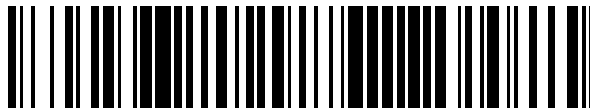


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 107**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2008 PCT/US2008/071955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09035786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 08831170 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2188310**

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

30 Prioridad:

**03.08.2007 US 953908 P**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)  
1 DNA WAY  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**DENNIS, MARK;  
DESNOYERS, LUC y  
FRENCH, DOROTHY**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 622 107 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

Antagonistas anti-FGF19 humanizados y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a antagonistas de las rutas FGF19/FGFR4, y a los usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) está compuesta de 22 polipéptidos estructuralmente relacionados que se unen con 4 tirosina quinasa receptoras (FGFR1-4) y un receptor deficiente en quinasa (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 homodimerización y autofosforilación de los receptores, reclutamiento de adaptadores citosólicos tales como FRS2 e inicio de múltiples rutas de señalización (Powers *et al* (2000) *Endocr Relat Cancer* 7, 165-197; Schlessinger, J. (2004) *Science* 306, 1506-1507).

20 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; Auguste *et al* (2003) *Cell Tissue Res* 314, 157-166; Steiling *et al* (2003) *Curr Opin Biotechnol* 14, 533-537). Varios FGF y FGFR están asociados a la patogénesis de cánceres de mama, de próstata, de cuello uterino, de estómago y de 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).

30 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 normalmente se secreta por el epitelio biliar e intestinal. FGF19 desempeña un papel en la homeostasis de colesterol reprimiendo la expresión hepática de colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa 1 (Cyp7 $\alpha$ 1), la enzima limitante de la velocidad para síntesis de colesterol y ácido biliar (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 de carcinoma hepatocelular inducido por FGF19 implica interacción de FGFR4. El tratamiento con FGF-19 aumenta la tasa metabólica e invierte la diabetes dietética y deficiente en leptina. Fu *et al* (2004) *Endocrinology* 145: 2594-2603. FGF19 también se describe, por ejemplo, en Xie *et al*. (1999) *Cytokine* 11: 729-735; Harmer *et al* (2004) *Biochemistry* 43: 629-640; Desnoyer, LR *et al*, *Oncogene* (2007): 1-13; y Lin, BC *et al*. (2007) *J Biol Chem* 282(37): 27277-84; Pai, R *et al*. *Cancer Res* (2008) 68(13): 5086-95. El documento de Desnoyers L *et al* (2007), *Oncogene*, vol.27, pp.85- 97 describe que la dirección de FGF19 inhibe el crecimiento tumoral en xenoinjerto de cáncer de colon y modelos de carcinoma hepatocelular transgénicos para FGF19. La expresión de FGFR4 está ampliamente distribuida y se ha indicado en músculos esqueléticos en desarrollo, hígado, pulmón, páncreas, glándula 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 indicado amplificación de FGFR4 en adenocarcinomas mamarios y ováricos (Jaakkola *et al* (1993) *Int J Cancer* 54, 378-382). La mutación y el truncamiento de FGFR4 se correlacionaron con el tumor maligno y en algunos casos el pronóstico de adenocarcinomas de próstata y pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejido blando, astrocitoma y adenomas de la hipófisis (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).

55 Resulta evidente que continúa existiendo una necesidad de agentes que tengan atributos clínicos que sean óptimos para el desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en el presente documento cumple esta necesidad y proporciona otros beneficios.

60 **Sumario de la invención**

En su sentido más amplio, la invención es como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención se basa en parte en la identificación de diversos antagonistas de la ruta de FGF19/FGFR4. FGF19 se presenta como una diana terapéutica importante y ventajosa, y la invención proporciona composiciones y métodos basados en la interferencia con la activación de FGF19/FGFR4, incluyendo pero sin limitación interferencia con la unión de FGF19 con el dominio extracelular de FGFR4. Los antagonistas de la invención, como se describe en el

presente documento, proporcionan agentes terapéuticos y de diagnóstico importantes para su uso en la dirección a afecciones patológicas asociadas a la expresión y/o actividad de la ruta de FGF19-FGFR4. En consecuencia, la invención se refiere a métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la modulación de la ruta de FGF19/FGFR4, incluyendo modulación de la unión de receptor de FGF19, activación y otras actividades biológicas/fisiológicas asociadas a la señalización de FGF19/FGFR4.

Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGF19 humanizado en el que la afinidad monovalente del anticuerpo como FGF19 humano (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab por FGF19 humano) es sustancialmente igual que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab por FGF19 humano) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab por FGF19 humano) que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada como se representa en la Fig. 8 como se define en las reivindicaciones.

Como está bien establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando con su receptor puede determinarse usando cualquiera de diversos ensayos, y puede expresarse con respecto a diversos valores cuantitativos. En consecuencia, la afinidad de unión puede expresarse como valores de Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). En general y preferentemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, bien en una situación sin células o asociada a células. Como se describe en más detalle en el presente documento, el factor de diferencia en la afinidad de unión puede cuantificarse con respecto a la relación del valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, en forma de Fab) y el valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo de referencia/comparador (por ejemplo, en forma de Fab) (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene secuencias de región hipervariable donadoras), en el que los valores de afinidad de unión se determinan en condiciones de ensayo similares. Por lo tanto, en un ejemplo, el factor de diferencia en la afinidad de unión se determina como la relación de los valores de Kd del anticuerpo humanizado en forma de Fab y dicho anticuerpo de Fab de referencia/comparador. Por ejemplo, si un anticuerpo de la invención (A) tiene una afinidad que es "3 veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), entonces si el valor de Kd para A es 3x, el valor de Kd de M sería 1x y la relación de Kd de A con respecto a Kd de M sería 3:1. Por el contrario, en un ejemplo, si un anticuerpo de la invención (C) tiene una afinidad que es "3 veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces si el valor Kd para C es 1x, el valor Kd de R sería 3x, y la relación de Kd de C con respecto a Kd de R sería 1:3. Puede usarse cualquiera de varios ensayos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento, para obtener mediciones de afinidad de unión, incluyendo por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA.

En una realización, HVR-L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2. HVR-L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. HVR-H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4. HVR-H2 comprende GVIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 7). HVR-H3 comprende VRKLEYANLYAMDY (SEQ ID NO: 8). HVR-L1 comprende KASQDINSFLA (SEQ ID NO: 11). En una realización, HVR-L2 comprende RANRLVS (SEQ ID NO: 13). En una realización, HVR-L2 comprende RANRLVE (SEQ ID NO: 14). Un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (en combinación como se describe en el presente documento) está humanizado. Estos anticuerpos son distintos de (es decir no son) un anticuerpo descrito en el documento US2007248604.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende seis HVR, en el que cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia en la que SEQ ID NO: 11 corresponde a un HVR-L1, SEQ ID NO: 2, 13, y 14 corresponden a un HVR-L2, SEQ ID NO: 3 corresponde a un HVR-L3, SEQ ID NO: 4 corresponde a un HVR-H1, SEQ ID NO: 7 corresponde a un HVR-H2 y SEQ ID NO: 8, corresponde a un HVR-H3.

Estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de marco conservado de cadena pesada de subgrupo III humana y secuencia consenso de marco conservado de cadena ligera  $\kappa$ 1 humana.

Un agente terapéutico para su uso en un sujeto hospedador preferentemente induce de poca a ninguna respuesta inmunogénica contra el agente en dicho sujeto. En una realización, la invención proporciona dicho agente. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que induce y/o se espera que induzca una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) a un nivel sustancialmente reducido en comparación con un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera mostradas en la Fig. 8 en un sujeto hospedador. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que induce y/o se espera que induzca una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón mínima o ninguna respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). En un ejemplo, un anticuerpo de la invención induce respuesta de anticuerpo anti-ratón que es igual o menor que un nivel clínicamente aceptable.

Como se conoce en la técnica, y como se describe en más detalle en el presente documento posteriormente, la posición de aminoácido/límite que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica (como se describe posteriormente). Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden verse como posicionales hipervariables híbridas porque puede considerarse que estas posiciones están dentro de una región hipervariable según un conjunto de criterios mientras que se

considera que están fuera de una región hipervariable según un conjunto de criterios diferente. También pueden encontrarse una o más de estas posiciones en regiones hipervariables extendidas (como se define adicionalmente posteriormente). La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas.

5 Un anticuerpo de la divulgación puede comprender cualquier secuencia de marco conservado de cadena ligera consenso humana o humana adecuada, siempre que el anticuerpo muestre las características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). En algunas realizaciones, una o más (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más) modificaciones adicionales están presentes dentro de las secuencias de región no hipervariable humanas y/o de consenso humanas. Un anticuerpo de la invención comprende al menos una parte (o toda) de la secuencia de marco conservado de la cadena ligera  $\kappa$  humana, en particular, secuencia consenso de marco conservado del subgrupo I  $\kappa$  humana. Los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consenso de marco conservado de cadena pesada de subgrupo III humana. En un ejemplo de estos anticuerpos, la secuencia consenso de marco conservado comprende sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunos ejemplos, de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En un ejemplo, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que comprende secuencia de marco conservado representada en la Figura 1 y/o Figura 2, siempre que la posición 49 en la cadena pesada no sea G y/o la posición 93 en la cadena pesada no sea V y/o la posición 94 en la cadena pesada no sea R.

20 Algunas realizaciones de anticuerpos de la divulgación comprenden un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos) (también referido en la Patente de Estados Unidos N.º 6.407.213 y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93) como se representa en SEQ ID NO: 14 a continuación.

