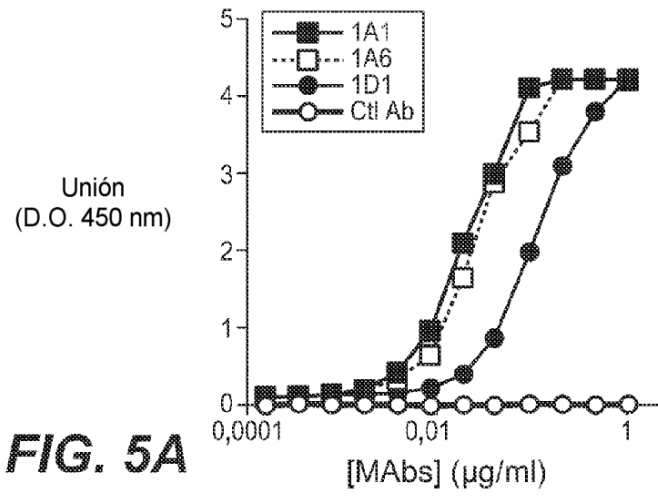
**FIG. 4D**

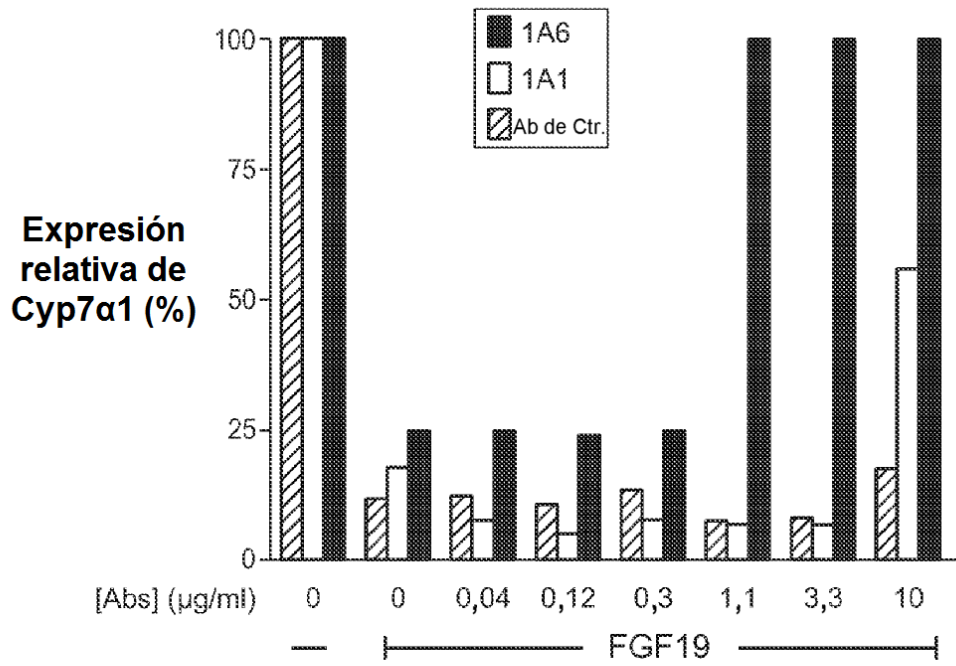


**FIG. 4F**

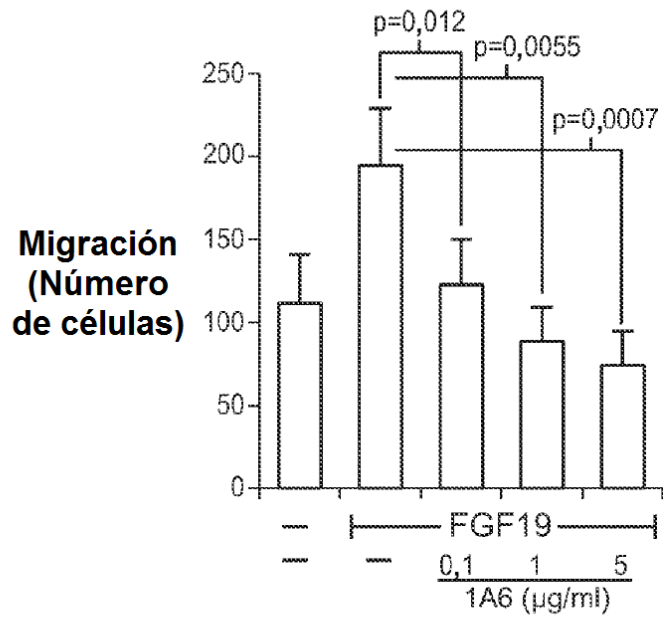


**FIG. 4G**

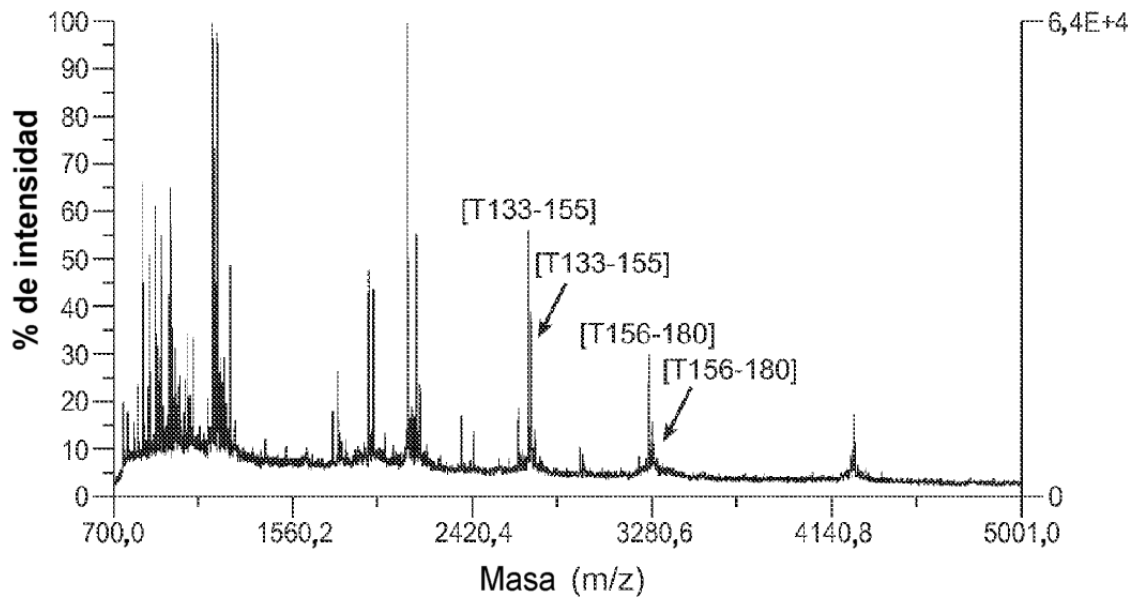




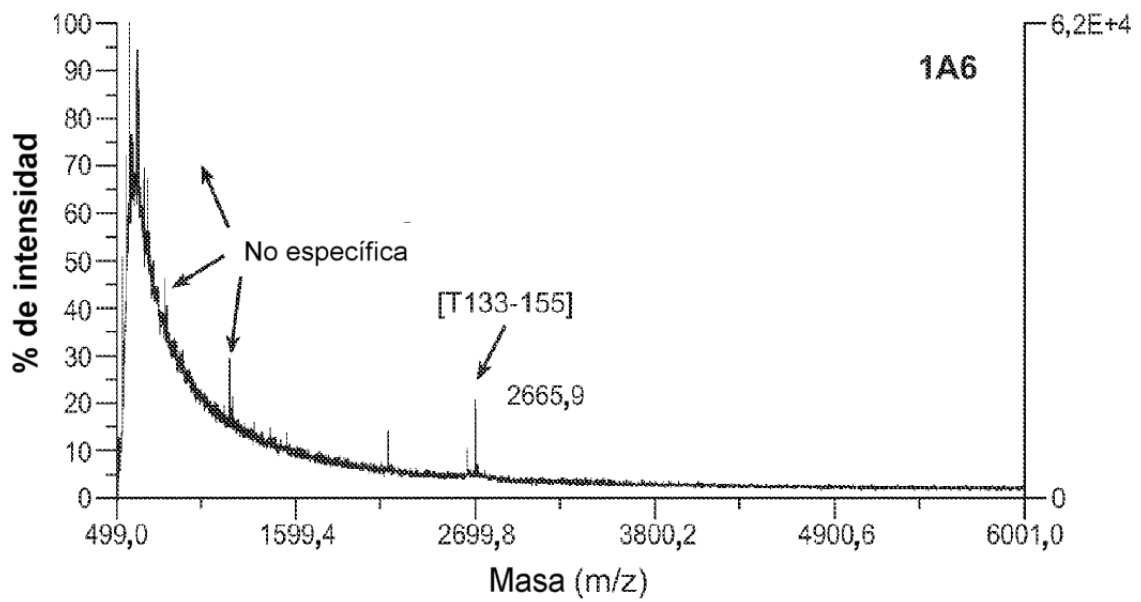