25 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu He Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser **Arg** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu He Lys 107 (SEQ ID NO: 14) (los restos de HVR están subrayados)

30 En una realización, la secuencia de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 está modificada en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His como se indica en negrita/cursiva anterior, respectivamente). En una realización, la secuencia de huMAb4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. En consecuencia, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 15 a continuación:

35 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 15) (los restos de HVR están subrayados)

Los restos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 están indicados en negrita/cursiva anteriormente.

45 En un aspecto, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-FGF19 humanizado que inhibe la unión de FGF19 humano con FGFR4 sustancialmente igual que un anticuerpo de referencia (tal como un anticuerpo anti-FGF19 quimérico o un anticuerpo anti-FGF19 murino) que comprende una secuencia variable de cadena ligera y cadena pesada como se representa en la Fig. 8. Puede realizarse comparación de las capacidades para inhibir la unión de FGF19 con su receptor según diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo como se describe en los Ejemplos posteriores. En una realización, se determinan los valores de CI50 a través de un intervalo de concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1000 nM.

50 En un aspecto, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-FGF 19 humanizado que inhibe la activación del receptor FGFR4 humano sustancialmente igual que un anticuerpo de referencia (tal como un anticuerpo anti-FGF 19 quimérico o un anticuerpo anti-FGF19 murino) que comprende una secuencia variable de cadena ligera y cadena pesada como se representa en la Fig. 8. La comparación de las capacidades para inhibir la activación del receptor puede realizarse de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo como se describe en los Ejemplos posteriores. En una realización, los valores de CI50 se determinan a lo largo de un intervalo de concentraciones de anticuerpo de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 100 nM.

60 En una realización, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una realización, el anticuerpo quimérico de referencia comprende secuencias de dominio variable representadas en la Fig. 8 ligadas a una región Fc humana. En una realización, la región Fc humana es la de una IgG (por ejemplo, IgG1, 2, 3 o 4).

65 Los anticuerpos de la invención pueden modular uno o más aspectos de efectos asociados a FGF 19 y FGFR4,

- 5 incluyendo pero sin limitación unión a FGF19, activación de FGFR4, señalización molecular corriente abajo de FGFR4, alteración de la unión de FGFR4 con FGF19, multimerización de FGFR4, expresión de un gen de CYP7 $\alpha$ 1, fosforilación de FGFR4, MAPK, FRS2 y/o ERK2, activación de  $\beta$ -catenina, migración celular promovida por FGF18, y/o alteración de cualquier ruta biológica de FGF19 y/o FGFR4 biológicamente relevante y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de FGF19 (tal como expresión y/o actividad de FGF19 aumentada).
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención se une específicamente con FGF19. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente con FGF19 con una Kd de aproximadamente 120 pM o más fuerte. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente con FGF19 con una Kd de aproximadamente 140 pM o más fuerte. En algunas realizaciones, el anticuerpo bloquea la unión de FGF19 con FGFR4, con una CI50 de aproximadamente 4 nM.
- 15 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une con una región de unión a FGFR4 de FGF19.
- 20 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado anti-FGF19 que inhibe, reduce y/o bloquea la represión inducida por FGF19 de la expresión de un gen de CYP7 $\alpha$ 1 en una célula expuesta a FGF19.
- 25 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGF19 aislado que 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 HCT116.
- 30 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGF19 aislado 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 con  $\beta$ -catenina. Se conoce en la técnica la detección de la activación de la ruta de Wnt, y se describen y ejemplifican en el presunto documento algunos ejemplos.
- 35 En una realización, un anticuerpo de la divulgación se une específicamente con FGF19 de una primera especie animal y no se une específicamente con FGF9 de una segunda especie animal. En una realización, la primera especie animal es ser humano y/o primate (por ejemplo, mono cynomolgus), y la segunda especie animal es murina (por ejemplo, ratón) y/o canina. En una realización, la primera especie animal es ser humano. En una realización, la primera especie animal es primate, por ejemplo, mono cynomolgus. En una realización, la segunda especie animal es murina, por ejemplo ratón. En una realización, la segunda especie es canina.
- 40 El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, o scFv.
- 45 En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados por la unión con FGF19 (es decir, bloquea la unión con FGF19 de cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados). En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une con el mismo epítipo en FGF19 que cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados.
- 50 En otras realizaciones, los anticuerpos de la divulgación comprenden además cambios en los restos de aminoácidos en la región de Fc que conducen a función efectora mejorada incluyendo función CDC y/o ADCC potenciada y destrucción de linfocitos B. Otros anticuerpos de la divulgación incluyen los que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden cambios en restos de aminoácidos en la región Fc que conducen a función efectora reducida, por ejemplo función CDC y/o ADCC reducida y/o destrucción de linfocitos B reducida. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación se caracterizan por unión reducida (tal como ausencia de unión) con factor de complemento humano C1q y/o receptor de Fe humano en linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación se caracterizan por unión reducida (tal como la ausencia de unión) con Fc $\gamma$ RI, FcRI, FcRIIA y/o Fc $\gamma$ RIIA humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación son de la clase IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y comprenden al menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, 60 A330, P331 y/o P329 (numeración de acuerdo con el índice de EU). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden la mutación L234A/L235A o D265A/N297A.
- 65 En un aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos anti-FGF19 que comprenden cualquiera de las secuencias de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento, en los que los polipéptidos anti-FGF19 se unen específicamente con FGF19.

En un aspecto, la divulgación proporciona un inmunoconjugado (denominado indistintamente “conjugado farmacológico de anticuerpo” o “ADC”) que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 desvelados en el presente documento conjugado con un agente, tal como un fármaco.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

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 tratamiento del  
 10 cáncer, por ejemplo, puede ser otro anticuerpo, agente quimioterapéutico, agente citotóxico, agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, corticosteroide, vacuna de cáncer anti-emética, analgésico, agente anti-vascular o agente inhibidor del crecimiento. En otra realización, se administra un segundo medicamento a un sujeto en una cantidad eficaz, en el que el anticuerpo es un primer medicamento. Este segundo medicamento es más de un medicamento, y es  
 15 preferentemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico, agente citotóxico, agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, corticosteroide, anti-emético, vacuna de cáncer, analgésico, agente anti-vascular o agente inhibidor del crecimiento. Los agentes más específicos incluyen, por ejemplo, irinotecán (CAMPTOSAR®), cetuximab (ERBITUX®), fulvestrant (FASLODEX®), vinorelbina (NAVELBINE®), antagonistas de receptor de EFG tales como erlotinib (TARCEVA®) antagonistas de VEGF tales como bevacizumab (AVASTIN®), vincristina (ONCOVIN®), inhibidores de mTor (una proteína serina/treonina quinasa) tal 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-estrógeno tal como  
 25 tamoxifeno, fulvestrant o un inhibidor de aromatasas, un antagonista del valor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de 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.

30 En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-idiotípico que se une específicamente con un anticuerpo anti-FGF19 de la invención.

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

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

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

40 En un aspecto, la invención 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 hospedadoras. En una realización, una célula hospedadora es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En una realización, una célula hospedadora es una célula eucariota, por ejemplo una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

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

En un aspecto, la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, 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  
 55 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 comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, para el anticuerpo) a un individuo (tal como instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento).

60 En un aspecto, la divulgación proporciona un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-FGF19 de la invención; y un segundo recipiente 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  
 65 composición (por ejemplo, para el anticuerpo) a un individuo.

5 En un aspecto, la invención proporciona 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, tumor y/o 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 de hígado, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno debilitante.

10 En un aspecto, la divulgación proporciona 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 de hígado, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno debilitante.

15 En un aspecto, la divulgación proporciona 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 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 de hígado, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno debilitante.

20 En un aspecto, la divulgación proporciona 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 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 de hígado, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno debilitante.

25 En un aspecto, la divulgación proporciona 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 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 de hígado, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno debilitante.

30 En un aspecto, la divulgación proporciona 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 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 de hígado, tal como cirrosis. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno debilitante.

35 La invención proporciona composiciones útiles para modular una enfermedad asociada a la desregulación del eje de señalización de FGF19/FGFR4 (tal como modulación de patologías asociadas a la expresión y/o actividad de FGF19 y/o FGFR4), comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.

40 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para destruir 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.

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

50 Pueden usarse métodos para afectar a cualquier estado patológico adecuado. Se describen en el presente documento trastornos a modo de ejemplo, e incluyen un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer pancreático, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejido blando, astrocitoma, cáncer de la hipófisis, cáncer de mama, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), carcinomas epiteliales, cáncer de cerebro, cáncer endometrial, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de la vesícula biliar y carcinoma hepatocelular.

55 En una realización, una célula que es diana en un método es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de 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 ovárico, una célula de cáncer del cuello uterino, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer esofágico, una célula de cáncer de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de cáncer 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 leucemia, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer endometrial, una célula de cáncer de testículo, una célula de colangiocarcinoma, una célula de carcinoma de la vesícula biliar, una célula de cáncer de pulmón y/o una célula de cáncer de próstata. En una realización, una célula diana en un método es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula diana en un método es una célula displásica. En una realización más, una célula diana en un método es una célula metastática.

En una realización de la invención, la célula diana es una célula de hígado cirrótico.

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

### Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: representa alineamiento de secuencias de la cadena ligera variable para lo siguiente: secuencia consenso κI humana de cadena ligera (SEQ ID NO: 261), anticuerpo 1A6 murino (SEQ ID NO: 17) y el anticuerpo con injerto 1A6 (SEQ ID NO: 262). Las posiciones se enumeran de acuerdo con Kabat.

FIGURA 2: representa alineamiento de secuencias de la cadena ligera variable para lo siguiente: secuencia consenso del subgrupo III pesado variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 263), anticuerpo 1A6 murino (SEQ ID NO: 16) y el anticuerpo con injerto 1A6 (SEQ ID NO: 264). Las posiciones se enumeran de acuerdo con Kabat.