**FIG. 5D**



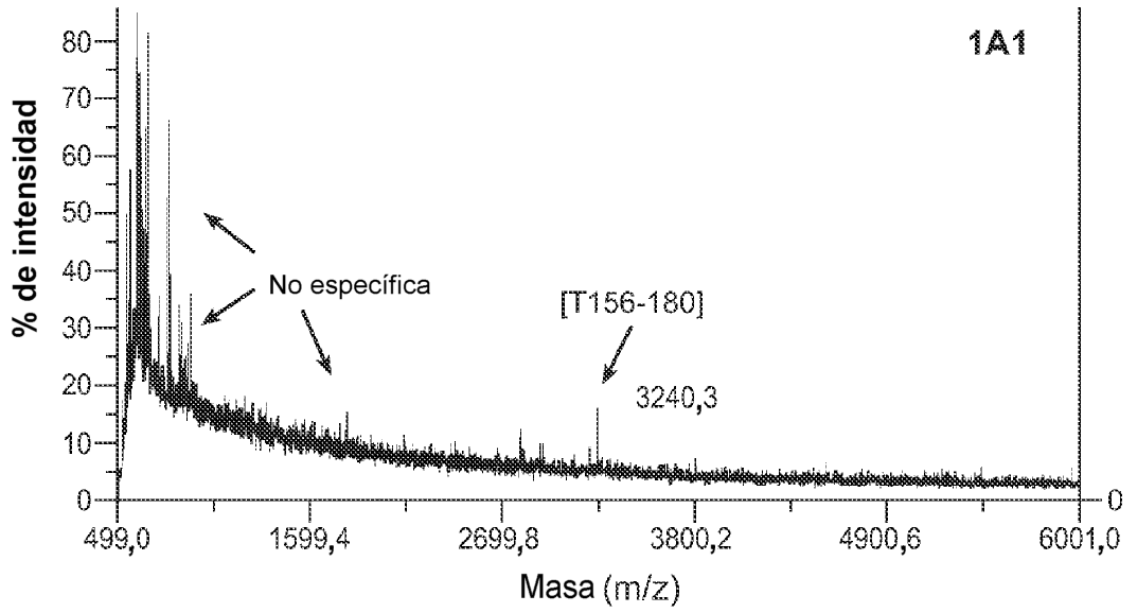
**FIG. 5E**



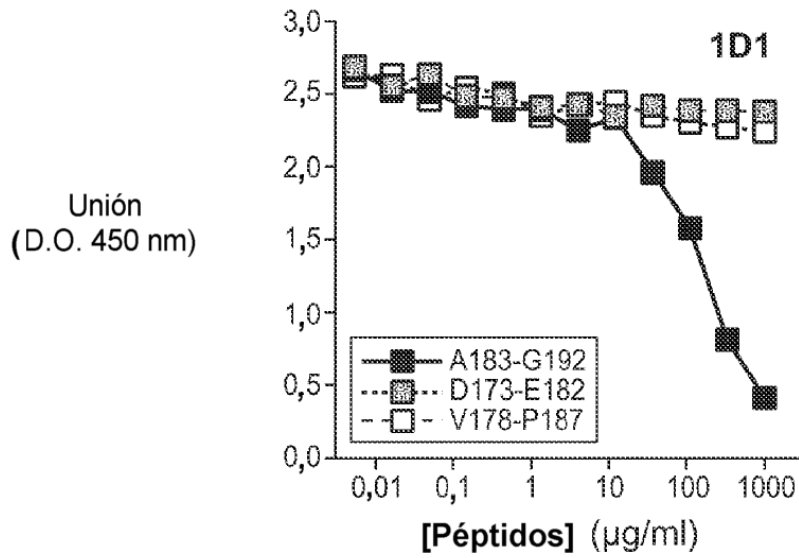
**FIG. 6A**



**FIG. 6B**

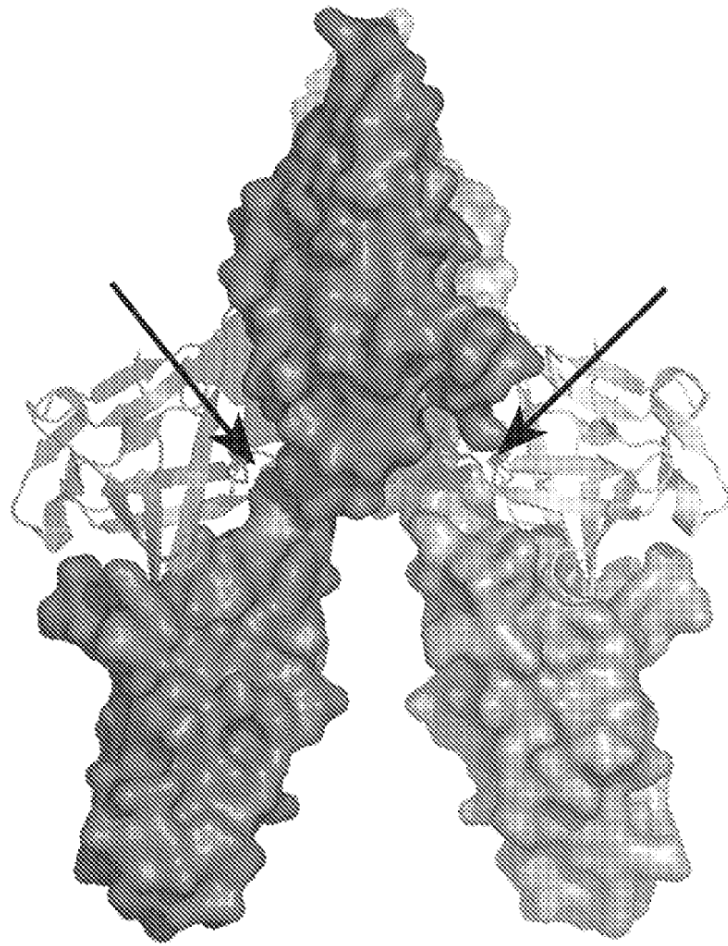


**FIG. 6C**

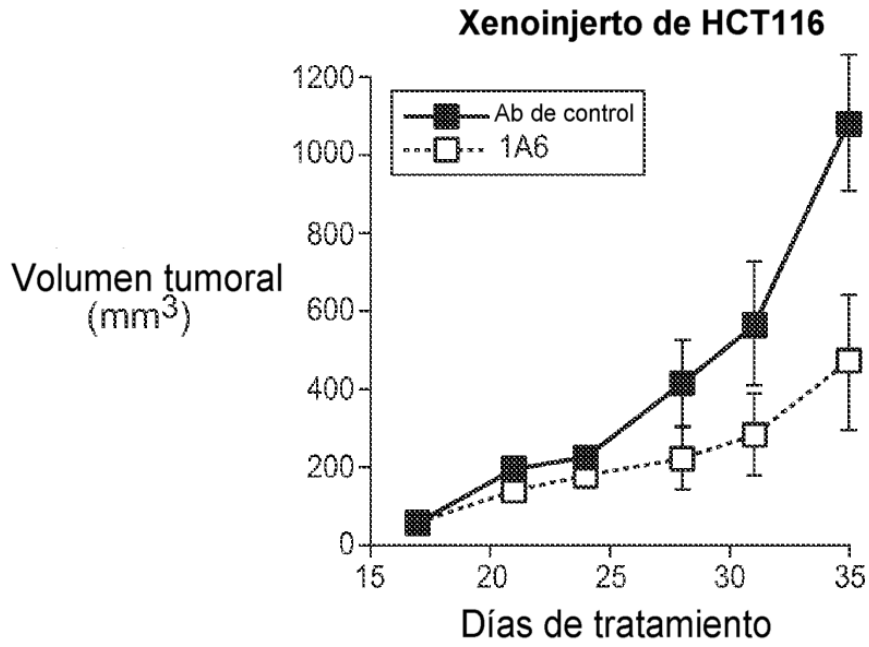