FIGURAS 3A-D: representa diversas secuencias de HVR de anticuerpos madurados por afinidad seleccionados de bibliotecas con HVR seleccionados aleatoriamente de forma individual HVR-L1: SEQ ID NO: 18 y 52-86; HVR-L2 SEQ ID NO: 87-127; HVR-L3: SEQ ID NO: 128-155; HVR-H1: SEQ ID NO: 156-176; HVR-H2: SEQ ID NO: 177-229; y HVR=H3: SEQ ID NO: 230-260.

FIGURAS 4A, B y 5: representan secuencias de marco conservado consenso humanas aceptoras a modo de ejemplo para su uso en la práctica de la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

#### Marcos conservados consenso pesados variables (VH) (FIG. 4A, B)

- marco conservado consenso del subgrupo I VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 19)
- marco conservado consenso del subgrupo I VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 20-22)
- marco conservado consenso del subgrupo II VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 23)
- marco conservado consenso del subgrupo II VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 24-26)
- marco conservado consenso del subgrupo III de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 27)
- marco conservado consenso del subgrupo III de VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 28-30)
- marco conservado aceptor VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 31)
- marco conservado aceptor VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 32-33)
- marco conservado 2 aceptor VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 34)
- marco conservado 2 aceptor VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 35-37)

#### Marcos conservados consenso ligeros variables (VH) (FIG. 5)

- marco conservado consenso del subgrupo I kappa VL humano (SEQ ID NO: 38)
- marco conservado consenso del subgrupo II kappa VL humano (SEQ ID NO: 39)
- marco conservado consenso del subgrupo III kappa VL humano (SEQ ID NO: 40)
- marco conservado consenso del subgrupo IV kappa VL humano (SEQ ID NO: 41)

FIGURA 6: representa secuencias de región marco de cadenas ligeras y pesadas de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

FIGURA 7: representa secuencias de región marco variantes/modificadas de cadenas ligeras y pesadas de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

FIGURA 8: representa secuencias de dominio variable de cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) donadoras (anticuerpo murino 1A6).

FIGURA 9: el anticuerpo anti-FGF18 humano 1A6.v1 ("h1A6") y el anticuerpo anti-FGF19 quimérico 1A6 ("ch1A6") demostraron actividad de bloqueo similar. En un ensayo de unión a receptor de fase sólida, hu1A6 y ch1A6 bloquearon la interacción de FGF19 con FGFR4 con la misma eficacia (CI50 = 4,5 nM).

FIGURA 10: análisis de transferencia de Western de la expresión de FGF19 en hígado humano y de cynomolgus. (A) Anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1 ("hu1A6") unido a FGF19 humano y de cynomolgus. (B) Anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1 reconoció proteínas huFGF19 recombinante, cynoFGF19



recombinante y cynoFGF19 aisladas del hígado.

FIGURA 11: tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1 inhibió la fosforilación de FGFR4, FRS2 y ERK *in vitro*. La fosforilación de FGFR4, FRS2 y ERK se inhibió en células de tumor de colon HCT116 tratadas con anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1.

FIGURA 12: el tratamiento con anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1 inhibió el crecimiento de la línea celular de tumor de colon *in vivo*. (A) El crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon HCT116 se inhibió significativamente por el tratamiento con 30 mg/kg de 1A6.v1 en comparación con el anticuerpo de control ( $p = 0,042$ ). Se observó una inhibición de 44 % de crecimiento tumoral cuando los animales se trataron con 30 mg/kg de 1A6.v1. (B) Se inhibió la fosforilación de FGFR4, FRS2 y ERK en tumores de xenoinjertos HCT116 tratados con anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1.

### Descripción detallada de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención se refiere a métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para identificar y/o usar inhibidores de la ruta de señalización de FGF19/FGFR4.

Se proporciona en el presente documento detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación.

### Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento se entienden bien en general y se emplean habitualmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tal 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 de un componente de su ambiente natural. Son componentes contaminantes de su ambiente natural materiales que interferirían con los usos de diagnóstico y terapéuticos para el 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 del anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencias de aminoácidos internas o N terminales mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por 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 ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se preparará anticuerpo aislado por 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 se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada no está en una forma o situación en la que se encuentra la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

La expresión "anticuerpo anti-FGF19" o "un anticuerpo que se une con FGF19" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con FGF19 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a FGF19. Preferentemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-FGF19 con una proteína no FGF19, no relacionada, es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo con FGF19 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une con FGF19 tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$  o  $\leq 0,1 \text{ nM}$ . En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-FGF19 se une con un epítipo de FGF19 que está conservado entre FGF19 de diferentes especies.

La "afinidad de unión" se refiere en general 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 no ser que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo,

anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse en general por la constante de disociación ( $K_d$ ). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen con el antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen con el 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 fines de la presente invención. Se describen a continuación realizaciones ilustrativas específicas.

En una realización, la "Kd" o el "valor Kd" de acuerdo con la presente invención se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIS) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab por antígeno mediante equilibrado de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ( $^{125}I$ ) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881). Para establecer condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante una noche con 5  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino 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 mezcla [ $^{125}I$ ]-antígeno 100 pM o 26 pM 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 incuba después durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar 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). Después la solución se retira de la placa lavada ocho veces con Tween-20 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150  $\mu\text{l}$ /pocillo de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard), y las placas se recuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual a 20 % de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización la Kd o el valor Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 con antígeno inmovilizado 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 proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, en 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 conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno se inyecta etanolamina 1 M para bloquear grupos que no han reaccionado. Para mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se calculan las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (Software BIAcore Evaluation versión 3.2) mediante ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la relación  $k_{off}/k_{on}$ . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad de asociación supera  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de interrupción de fluorescencia que mide el aumento o la reducción de 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 crecientes del antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " $k_{on}$ " de acuerdo con la presente invención también puede determinarse con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetiladas (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, en 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 conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se calculan las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (Software BIAcore Evaluation versión 3.2) por ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la relación  $k_{off}/k_{on}$ . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la velocidad de asociación supera  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se determina preferentemente usando una técnica de interrupción de fluorescencia que mide el aumento o la reducción de 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 crecientes del

antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

5 Se entiende que el término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido” que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular 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. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que se unen operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores recombinantes”). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

20 “Polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usa indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de nucleótidos puede proporcionarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como por conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “recubrimientos terminales”, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, los que tienen enlaces de cargas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colorantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semi-sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de recubrimiento terminal orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosa o lixosa, azúcares de piranosas, azúcares de furanosas, sedoheptulosas, análogos acídicos y análogos de nucleósidos básicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse 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 R o R' es de forma independiente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos indicados en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

55 “Oligonucleótido”, como se usa en el presente documento, se refiere en general a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que son, generalmente, pero no necesariamente, de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a oligonucleótidos.

60 El término “FGF19” (denominado indistintamente “factor de crecimiento de fibroblastos 19”), como se usa en el presente documento, se refiere, a no ser que se indique específica o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido de FGF19 nativo o variante (bien nativo o bien sintético). La expresión “secuencia nativa” abarca específicamente formas secretadas o truncadas de origen natural (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 de silvestre” se refiere en general 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 en general a una secuencia de aminoácidos hallada en un FGF19 de origen natural.

El término "FGFR4" (denominado indistintamente "receptor del factor de crecimiento de Fibroblastos 4"), como se usa en el presente documento, se refiere, a no ser que se indique específicamente o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido de FGFR4 nativo o variante (bien nativo o bien sintético). La expresión "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural (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" generalmente se refiere 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 en general a una secuencia de aminoácidos hallada en un FGFR4 de origen natural.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, para 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 ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe en más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de forma uniforme a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (HVR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan marco conservado (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en su mayor parte una configuración de lámina  $\beta$ , conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de 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 con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único 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')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno y aún es capaz de reticularse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y 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 no covalente, estrecha. En una especie de Fv monocatenaria, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab mediante la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación del 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')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como partes de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen 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. Las estructuras subunitarias y configuraciones

tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte conserva preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarios; 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 conserva la capacidad de unirse con antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión con FcRn, modulación de semivida del anticuerpo, función 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 una rama de unión al antígeno ligada a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se usan en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único para conferir especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en solamente una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

Se usan varias delineaciones de HVR y están abarcadas en el presente documento. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelos de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender “HVR extendidas” de la siguiente manera: 4-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

Los restos de “marco conservado” o “FR” son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en el presente documento.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que restos de una HVR del receptor se reemplazan por restos de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos

una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, 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). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994); y Patentes de Estados Unidos N.º 6.982.321 y 7.087.409.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une con una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos, o clones de ADN recombinante. Debería entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción de anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-97 (1975); Hongo *et al.*, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes de o todos los loci o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7:33 (1993); Patentes de Estados Unidos N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase u subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando macacos con el antígeno de interés.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado con el que puede unirse selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser polipéptido, carbohidrato, 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 fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH – VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos métodos descritos en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han deshabilitado, por ejemplo, xenomice inmunizados (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562(2006) con respecto a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

La expresión “numeración de restos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de posiciones de aminoácidos como en Kabat”, y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de numeración de Kabat “convencional”.

El sistema de numeración de Kabat se usa en general cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración de EU” o “índice EU” se usa en general cuando se hace referencia a un resto en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU presentado en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente). El “índice EU como en Kabat” se refiere a la numeración de restos del anticuerpo IgG1 humano EU. A no ser que se indique de otro modo en el presente documento, las referencias a números de restos en el dominio variable de anticuerpos significan numeración de restos por el sistema de numeración de Kabat. A no ser que se indique de otro modo en el presente documento, las referencias a números de restos en dominio constante de anticuerpos significa la numeración de restos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 60/640.323, Figuras para numeración de EU).