**FIG. 6D**

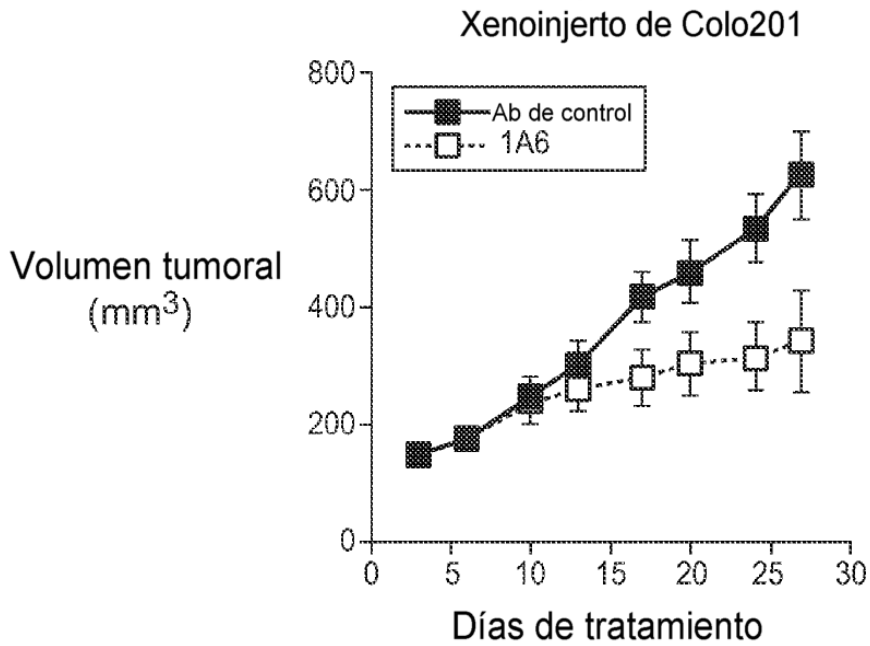




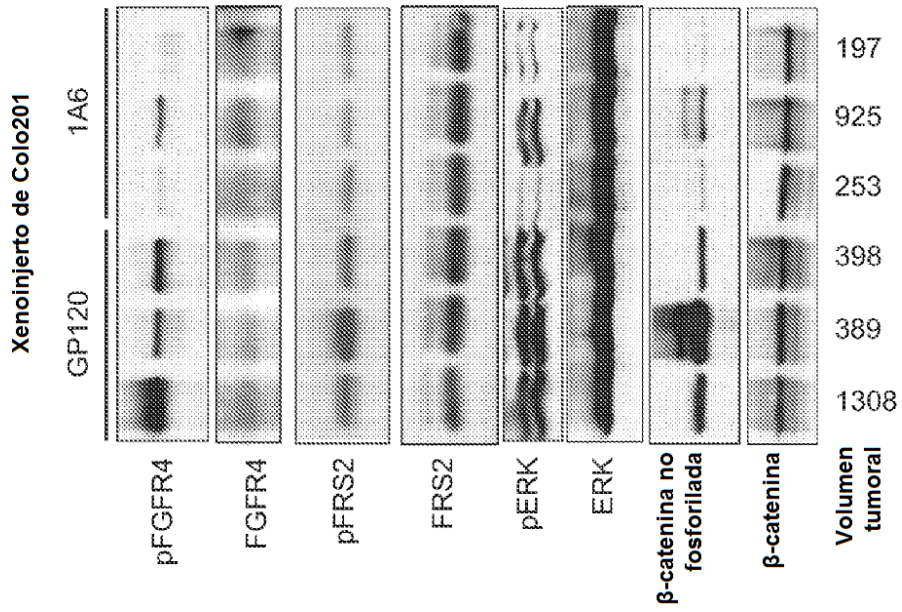
**FIG. 6E**



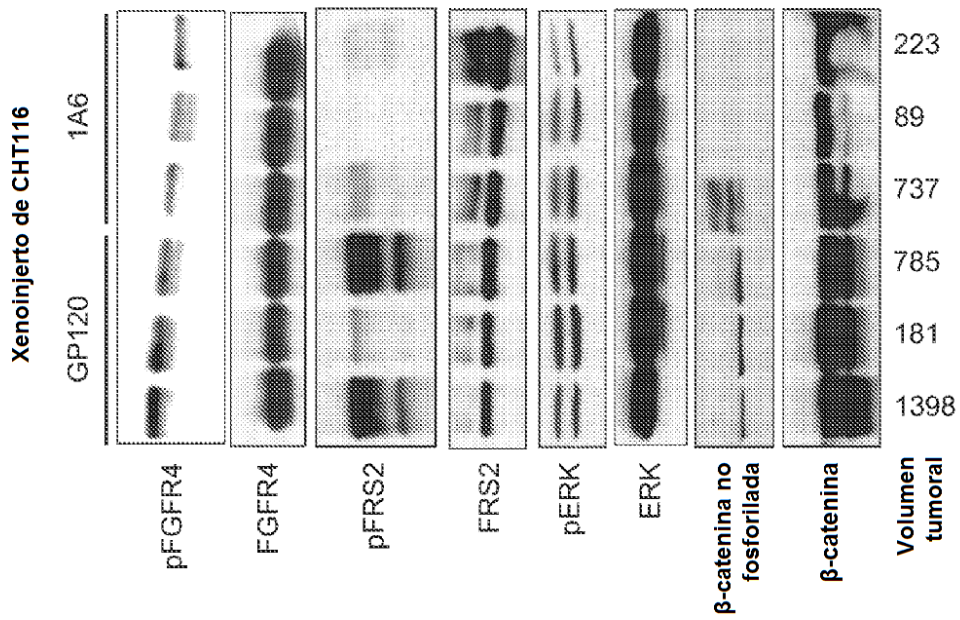
**FIG. 7A**



**FIG. 7C**



**FIG. 7D**



**FIG. 7B**

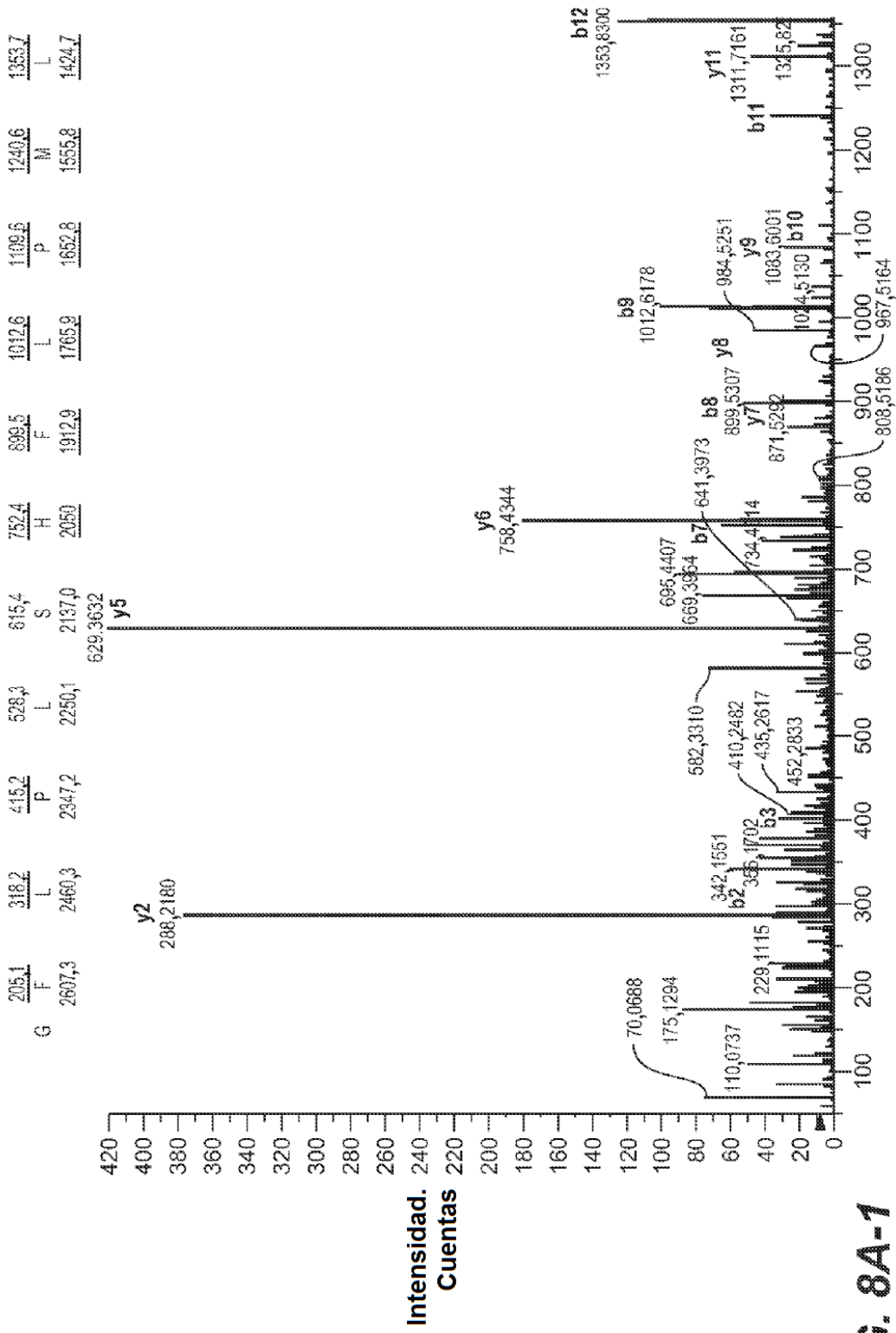


FIG. 8A-1

FIG. 8A-1 FIG. 8A-2

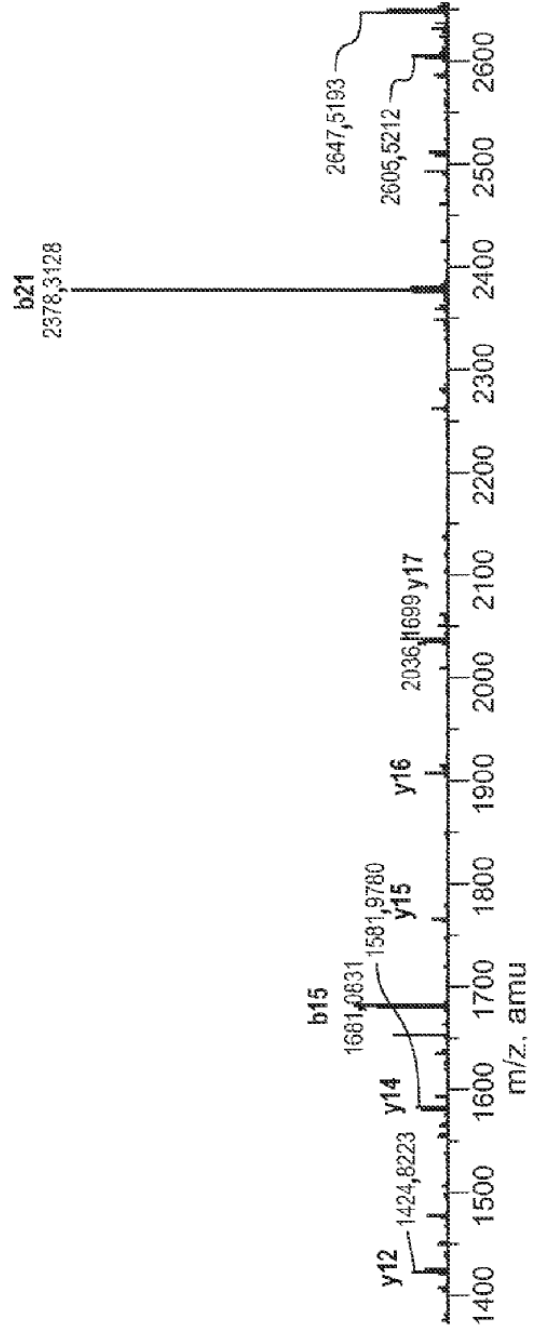
## FIG. 8A

1450,8	1581,8	1680,9	1777,9	1907	2036	2133,1	2262,1	2377,2	2490
P	M	V	P	E	E	P	E	D	L
1311,6	1214,6	1083,5	984,5	887,4	758,4	629,3	532,3	403,2	283,2
									R
									175,1