Un anticuerpo “de afinidad madurada” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR 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 esa alteración o esas alteraciones. En una realización, un anticuerpo con afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Pueden producirse anticuerpos de afinidad madurada usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.* Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describe maduración de afinidad por redistribución de dominios VH y VL. Se describe la mutagénesis aleatoria de HVR y/o restos de marco conservado, por ejemplo, en 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).

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas sustancialmente o completamente inhiben la actividad biológica del antígeno.

Un “anticuerpo agonista” como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita parcial o completamente al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

La expresión “sustancialmente similar” o “sustancialmente igual”, como se usa en el presente documento, indica un

grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente 50 %, menor de aproximadamente 40 %, menor de aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 20 % y/o menor de aproximadamente 10 % en función del valor de referencia/comparador.

La expresión “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a una molécula y el otro asociado a una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto habitual en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10 %, mayor de aproximadamente 20 %, mayor de aproximadamente 30 %, mayor de aproximadamente 40 %, y/o mayor de aproximadamente 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

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

La expresión “región Fc” en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, habitualmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana abarca desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o modificando técnicamente de forma recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Una “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” a modo de ejemplo incluyen unión con C1q; CDC; unión a receptor de Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos según se desvela, por ejemplo, en las definiciones del presente documento.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc IgG4 humana de secuencia nativa así como variantes de origen natural de las mismas.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante del presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de homología con la misma.

“Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une con una región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas cortadas y empalmadas de forma alternativa de esos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un “receptor activador”) y Fc $\gamma$ RIIB (un “receptor inhibidor”), que tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El



receptor inhibidor Fc $\gamma$ R1B contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase, por ejemplo, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Se revisan FcR, por ejemplo, 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 los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" del presente documento.

La expresión "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)) y regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión con FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., *Immunol. Today* 18(12): 592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7): 637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

Puede ensayarse la unión con FcRn humano *in vivo* y semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad con FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o reducida con FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos Fc $\gamma$ R1III y realizan una función o funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citotóxicos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

La "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos NK, neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígenos y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente Fc $\gamma$ R1III, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R2 y Fc $\gamma$ R3. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 5.500.362 o 5.821.337 o Patente de Estados Unidos N.º 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen PBMC y linfocitos NK. Como alternativa, o adicionalmente, puede evaluarse la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

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 del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen con su antígeno afín. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a Cq1 aumentada o reducida, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.194.551 B1 y documento WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

La expresión "anticuerpo que comprende la región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En consecuencia, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo K447 retirado, o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Un "marco conservado humano aceptor" para los fines del presente documento es un marco conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco conservado VL o VH derivado de un marco conservado de inmunoglobulina humana, o de un marco conservado consenso humano. Un marco conservado humano aceptor "derivado de" un marco conservado de inmunoglobulina humana o marco conservado de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos preexistentes. Cuando estén presentes cambios de aminoácidos preexistentes, preferentemente no están presentes más de 5 y preferentemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexistentes. Cuando están presentes cambios de aminoácidos preexistentes en un VH, preferentemente esos cambios son solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el marco conservado humano aceptor VL es idéntico en secuencia a la secuencia de marco conservado de inmunoglobulina humana VL o secuencia de marco conservado consenso humana.

Un "marco conservado consenso humano" es un marco conservado que representa el resto de aminoácido de aparición más habitual en una selección de secuencias de marco conservado VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en *Kabat et al.* En una realización, para el VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en *Kabat et al.* En una realización, para el VH, el subgrupo es subgrupo III como en *Kabat et al.*

Un "marco conservado consenso de subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de *Kabat et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco conservado consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 46)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 47)-H2-RFTISRDN- SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 48)-H3-WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 49).

Un "marco conservado consenso de subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I variable ligero kappa de *Kabat et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco conservado consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO: 42)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 43)-L2-GVPSRF-SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 44)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 45).

Una "muestra biológica" (denominada indistintamente "muestra" o "muestra tisular o celular") abarca diversos tipos de muestra obtenidos de un individuo y pueden usarse en un ensayo de diagnóstico o control. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras tisulares sólidas tales como una muestra de ensayo de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos, y la descendencia de los mismos. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento con respecto a ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o inclusión en una matriz semisólida o sólida para fines de sección. La expresión "muestra biológica" abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras tisulares. La fuente de la muestra biológica puede ser tejido sólido como de una muestra orgánica o tisular, o biopsia o aspirado, nuevo, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente sanguíneo; fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o el 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 están entremezclados de forma natural con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Para los fines del presente documento una "sección" de una muestra tisular se entiende como una única parte o trozo de una muestra tisular, por ejemplo, un corte fino de tejido o células cortadas de una muestra tisular. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras tisulares y someterse a análisis de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, la misma sección de muestra tisular se analiza en los niveles tanto morfológico como molecular, o se analiza con respecto tanto a proteínas como a ácido nucleico.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que está conjugada o fusionada directamente o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que se conjuga o fusiona. El marcador puede en sí mismo ser detectable (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una 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 una "enfermedad" es cualquier afección que se beneficie del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Como ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en el presente documento se incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.

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

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, bien malignas o bien benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Las expresiones "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son

mutuamente excluyentes como se indica en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la hipófisis, cáncer esofágico, astrocitoma, sarcoma de tejido blando, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cerebro, cáncer endometrial, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de la vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratarse por composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen afecciones tanto neoplásicas como no neoplásicas. Las neoplásicas incluyen pero sin limitación las descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen pero sin limitación hipertrofia indeseada 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 relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneana, neovascularización de injerto corneano, rechazo de injerto corneano, neovascularización retiniana/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas, (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas, (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de tejido corneano y otros, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SDRA, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado a ictus agudo/lesión cerebral cerrada/traumatismo), inflamación sinovial, formación de catarata en AR, miositis osificante, formación de hueso hipertrófico, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, 3ª división de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome del compartimento, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto 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 tisular indeseada o aberrante (no canceroso), articulaciones hemófilas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del cabello, síndrome de Osler-Weber, granuloma piógeno, fibroplasias retrolentales, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada a pericarditis) y efusión pleural.

La expresión trastornos "consuntivos" (por ejemplo, síndrome consuntivo, caquexia, sarcopenia) se refiere a un trastorno provocado por pérdida de peso o pérdida de masa celular corporal indeseable y/o poco saludable. En los ancianos así como en pacientes con SIDA y cáncer, la enfermedad consuntiva puede dar como resultado pérdida indeseada de peso corporal, incluyendo los compartimentos tanto grasos y como libres de grasa. Las enfermedades consuntivas pueden ser el resultado de consumo inadecuado de alimentos y/o cambios metabólicos relacionados con la enfermedad y/o el proceso de envejecimiento. Los pacientes con cáncer y pacientes con SIDA, así como pacientes después de cirugía extensiva o que tienen infecciones crónicas, enfermedades inmunológicas, hipertiroidismo, enfermedad de Crohn, enfermedad psicogénica, insuficiencia cardíaca crónica u otro traumatismo grave, padecen con frecuencia enfermedad consuntiva que también se denomina con frecuencia caquexia, un trastorno metabólico y, en ocasiones, alimentario. La caquexia se caracteriza adicionalmente por hipermetabolismo e hipercatabolismo. Aunque la caquexia y la enfermedad consuntiva se usan con frecuencia indistintamente para hacer referencia a afecciones consuntivas, existe al menos un conjunto de investigaciones que diferencia la caquexia del síndrome consuntivo como una pérdida de masa sin grasas y, particularmente, masa celular corporal (Mayer, 1999, J Nutr. 129 (1S Supl.): 256S-259S). La sarcopenia, otro más de dichos trastornos que puede afectar al individuo envejecido, se caracteriza normalmente por pérdida de masa muscular. La enfermedad consuntiva de estadio final como se ha descrito anteriormente puede desarrollarse en individuos que padecen caquexia o sarcopenia.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo o la célula que se trata y puede realizarse bien para profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o reaparición de enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se usan anticuerpos de la invención para retardar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno.

Un "agente antiangiogénesis" o "inhibidor de angiogénesis" se refiere a una sustancia 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 permeabilidad vascular indeseable, bien directa o bien indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico 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 nativos 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, Tabla 3, que enumera la terapia antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, Tabla 2, que enumera factores antiangiogénicos); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 enumera agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

Un "individuo", "sujeto", o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (como vacas), animales deportivos, mascotas (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

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

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para inducir 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 compensa por los efectos beneficiosos terapéuticos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente pero no necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" como 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. Se entiende que la expresión incluye isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca, vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como moléculas pequeñas tóxicas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumorocida provoca la destrucción de células tumorales.

Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o la proliferación de una célula.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilomelamina; 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 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; 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 sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, 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, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega I1 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 33:183-186, 1994)), CDP323, un inhibidor de integrina alfa-4 oral; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como un cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina,

- puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona 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;
- 5 análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulinico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatrexato; desfofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de
- 10 eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2'-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina;
- 15 arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas modificadas técnicamente con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®),
- 25 pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en 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 vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib, Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteasoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición posterior); inhibidores de la tirosina quinasa (véase la definición posterior); inhibidores de serina-treonina quinasa
- 30 tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables 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 para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.
- 40 Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "productos terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, incluyendo, pero sin limitación: antiestrógenos con perfil de agonista/antagonista mixto, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización de receptores de estrógenos (RE), inhibir la unión a ADN, aumentar la renovación de RE y/o suprimir los niveles de RE); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores de aromatasa esteroideos tales como formestano y exemestano
- 50 (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroideos tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol (RIVISOR®) acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y triptrelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido transretinico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores negativos de receptor de estrógenos (ERD); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.
- 60 Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa FGF19) bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa FGF19) en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes
- 65 que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina,

daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen en G1 también se expanden a 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 Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

"Doxorrubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de doxorrubicina 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-naftacenodiona.