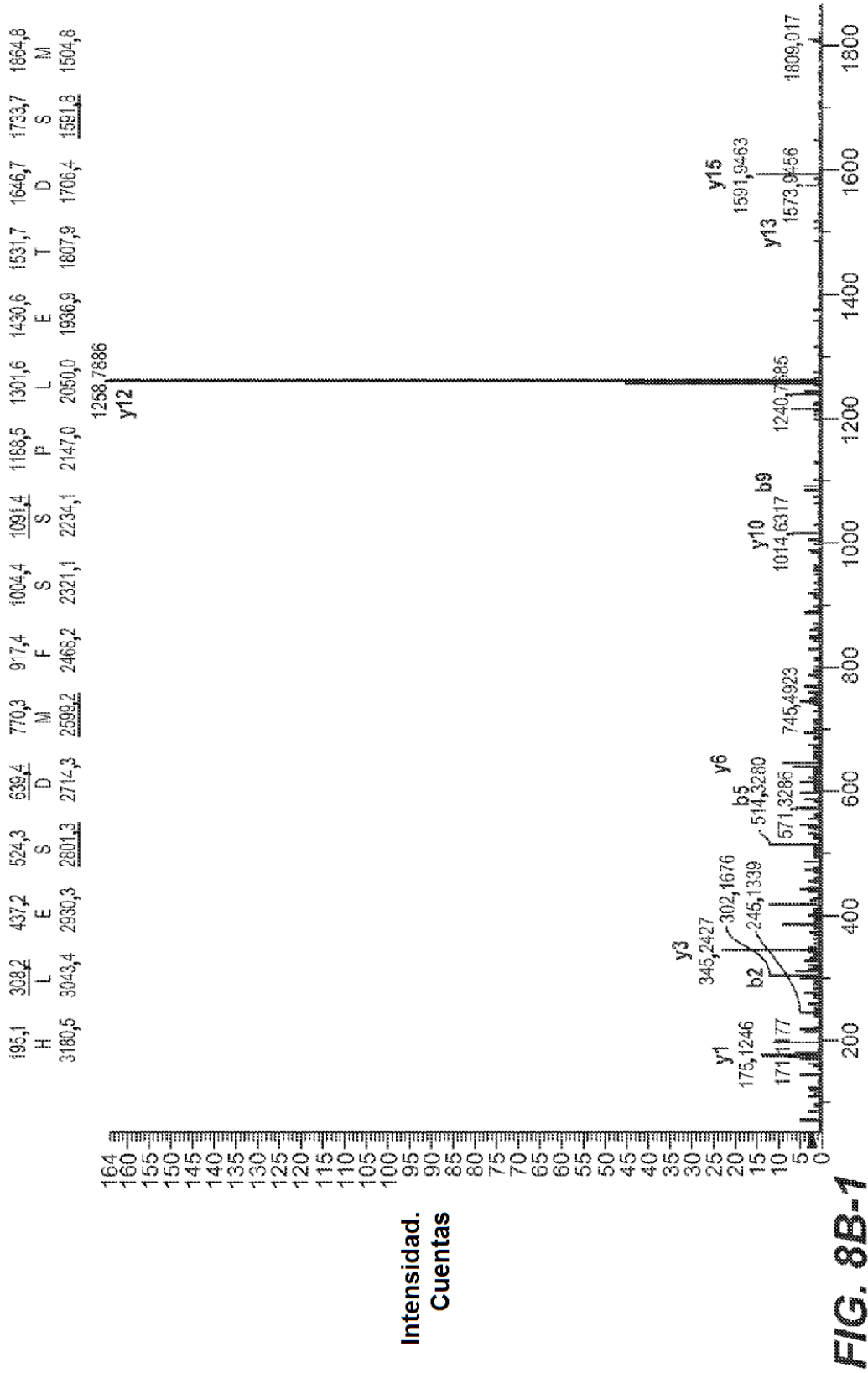
■ + Producto de TOF (2665.0): 157 escáneres MCA de la muestra 1 (FGF19 IP 1A6) de FGF 090105.wiff  
 a=-3,5605140000000000e-004, l0=4,55715705522000010e+001

Máx. 2457,0 cuentas

CID de 2665 m/z



## FIG. 8A-2



**FIG. 8B-1**

FIG. 8B-1 FIG. 8B-2

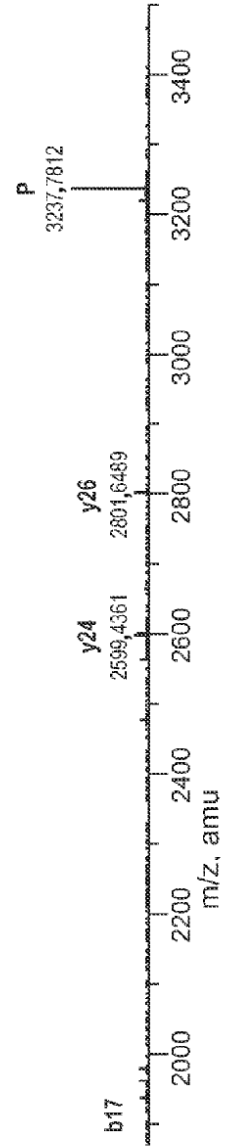
**FIG. 8B**

1979,8 2076,9 2223,9 2280,9 2394,0 2493,1 2594,1 2651,2 2764,3 2893,3 2964,3 3063,4  
 D P P F G L V I G L E A V R  
 1373,7 1255,7 1161,7 1014,6 957,6 844,5 745,4 644,4 587,4 474,3 345,2 274,2 175,1

■ + Producto de TOF (3237.7): 212 escáneres MCA de la muestra 2 (FGF19 IP 1A1) de FGF\_090105.wiff  
 a=-3,5605140000000000e-004, i0=-4,55715705522000010e+001

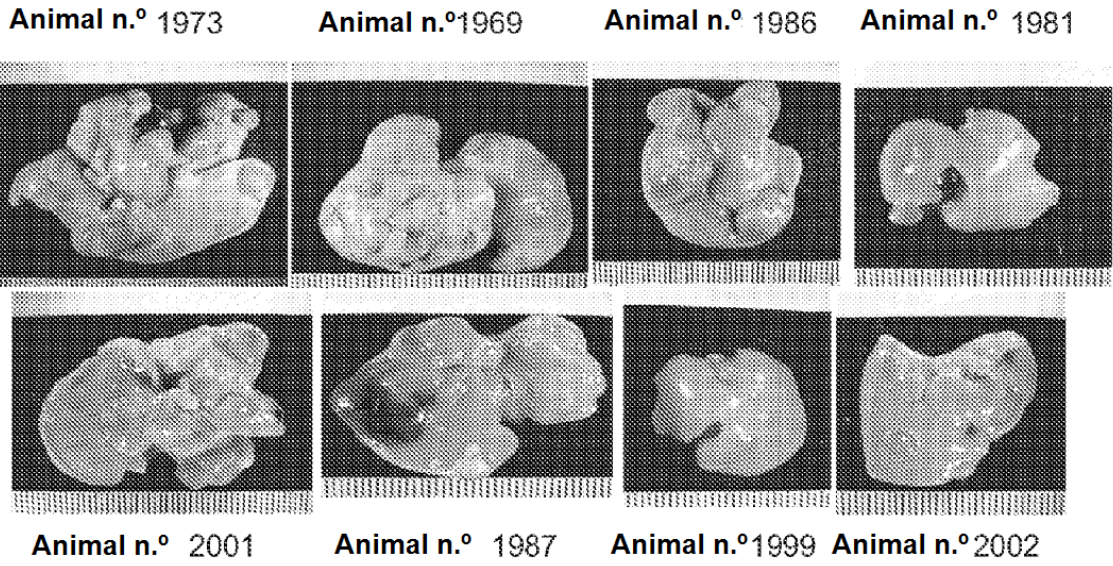
Máx. 1640 cuentas

CID de 3238 m/z

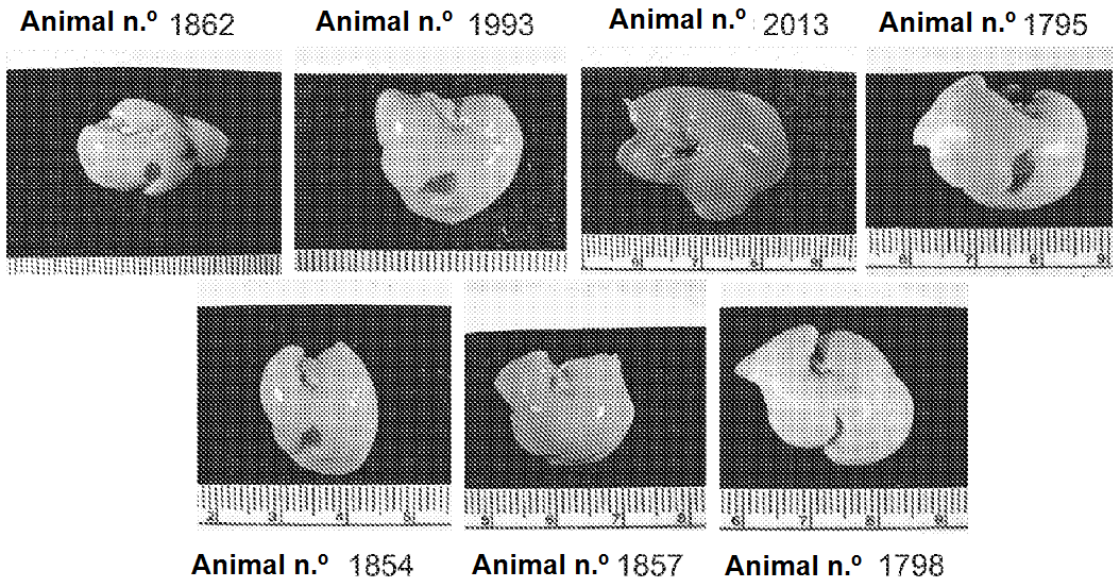


**FIG. 8B-2**

Tratados con Ab de control



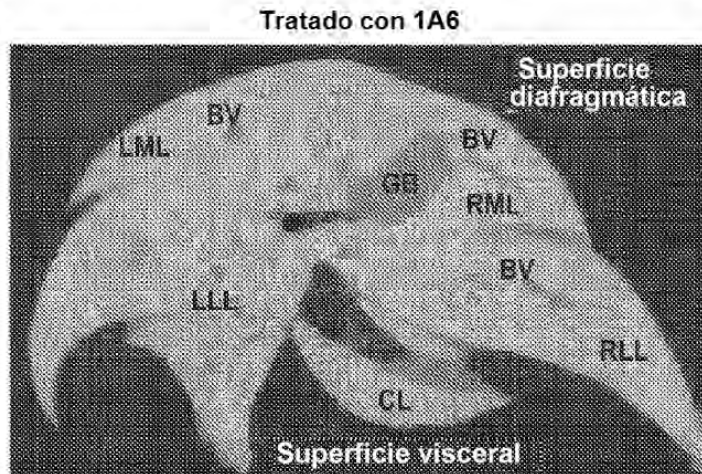
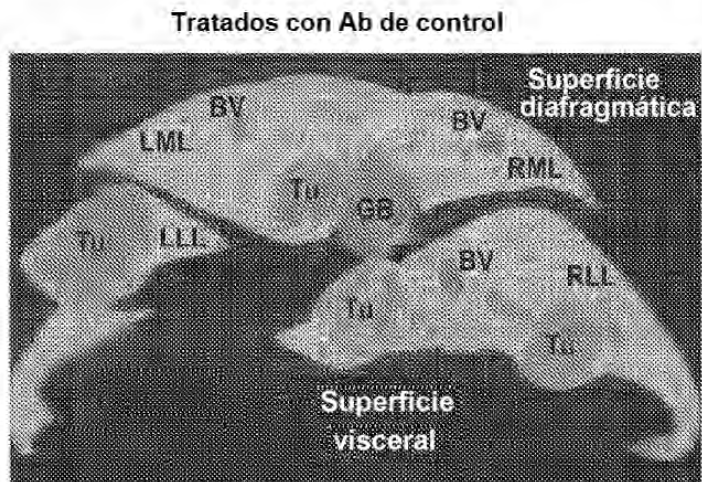
Tratados con 1A6