La expresión "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (véase definiciones posteriores), que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todo K447 retirado, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

#### Generación de anticuerpos variantes que muestran respuesta HAMA reducida o ausencia de respuesta HAMA.

La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Véase, por ejemplo Khazzaeli *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers *et al.*, *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler *et al.*, *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears *et al.*, *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller *et al.*, *Blood* (1983), 62:988; Hakimi *et al.*, *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann *et al.*, *Nature* (1988), 332:323; Junghans *et al.*, *Cancer Res.* (1990), 50:1495. Como se describe en el presente documento, la invención proporciona anticuerpos que están humanizados de modo que la respuesta HAMA se reduce o elimina. Pueden obtenerse adicionalmente variantes de estos anticuerpos usando métodos rutinarios conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente posteriormente.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo como se describe en el presente documento puede actuar como una secuencia de partida (parental) para diversificación de la secuencia o las secuencias de marco conservado y/o hipervariables. Una secuencia de marco conservado seleccionada con la que se une una secuencia hipervariable de partida se indica en el presente documento como un marco conservado humano aceptor. Aunque los marcos conservados humanos aceptores pueden ser, o derivar, de una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de la misma), preferentemente los marcos conservados humanos aceptores son de, o derivan de, una secuencia de marco conservado consenso humana ya que se han demostrado que dichos marcos conservados tienen inmunogenicidad mínima o no tienen inmunogenicidad, en pacientes humanos.

Cuando el aceptor deriva de una inmunoglobulina humana, se puede seleccionar opcionalmente una secuencia de marco conservado humana que se selecciona basándose en su homología con la secuencia de marco conservado donadora alineando la secuencia de marco conservado con diversas secuencias de marco conservado humanas en una colección de secuencias de marco conservado humanas y seleccionar la secuencia de marco conservado más homóloga como el aceptor.

En una realización, los marcos conservados consenso humanos del presente documento son de, o derivan de, secuencias de marco conservado consenso del subgrupo III de VH y/o subgrupo I de VL kappa.

Por lo tanto, el marco conservado humano aceptor VH puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de marco conservado siguientes:

- FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 46),
- FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 47),
- FR3 que comprende RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 50), en la que X1 es A o R, X2 es T o N, y X3 es A o L,
- FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49)

Los ejemplos de marcos conservados consenso VH incluyen:

- marco conservado consenso de subgrupo I de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 19);
- marco conservado consenso de subgrupo I de VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 20-22);
- marco conservado consenso de subgrupo II de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 23);

marco conservado consenso de subgrupo II de VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 24-26);

subgrupo de VH humano en marco conservado consenso sin las CDR de Kabat (SEQ ID NO: 27);

marco conservado consenso de VH subgrupo III humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 28-30);

marco conservado aceptor VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 31);

marco conservado aceptor VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 32-33);

marco conservado aceptor 2 VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 34); o

marco conservado aceptor 2 VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 35-37).

En una realización, el marco conservado humano aceptor de VH comprende una, dos, tres o todas las secuencias de marco conservado siguientes:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 46),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 47),

FR3 que comprende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 51), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 265), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 266), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 267) o RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 268)

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49).

El marco conservado humano aceptor de VL puede comprender una, dos, tres o todas de las secuencias de marco conservado siguientes:

FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO: 42),

FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 43),

FR3 que comprende GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 44),

FR4 que comprende FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 45).

Los ejemplos de marcos conservados consenso de VL incluyen:

marco conservado consenso de subgrupo I de VL kappa humano (SEQ ID NO: 38);

marco conservado consenso de subgrupo II de VL kappa humano (SEQ ID NO: 39);

marco conservado consenso de subgrupo III de VL kappa humano (SEQ ID NO: 40); o

marco conservado consenso de subgrupo IV de VL kappa humano (SEQ ID NO: 41).

Aunque el aceptor puede tener una secuencia idéntica a la secuencia de marco conservado humana seleccionada, sea esta de una inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano, la presente invención contempla que la secuencia aceptor puede comprender sustituciones de aminoácidos preexistentes en relación con la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia de marco conservado consenso humana. Estas sustituciones preexistentes son preferentemente mínimas; habitualmente diferencias de cuatro, tres, dos o un aminoácidos solamente en relación con la secuencia de inmunoglobulina humana o secuencia de marco conservado consenso.

Se incorporan restos de región hipervariable del anticuerpo no humano en los marcos conservados humanos aceptores VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar restos correspondientes a los restos de CDR de Kabat, los restos de bucle hipervariable de Chothia, los restos de Abm y/o restos de contacto. Opcionalmente, se incorporan los restos de región hipervariable extendida siguientes: 24-34(L1), 50-56(L2) y 89-97(L3), 26-35 (H1), 50-65 o 49-65(H2) y 93-102, 94-102 o 95-102(H3).

Aunque se analiza en el presente documento la "incorporación" de restos de región hipervariable, se apreciará que esto puede conseguirse de diversas maneras, por ejemplo, puede generarse ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada mutando ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable de ratón de modo que se cambien los restos de marco conservado de la misma a restos de marco conservado humano aceptor, o mutando ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable humana de modo que los restos de dominio hipervariable se cambien a restos no humanos, o sintetizando ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

En los ejemplos en el presente documento, se generaron variantes con injertos de región hipervariable por mutagénesis de Kunkel de ácido nucleico que codifica las secuencias aceptoras humanas, usando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel y col., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Pueden introducirse cambios apropiados dentro de la región marco y/o hipervariable, usando técnicas rutinarias, para corregir y restablecer interacciones de región hipervariable-antígeno apropiadas.

Puede usarse presentación en fagos (o fagémidos) (a veces también denominada en el presente documento presentación en fagos en algunos contextos) como un método conveniente y rápido para generar y explorar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una biblioteca generada por selección aleatoria de secuencia. Sin

embargo, otros métodos para preparar y explorar anticuerpos alterados están disponibles para los expertos en la materia.

- 5 La tecnología de presentación en fagos (o fagémidos) ha proporcionado una herramienta potente para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen con un ligando, tal como un antígeno. Usando las técnicas de presentación en fagos (o fagémidos) se permite la generación de grandes bibliotecas de variantes proteicas que pueden clasificarse rápidamente con respecto a las secuencias que se unen con una molécula diana con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes se fusionan en general con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura vírica, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII.
- 10 Se han desarrollado sistemas de presentación en fagémidos monovalentes en los que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990), Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de presentación en fagémido monovalente, la fusión génica se expresa a bajos niveles y también se expresan proteínas de gen III tipo silvestre de modo que se conserve la capacidad de infección de las partículas. Se han desvelado en muchas patentes métodos para generar bibliotecas peptídicas y explorar esas bibliotecas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.723.286, Patente de Estados Unidos N.º 5.442.018, Patente de Estados Unidos N.º 5.580.717, Patente de Estados Unidos N.º 5.427.908 y Patente de Estados Unidos N.º 5.498.530).
- 20 Se han preparado bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno de varias maneras incluyendo alterando un único gen insertando secuencias de ADN aleatorias o clonando una familia de genes relacionados. Se han descrito métodos para presentar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno usando presentación en fagos (o fagémidos) en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717 y 5.658.727. La biblioteca se explora después para expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con las características deseadas.

Están bien establecidos en la técnica métodos para sustituir un aminoácido elegido en un ácido nucleico molde, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, los restos de región hipervariable pueden sustituirse usando el método de Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987)

35 La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para alterar los restos de región hipervariable. Un conjunto de codones es un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes usados para codificar aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codones pueden representarse usando símbolos para designar nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra a continuación de acuerdo con el código IUB.

#### CÓDIGOS IUB

- 40 G Guanina  
A Adenina  
T Timina  
C Citosina  
R (A o G)  
Y (C o T)  
45 M (A o C)  
K (G o T)  
S (C o G)  
W (A o T)  
H (A o C o T)  
50 B (C o G o T)  
V (A o C o G)  
D (A o G o T)  
N (A o C o G o T)

55 Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

60 Pueden sintetizarse conjuntos de cebadores u oligonucleótidos usando métodos convencionales. Puede sintetizarse un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degradación" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica. Dichos conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen



un conjunto de codones particular incluirá normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

En un método, pueden crearse las secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes por mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica se conoce bien en este campo como se describe en Zoller *et al.* Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 (1987). Brevemente, se crean las secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes hibridando un conjunto de oligonucleótidos que codifica los conjuntos de codones deseados con un molde de ADN, en el que el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia molde de ácido nucleico de región variable. Después de la hibridación, se usa ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa del molde que incorporará de este modo el cebador oligonucleotídico, y contendrá los conjuntos de codones proporcionados por el conjunto de oligonucleótidos.

En general, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios con el molde en uno de los lados del nucleótido o los nucleótidos que codifican la mutación o las mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido hibride apropiadamente con la molécula molde de ADN monocatenaria. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en este campo tales como la descrita en Crea *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978).

El molde de ADN se genera por los vectores que derivan de vectores de bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles en el mercado son adecuados), o los vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.*, Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por tanto, el ADN que va a mutarse puede insertarse en uno de estos vectores para generar molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionada anteriormente.

Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario en condiciones de hibridación adecuadas. Después se añade una enzima polimerizadora de ADN, habitualmente ADN polimerasa T7 o el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, para sintetizar la cadena complementaria del molde usando el oligonucleótido como un cebador para síntesis. Se forma de este modo una molécula heterodúplex de modo que una cadena de ADN codifique la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (el molde original) codifique la secuencia nativa inalterada, del gen 1. Esta molécula heterodúplex se transforma después en una célula hospedadora adecuada, habitualmente un procarionta tal como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, estas se siembran en placas de agarosa y se exploran usando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con un fosfato-32 para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

El método descrito inmediatamente antes puede modificarse de modo que se cree una molécula homodúplex en la que ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o las mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), con una tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo de molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde excepto para las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de digestión por endonucleasa de restricción. Después de cortarse la cadena molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la cadena molde puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada más allá de la región que contiene el sitio o los sitios para mutar. La reacción se detiene después para dejar una molécula que es solamente parcialmente monocatenaria. Después se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos, ATP y ADN-ligasa. Esta molécula homodúplex puede después transformarse en una célula hospedadora adecuada.

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de suficiente longitud para hibridar con el ácido nucleico molde y también puede, aunque no es necesario, contener sitios de restricción. El molde de ADN puede generarse por los vectores que derivan de vectores de bacteriófagos M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.* Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por lo tanto, el ADN que va a mutarse debe insertarse en uno de estos vectores para generar molde monocatenario. Se describe la producción del molde monocatenario en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

De acuerdo con otro método, puede generarse una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codones proporcionados dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, junto con una secuencia de ácido nucleico molde de dominio variable, pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden denominarse "casetes de ácido nucleico", ya que

pueden fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de cubierta vírica y dominios de dimerización, usando técnicas de biología molecular establecidas.

5 La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para las posiciones accesibles al disolvente y altamente diversas en una región hipervariable. Como se ha descrito anteriormente, un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usado para codificar aminoácidos variantes deseados.

10 Los selectores de anticuerpos que cumplen los criterios deseados, seleccionados mediante etapas de exploración/selección apropiadas pueden aislarse y clonarse usando técnicas recombinadas convencionales.

#### *Fragmentos de anticuerpo*

15 La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias existen ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) Nat. Medicina. 9: 129-134

20 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron 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, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en y segregarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de cantidades mayores de estos fragmentos. Pueden aislarse fragmentos de anticuerpo de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab<sup>1</sup>-SH 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 F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinante. Se describen fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con semivida *in vivo* aumentada que comprende restos de epítopos de unión a receptor de recuperación en la Patente de Estados Unidos N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la materia. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos. N.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistas de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión scFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o el extremo carboxilo de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

40

#### **Anticuerpos Humanizados**

45 La 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 él desde una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, 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 región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

55

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado. Véase por ejemplo, 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. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véase, por ejemplo, Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151: 2623.

65

Es deseable en general además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de papel probable de los restos en la función de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

### 15 **Anticuerpos Humanos**

Pueden construirse anticuerpos humanos combinando una secuencia o secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos derivadas de seres humanos con una secuencia o secuencias de dominio constante humanas conocidas como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la invención mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromioma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, en Kozbor J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Techniques y Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255 (1992); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993).

También puede usarse la distribución genética para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza 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 aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido tras la retirada de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo controla (imprime) la elección del compañero de cadena humana. Cuando el proceso se repite para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto HVR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o HVR de origen no humano.

### **Anticuerpos biespecíficos**

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para FGF19 y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse con dos epítopos diferentes de FGF19. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan FGF19. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a FGF19 y una rama que se une con un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos partes de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es algo incómoda, y los rendimientos de productos son

bajos. Se desvelan 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).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para unión a cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son particularmente significativas.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles 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 modificarse técnicamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o a las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario 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). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de reticulación adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo 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 complejo con ditiol arsenita sódica para estabilizar ditiolos adyacentes y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se convierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH 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 biespecífico completamente humanizada F(ab')<sub>2</sub>. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. 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 ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los

homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos  
 5 biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios VL y VH de un fragmento ha emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros  
 10 de Fv monocatenario (sFv) también se ha indicado. Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

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

#### 15 **Anticuerpos multivalentes**

Puede internalizarse un anticuerpo multivalente (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a  
 20 antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por 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. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización 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 amino-terminales de la región Fc. En ciertas  
 25 realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En dicha realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)<sup>n</sup>-VD2-(X2)<sup>n</sup>-Fc, en la que VD1 es  
 30 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, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: cadena de VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena de VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente  
 35 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.

#### 40 **Anticuerpos de un único dominio**

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de un único dominio. Un anticuerpo de un único dominio es una única cadena polipeptídica que comprende todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un  
 45 anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de un único dominio consiste en todo o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

#### 50 **Variantes de anticuerpos**

En algunas realizaciones, se contemplan una modificación o modificaciones de secuencias 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. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante  
 55 síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos de anticuerpo objeto en el momento que se realice esa secuencia.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga  
 60 tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina y polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo más

variantes u otras variantes en, o en lugar de, sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y las inmunoglobulinas expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

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

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o reducir la medida en que el anticuerpo está glucosilado. La glucosilación de polipéptidos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o supresión de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire uno o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede prepararse mediante la adición, supresión o sustitución de uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que generalmente se une por un enlace N con Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* (1997) TIBTECH 15: 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) con una región Fc. Dichas variantes pueden tener función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, Publicaciones de Patentes de Estados Unidos N.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: 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; WO2002/031140; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados 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 documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celular nuligénicas tales como gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO nuligénicas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 94(4): 680-688 (2006); y documento WO2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); Patente de Estados Unidos N.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran adicionalmente ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). Dichas sustituciones pueden producirse en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo hace un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc del anticuerpo se miden para asegurar que solamente se mantengan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a Fc $\gamma$ R (que por lo tanto probablemente carecen de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente 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 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de Estados Unidos N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al.* *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 83: 7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166: 1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y Linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103: 2738-2743 (2004)). También puede realizarse unión de FcRn y determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Se proporcionan más cambios sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos explorarse, por ejemplo, con respecto a una actividad deseada, tal como unión a antígeno mejorada, inmunogenicidad reducida, ADCC o CDC mejorada, etc.

TABLA 1

Resto Original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; He	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp,	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
He (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	He
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; He	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	He; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Pueden conseguirse modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo seleccionando sustituciones que afectan (a) a la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

5 Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades de cadena lateral comunes:

- 10 (1) hidrófobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- 15 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativos o en los sitios restantes (no conservados).

20 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, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación con el anticuerpo parental del que se generaron. Una variante de sustitución a modo de ejemplo es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente usando técnicas de maduración de afinidad basadas en presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 25 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 fagos filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de cubierta de fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetadas dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración (por ejemplo, exploración de alanina) para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en este campo, incluyendo las desarrolladas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración usando técnicas conocidas en este campo, incluyendo las descritas en el presente documento, y pueden seleccionarse para desarrollo adicional variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes.

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

45 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo la de una cisteína de bisagra.

De acuerdo con la presente descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo 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 conservarían no obstante sustancialmente las mismas características requeridas para utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que ciertas alteraciones pueden realizarse en la región Fc que darían como resultado unión a C1q alterada (es decir, bien mejorada o bien reducida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, 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 documento WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión mejorada o reducida con FcR. Véase, también Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada con el receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de región Fc con FcRn. Se describen variantes polipeptídicas



con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o reducida en la Patente de Estados Unidos N.º 6.194.551B1, documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en el que la protuberancia puede situarse en la cavidad para promover la formación de complejo de los primer y segundo polipéptidos de Fc. Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.731.168.

15 En otro aspecto más, puede ser deseable crear anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos aparecen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos restos con cisteína, se sitúan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos farmacológicos u otros restos de enlazador-fármaco, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos pueden sustituirse con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada.

#### Derivados de anticuerpos

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para 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/anhidrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o bien copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles de 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 unen más de un polímero, estos pueden ser iguales o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpo se va a usar en una terapia en condiciones definidas, etc.

40 En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que las células próximas al resto no proteico de anticuerpo se destruyen.

#### 45 **Ensayos de actividad**

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

50 En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-19 de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la modulación de uno o más aspectos de efectos asociados a FGF19, incluyendo pero sin limitación unión a FGF19, activación de FGFR4, señalización molecular corriente abajo de FGFR4, alteración de la unión de FGFR4 con FGF19, multimerización de FGFR4, expresión de un gen de CYP7 $\alpha$ 1, fosforilación de FGFR4, MAPK, FRS2 y/o ERK2, activación de  $\beta$ -catenina, migración celular promovida por FGF19 y/o alteración de cualquier ruta biológica de FGF19 y/o de FGFR4 biológicamente relevante, y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado a expresión y/o actividad de FGF19 (tal como expresión y/o actividad de FGF19 aumentada).

60 En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su capacidad para inhibir, reducir y/o bloquear la represión inducida por FGF19 de la expresión de un gen de CYP7 $\alpha$ 1 en una célula expuesta a FGF19, usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente N.º 11/673.411, presentada el 9 de febrero de 2007. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su capacidad para inhibir, reducir y/o bloquear la fosforilación inducida por FGF19 de FGFR4, MPAK, FRS2 y/o ERK2 en una célula expuesta a FGF19, usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados

Unidos del mismo propietario que la presente N.º 11/673.411, presentada el 9 de febrero de 2007) o ejemplificada en el presente documento. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su capacidad para inhibir, reducir y/o bloquear migración celular promovida por FGF19 (por ejemplo, una célula tumoral, por ejemplo, una célula HCT116), usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente N.º 11/673.411, presentada el 9 de febrero de 2007). En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su capacidad para inhibir, reducir y/o bloquear la actividad de la ruta de Wnt en una célula. En algunas realizaciones, la activación de la ruta de Wnt comprende uno o más de inmunoreactividad 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. La detección de la activación de la ruta de Wnt se conoce en la técnica, y se describen y ejemplifican algunos ejemplos, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente N.º 11/673.411, presentada el 9 de febrero de 2007.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, transferencia de Western, etc. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su capacidad para bloquear la unión de FGF19 con FGFR4, por ejemplo como se ejemplifica en el presente documento. En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento por la unión con FGF19. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo de competición se une con el mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une con cualquiera de los anticuerpos anti-FGF19 descritos en el presente documento. Los ensayos de competición a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, ensayos rutinarios tales como los proporcionados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cp.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Se proporcionan métodos a modo de ejemplo detallados para mapear un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen el mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en 50 % o más.