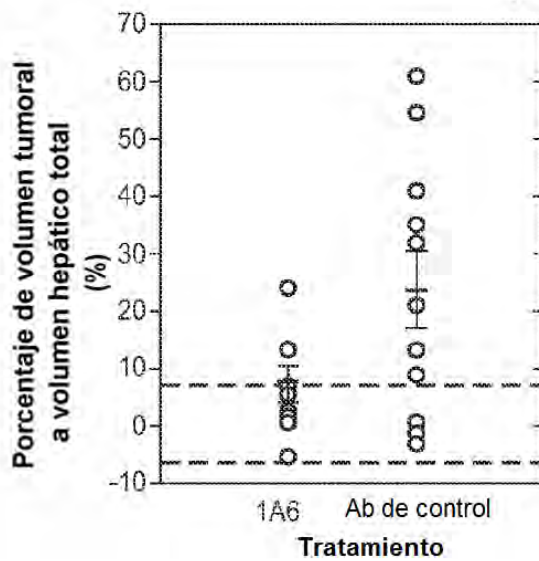
**FIG. 9A**

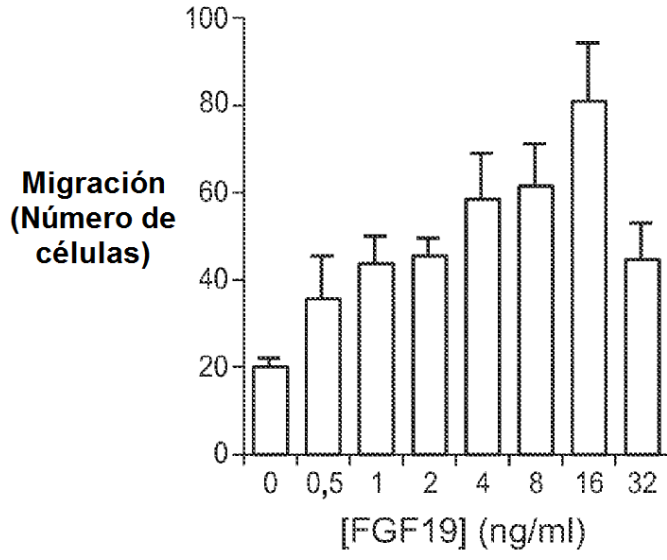


**FIG. 9B**

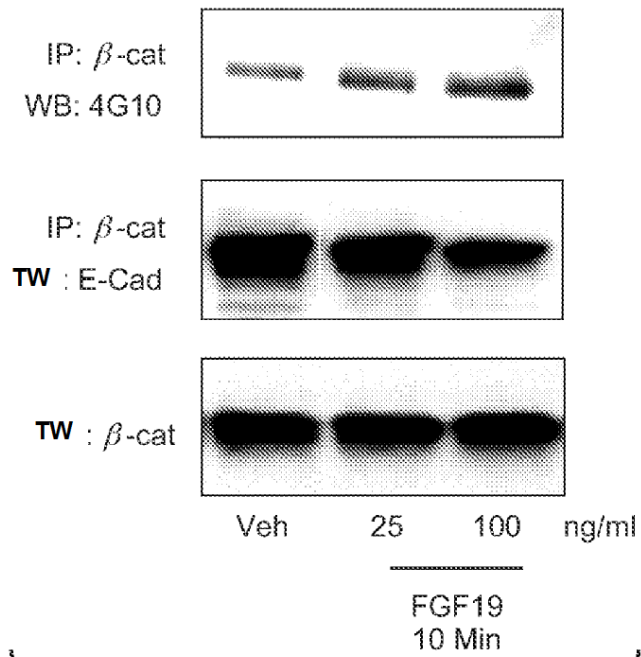


Volumen tumoral total a volumen hepático total

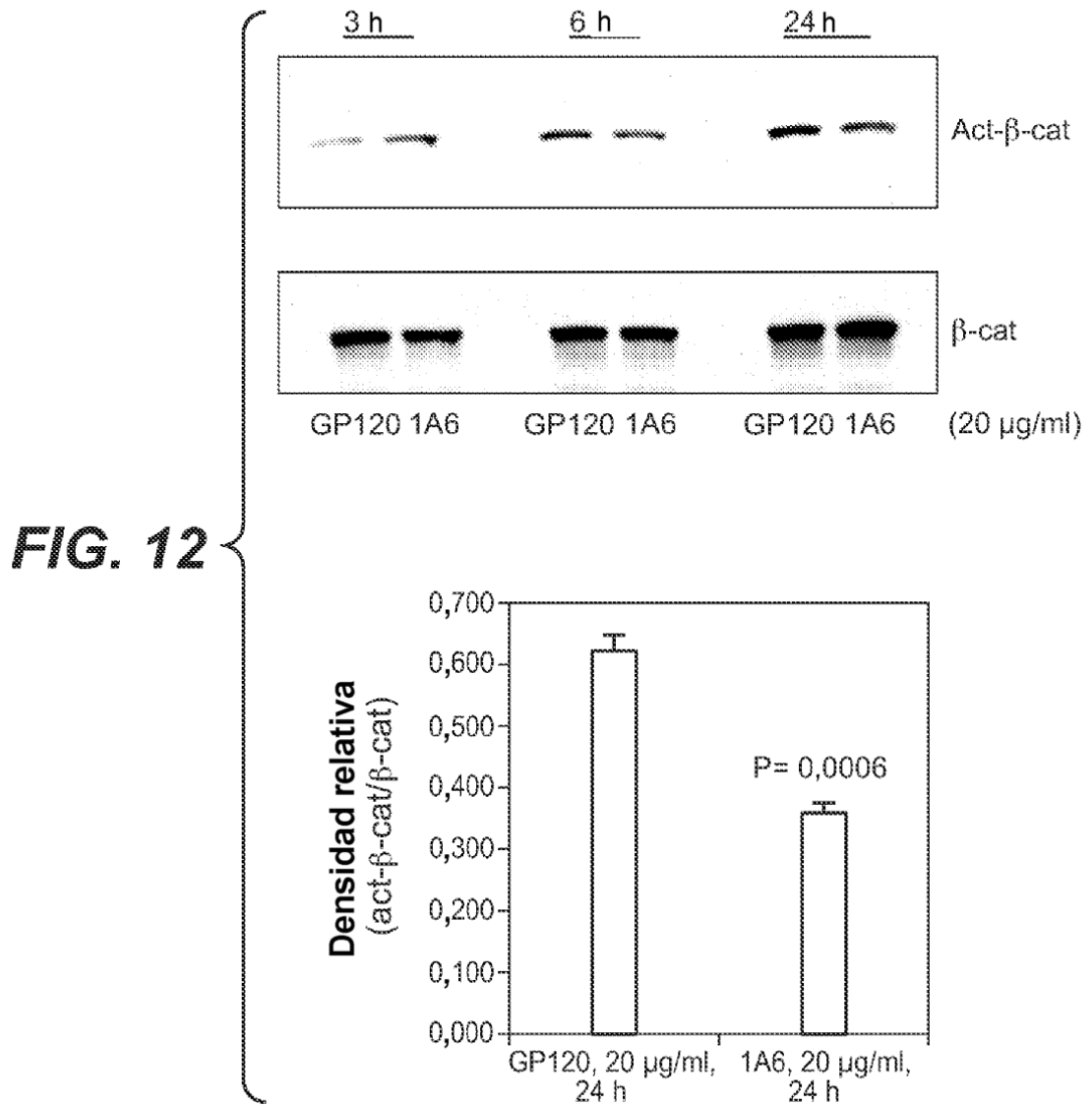


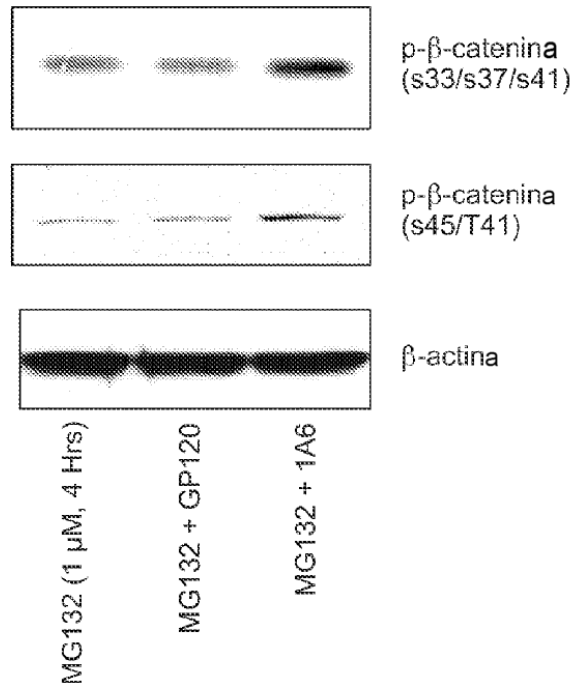


**FIG. 10**

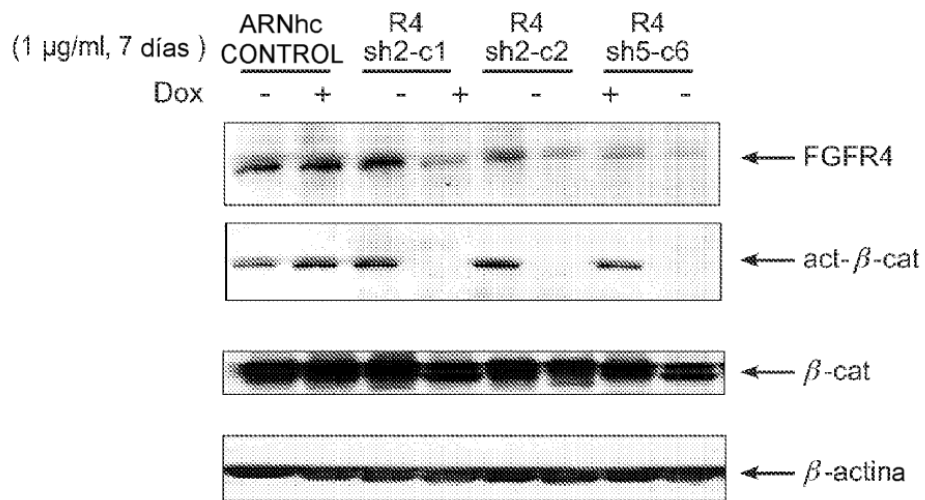


**FIG. 11**



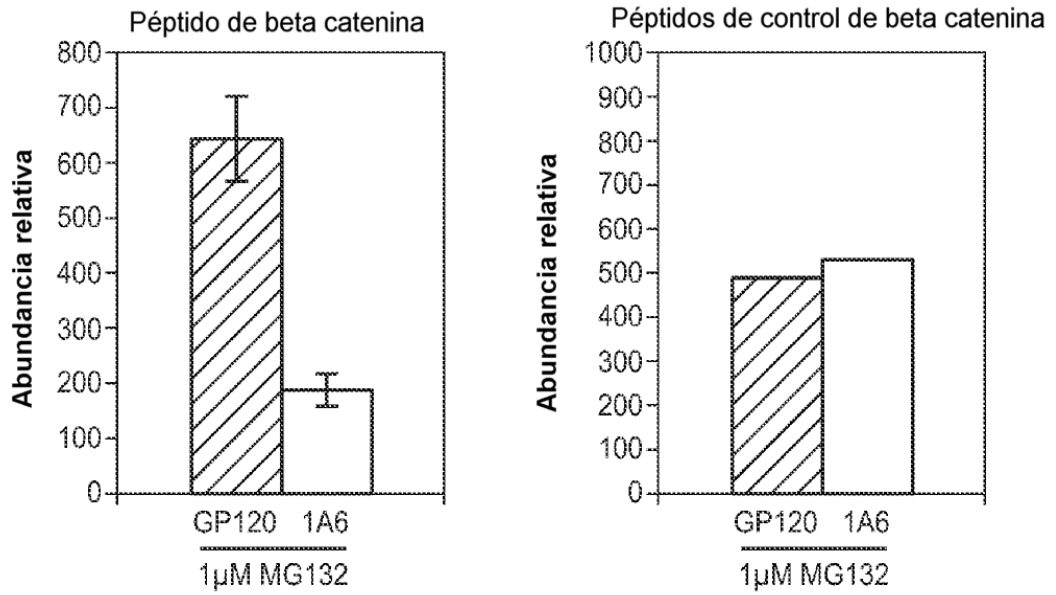
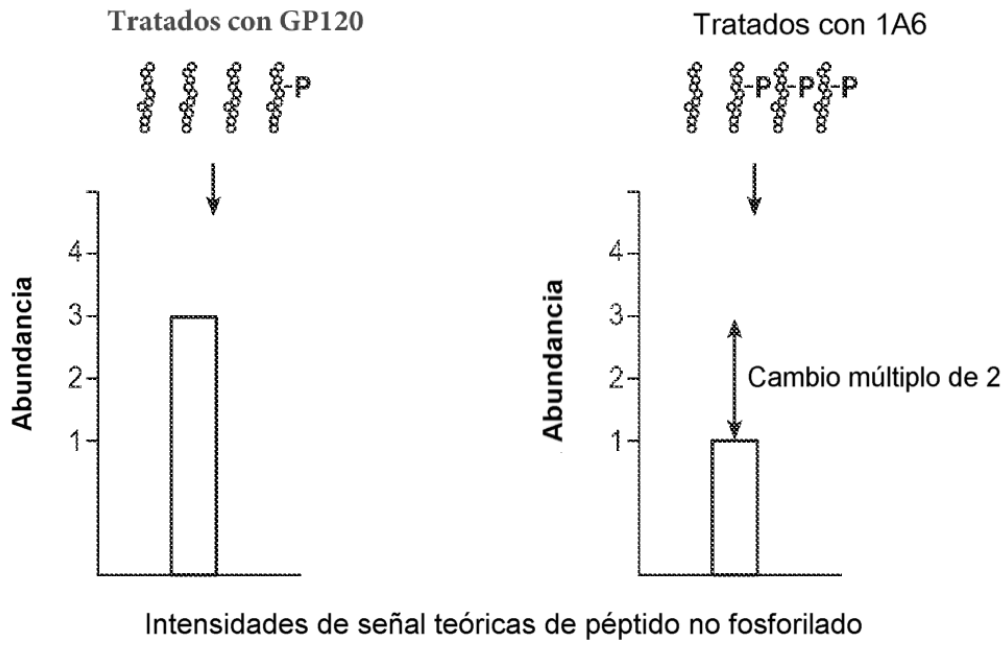


**FIG. 13**



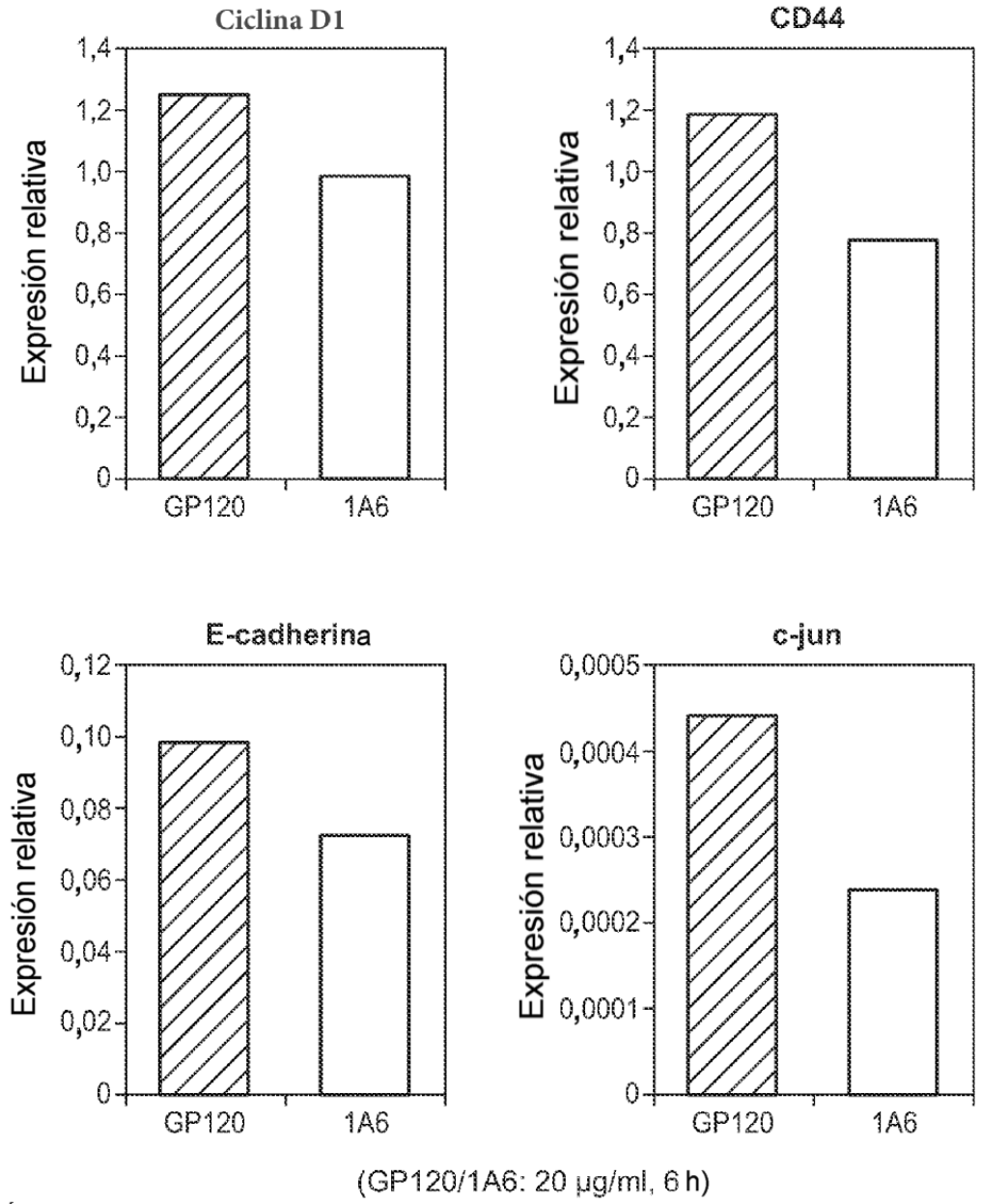
ARNhc de FGFR4, HUSH-EGFP (CTRL): Estables (5 μg/ml de puromicina)

**FIG. 14**



\* Sin cambios en las intensidades de señal en péptidos de catenina no modificados

**FIG. 15**



**FIG. 16**