En un ensayo de competición a modo de ejemplo, se incubaba FGF19 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une con FGF19 y un segundo anticuerpo no marcado que se ensaya con respecto a su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión con FGF19. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba FGF19 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo con FGF19, se retira el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcador asociado a FGF19 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado a FGF19 inmovilizado está reducida sustancialmente en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión con FGF19.

Las inmunoglobulinas purificadas pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, pero sin limitación, secuenciación N terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En ciertas realizaciones de la invención, las inmunoglobulinas producidas en el presente documento se analizan con respecto a su actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la presente invención se ensayan con respecto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directo o competitivo usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Se proporciona a continuación un ensayo de unión a antígeno ilustrativo en la sección de Ejemplos.

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

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos producidos en el presente documento se analizan con respecto a su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se ensayan con respecto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directo o competitivo usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Se proporcionan posteriormente en la sección de Ejemplos ensayos de unión a antígeno ilustrativos.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla anticuerpos alterados que poseen algunas pero no todas

las funciones efectoras, lo que lo hace un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida se miden para asegurar que solamente se mantengan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carezca de unión a Fc $\gamma$ R (que carece por lo tanto probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan Fc $\gamma$ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR de células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en 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 ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica.

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

#### **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 el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora para usar. En general, las células hospedadoras preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas:

##### *i. Construcción de vectores*

Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención usando técnicas recombinantes convencionales. Pueden aislarse y secuenciarse secuencias polinucleotídicas deseadas de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen de marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia 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 control y replicón que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente 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 derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 5.648.237.

Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo,

pueden utilizarse bacteriófagos tales como  $\lambda$ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

5 El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de la temperatura.

10 Se conoce un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para la amplificación directa y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

15 Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas promotores  $\beta$ -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor de *tac* o el de *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo que un trabajador experto los una operativamente a cistrones que codifiquen las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.* (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para aportar cualquier sitio de restricción requerido.

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

25 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 la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli* *trx-B*) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159: 203 (1995).

30 Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen Archeobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram negativos o 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 *E. coli* como hospedadores para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Depósito de ATCC N.º 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110  $\Delta$ fhuA ( $\Delta$ tonA) ptr3 lac lq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de Estados Unidos N.º 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*  $\lambda$ .1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608), Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990). Es necesario en general seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse convenientemente especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como el hospedador cuando se usen plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para aportar el replicón. normalmente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse convenientemente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

ii. Producción de anticuerpos

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transformación significa introducir ADN en el hospedador procarionta de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica usada más es la electroporación.

Se cultivan células procariontas usadas para producir los polipéptidos de la invención en medio conocido en la técnica y adecuado para cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo luria (LB) más complementos nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariontas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan gen resistente a ampicilina.

También puede incluirse cualquier complemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidos solos o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitól.

Las células hospedadoras procariontas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo 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 a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0.

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

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

En un aspecto de la invención, se realiza producción de anticuerpos en gran cantidad por un proceso de fermentación. Están disponibles para producción de proteínas recombinantes diversos procedimientos de fermentación semicontinuos a gran escala. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan propulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteínas se inicia normalmente después de haberse cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque pueden usarse tiempos de inducción más largos o más cortos.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado 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 peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados 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.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse ciertas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes en proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.* (1998), mencionado anteriormente; 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).

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

### iii. Purificación de anticuerpos

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

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmovinoafinidad 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 una alta afinidad con la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o 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 no específica de contaminantes.

Como la primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica a la fase sólida con Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés con la Proteína A. La fase sólida se lava después para retirar contaminantes unidos de forma no específica con la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

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

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

#### (i) Componente de secuencia señal

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

El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo.

#### (ii) Origen de replicación

En general, un componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano.

*(iii) Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, cuando sea relevante, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medio complejo.

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

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

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

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

*(iv) Componente promotor*

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que reconoce el organismo hospedador y está unido operativamente con el ácido nucleico del polipéptido del anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes aleucarióticos tienen una región rica en AT localizada a aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que 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 adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias están insertadas convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción del polipéptido del anticuerpo de vectores en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, 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 células hospedadoras.

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 vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos N.º 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de Estados Unidos N.º 4.601.978. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del Virus de Sarcoma de Rous como el promotor.

*(v) Componente de elemento potenciador*

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen en la actualidad muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de 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) sobre elementos potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de polipéptido de anticuerpo, pero está preferentemente localizado en un sitio 5' del promotor.

*(iv) Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas también contendrán normalmente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3', de ADN o ADNc víricos o eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARN que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

*(vii) Selección y transformación de células hospedadoras*

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN de los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 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 del cuello uterino 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); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

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

*(viii) Cultivo de las células hospedadoras*

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados 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), 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 Patente de Estados Unidos Re. 30.985 pueden usarse como un medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Puede incluirse también cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con las células hospedadoras seleccionadas para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

*(ix) Purificación de anticuerpo*

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero en general usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento o contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos 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 conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que estén basados en cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para  $\gamma 3$



humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo para recuperar.

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

### **Inmunocombinados**

La divulgación también proporciona inmunocombinados (denominados indistintamente "combinados de anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden un anticuerpo combinado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas), o un isótopo radiactivo (es decir, un radiocombinado).

Se han usado inmunocombinados para el suministro local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que destruyen o inhiben el crecimiento o proliferación de células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opin. in Pharmacology* 5: 543-549; Wu *et al* (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1137-1146; Payne, G. (2003) *ibid*: 207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26: 151-172; Patente de Estados Unidos N.º 4.975.278). Los inmunocombinados permiten el suministro dirigido de un resto farmacológico a un tumor, y acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de fármacos no combinados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como a las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 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) pp. 475-506. Se ha indicado que tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales son 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 combinados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al* (2000) *J. 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), maitansinoide (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), y calicheamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se combinan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idc) es un combinado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y unido con un quelante-enlazador 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 Linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (NHL), su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (ozogamicina de gemtuzumab, Wyeth Pharmaceuticals), un combinado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo huCD33 unido a calicheamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; Patentes de Estados Unidos N.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Mertansina de cantuzumab (Immunogen, Inc.), un combinado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC232 unido mediante el enlazador disulfuro SPP con el resto farmacológico maitansinoide, DM1, está avanzando a ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cánceres de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un combinado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto farmacológico maitansinoide, DM1, está desarrollándose para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se combinaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico de CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina *et al* (2003) *Nature Biotechnol.* 21(7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

En ciertas realizaciones, un inmunoc conjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente) agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoc conjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Están disponibles diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re. Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiltiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azibobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026.

También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC106, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

#### 25 Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoc conjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano oriental *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos N.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de Estados Unidos N.º 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análisis del mismo, 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 farmacológicos maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en conjugados farmacológicos de anticuerpos porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante los enlazadores distintos de disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares tumorales.

Se desvelan inmunoc conjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.208.020, 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoc conjugados que comprendían un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal de C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoc conjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se unía con un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une con el oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10<sup>5</sup> antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo con una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides por moléculas de anticuerpo han mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, incluso aunque se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente indicadas anteriormente en el presente documento. Son maitansinoide preferidos

maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos N.º 5.208.020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992), y Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC como se desvela 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 por ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa, o grupos lábiles por esterasa, como desvela en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Se describen y ejemplifican en el presente el documento grupos de enlace adicionales.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y maitansinoide usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse con la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo del enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

#### Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunocombinado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos de dolostatina y derivados, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos N.º 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámicas de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y 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 farmacológico de dolostatina o auristatina puede unirse con el anticuerpo mediante el extremo N (amino) terminal o el extremo C (carboxilo) terminal del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen los restos farmacológicos de monometilauristatina ligados al extremo N DE y DF, desvelados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", N.º de Serie de Estados Unidos 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

Normalmente, pueden prepararse restos farmacológicos basados en péptidos 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. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conocen bien en el campo de la química de péptidos. Los restos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: 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; y 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 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugado con enlazadores).

#### Calicheamicina

En otras realizaciones, el inmunocombinado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia calicheamicina de antibióticos son capaces de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicheamicina, véase Patentes de Estados Unidos 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 calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación a,  $\gamma$ 11,  $\alpha$ 21,  $\alpha$ 31, N-acetil- $\gamma$ 11, PSAG y  $\theta$ 11 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el

anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

##### 5 Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas dianas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, 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 ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa, DNasa).

Para destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo.

Están disponibles diversos isótopos radiactivos/producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo,  $^{99m}Tc$  o  $I^{123}$ , o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, Indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como  $^{99m}Tc$  o  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  e  $In^{111}$  mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse Itrio-90 mediante 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) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiliditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992), Patente de Estados Unidos N.º 5.208.020).

Los compuestos contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos de articulación: 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 disponibles en el mercado, (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos). Véase páginas 46-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

##### Preparación de conjugados farmacológicos de anticuerpos

En los conjugados farmacológicos de anticuerpos (ADC), un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un

resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.

5 Ab-(L-D)<sub>p</sub> I

El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-paminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-Succinimidilo 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores 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.

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

25 Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N-terminales, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tioles de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleófilos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, enlaces de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos tiol reactivos 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).

40 También pueden producirse conjugados farmacológicos de anticuerpos mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amino de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y grupos arilhidracida capaces de reaccionar para forma enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida

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

65 En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en predirección tumoral en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de clarificación y después administración de un "ligando" (por

ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, radionucleótido).

### **Formulaciones farmacéuticas**

5 Se preparan formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington: The Science y Practice of Pharmacy 20ª Edición (2.000)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones  
10 tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; 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).

20 La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para tratar la indicación particular, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

25 Los principios activos también pueden inmovilizarse en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metil-metacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington: The Science y Practice of Pharmacy 20ª edición (2000).

30 Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

35 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, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3- hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando permanecen en el cuerpo durante un periodo largo inmunoglobulinas encapsuladas, estas pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

### **Usos**

55 Un anticuerpo del presente documento puede usarse, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

60 La invención proporciona composiciones útiles para modular las 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 indeseada, comprendiendo dichos métodos 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 expresión aumentada de FGF19, y la patología comprende la colestasis o desregulación del metabolismo de ácido biliar.

65 En un aspecto, la invención se refiere a 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 se refiere a métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular asociado a la expresión y/o 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 se refiere a métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular asociado a 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 se refiere a 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 se refiere a métodos para tratar y/o prevenir un trastorno de debilitamiento, 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 cualquier anticuerpo anti-FGF19 adecuado puede usarse en métodos de tratamiento, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de afinidad madurada, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se usa cualquier anticuerpo anti-FGF19 descrito en el presente documento para tratamiento.

30 Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden unirse con antígeno de otra especie. En consecuencia, los anticuerpos de la invención pueden usarse para unirse con actividad de antígeno específica, 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 forma cruzada un anticuerpo de la invención (por ejemplo chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir actividades del antígeno poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno de modo que se inhiba la actividad del antígeno. Preferentemente, el antígeno es una molécula proteica humana.

35 En una realización, puede usarse un anticuerpo de la invención en un método para unir un antígeno en un individuo que padece un trastorno asociado a una expresión y/o actividad de antígeno aumentada, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de modo que se una al antígeno en el sujeto. Preferentemente, el antígeno es una molécula proteica 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 un anticuerpo de la invención. Adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante administración del antígeno o mediante expresión de un transgén antigénico). Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que reacciona de forma cruzada la inmunoglobulina (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y ciclos temporales de administración).

45 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retardar la progresión de, retardar/prevenir la reaparición de, aliviar, o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas a expresión y/o actividad de una o más moléculas antigénicas.

50 En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos se administra al paciente. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno con el que se une se internaliza por la célula, dando como resultado eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula diana con la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con 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 una calicheamicina), un isótopo radiactivo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

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

enfermedad, la afección y edad del paciente, el tipo y dosis del primer medicamento empleado, etc.

Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, por ejemplo, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos adicionales que también inhiban el crecimiento tumoral.

5 Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede combinarse con un agente antiangiogénico, tal como un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN®) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo anticuerpo anti-HER2 trastuzumab HERCEPTIN® o un anticuerpo anti-HER2 que se una el dominio II de HER2, tal como anticuerpo anti-HER2 pertuzumab OMNITARG™) en un esquema de tratamiento, por ejemplo en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma  
10 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 con radiactividad, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de,  
15 y/o después de, la administración de la terapia o las terapias complementarias. Además, la combinación de un anticuerpo de la presente invención con un agente relativamente no citotóxico tal como otra molécula biológica, por ejemplo, se espera que otro anticuerpo reduzca la citotoxicidad frente a la combinación del anticuerpo con un agente quimioterapéutico de otro agente que es altamente tóxico para células.

20 El tratamiento con una combinación del anticuerpo del presente documento con uno o más segundos medicamentos preferentemente da como resultado una mejora de las señales o síntomas de cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede dar como resultado una mejora de la supervivencia (supervivencia general y/o supervivencia sin progresión) en relación con un paciente tratado solamente con el segundo medicamento (por ejemplo, un agente quimioterapéutico solamente), y/o puede dar como resultado una respuesta objetiva \*(parcial o completa, preferentemente completa). Además, el tratamiento con la combinación de un anticuerpo en el presente documento y uno o más segundos medicamentos preferentemente da como resultado un beneficio terapéutico aditivo, y más preferentemente sinérgico (o mayor que el aditivo), al 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  
25 30 semanas o menos.

Para el tratamiento de cánceres, el segundo medicamento es preferentemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), agente antiangiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citocina, antagonista de citocinas, radioterapia citotóxica, corticosteroides, antiemético,  
35 vacuna de cáncer, analgésico, agente antivasculoso 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 los agentes inhibidores o estabilizadores del huso (por ejemplo, preferentemente alcaloides de la vinca, más preferentemente seleccionados de 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 los dirigidos contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, por ejemplo trastuzumab, o uno de sus fragmentos funcionales, inhibidor de 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 inhibe la actividad tirosina quinasa del EGFR), que es preferentemente el anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado quimérico de ratón-hombre C225, o un anticuerpo humanizado derivado de este anticuerpo 225 o agentes naturales derivados, dianilinoftalimidias, pirazolo o pirrolopiridopirimidinas, quinazilinas, gefitinib, erlotinib, cetuximab, ABX-EFG, canertinib, EKB-569 y PKI-166), o inhibidor EGFR/HER-2  
45 doble tal como lapatanib. Los segundos medicamentos adicionales incluyen alemtuzumab (CAMPATH™), FavID (IDKLH), anticuerpos de 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-CD-80, por ejemplo galiximab.

El agente antiemético 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 de tumores alogénicos o autólogos. El agente analgésico preferentemente es ibuprofeno, naproxeno, trisalicilato magnésico de colina o clorhidrato de oxicodona. El agente antivasculoso preferentemente es bevacizumab o rhuMAb-VGEF. Los segundos medicamentos  
60 adicionales incluyen agentes antiproliferativos tales como inhibidores de proteína farnesil transferasa, inhibidores anti-VEGF, inhibidores de p53, o inhibidores de PDGFR. El segundo medicamento en el presente documento incluye también terapia de diana biológica tal como tratamiento con anticuerpos así como terapia dirigida a moléculas pequeñas, por ejemplo, contra ciertos receptores.

65 Se han identificado muchos agentes anti-angiogénicos y se conocen en la técnica, incluyendo los enumerados en el presente documento, por ejemplo, enumerados en definiciones, y en, por ejemplo Carmeliet y Jain, Nature 407:249-



257 (2.000); Ferrara *et al.*, Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004); y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003). Véase también solicitud de patente de Estados Unidos US20030055006. En una realización, se usa un anticuerpo anti-FGF19 en combinación con un anticuerpo neutralizante anti-VEGF (o fragmento) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista de receptor de VEGF incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, fragmentos de receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular VEGFR tirosina quinasa (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF, variantes antagonistas de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o adicionalmente, pueden coadministrarse opcionalmente dos o más inhibidores de angiogénesis al paciente además de antagonista de VEGF y otro agente. En ciertas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes antineoplásicos, pueden administrarse en combinación con anticuerpo anti-FGF19, el antagonista de VEGF y un agente antiangiogénesis.

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en el presente documento, 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 compuesto basado en platino, un taxano, un alcaloide de la vinca, un inhibidor de c-Kit, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor antiangiogénesis tal como un inhibidor anti-VEGF, un inhibidor de HER-2, un inhibidor de EGFR o un inhibidor doble de EGFR/HER-2 quinasa, un anti-estrógeno tal como fulvestrant, y un agente de terapia hormonal, tal como carboplatino, cisplatino, gemcitabina, capecitabina, epirubicina, tamoxifeno, un inhibidor de aromatasa y prednisona. 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, arinotecán, irinotecán, o FOLFOX, o el cáncer es cáncer de mama y el segundo medicamento es un modulador antiestrógenos tal como fulvestrant, tamoxifeno o un inhibidor de aromatasa 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 trastuzumab, o un inhibidor doble de EGFR/HER-2 quinasa tal como lapatinib o un regulador negativo de HER-2 tal como 17AAG (derivado de geldanamicina que es veneno de proteína de choque térmico [Hsp]90) (por ejemplo, para cánceres de mama que han progresado en trastuzumab). En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón microcítico 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 terapia de primera línea de cáncer es taxotere, solo o en combinación con otros segundos medicamentos. Más preferentemente, si se administra quimioterapia, se proporciona primero, seguido de los anticuerpos del presente documento.

Dichos segundos medicamentos pueden administrarse en un periodo de 48 horas después de administrarse los anticuerpos del presente documento, o en un periodo de 24 horas, o en un periodo de 12 horas, o en un periodo de 3-12 horas después de dicho agente, o pueden administrarse durante 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 simultáneamente, secuencialmente, o alternando con el segundo medicamento o tras ausencia de sensibilidad con otra terapia. Por lo tanto, la administración combinada de un segundo medicamento incluye coadministración (administraciones simultáneas), usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos) los medicamentos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Todos estos segundos medicamentos pueden usarse en combinación entre sí o por sí solos con el primer medicamento, de modo que el "segundo medicamento" expresado como se usa en el presente documento no significa que sea el único medicamento además del primer medicamento, respectivamente. Por lo tanto, no es necesario que el segundo medicamento sea un medicamento, sino que puede constituir o comprender más de uno de dichos fármacos.

Estos segundos medicamentos como se exponen en el presente documento se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como el primer medicamento, o aproximadamente de 1 a 99 % de las dosificaciones de los primeros medicamentos. Si dichos segundos medicamentos se usan, preferentemente, se usan en cantidades menores que si no estuviera presente el primer medicamento, especialmente en dosificaciones posteriores más allá de la dosificación inicial con el primer medicamento, para eliminar o reducir los efectos secundarios provocados por los mismos.

La invención también se refiere a métodos y composiciones para inhibir o prevenir el crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante. El crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante se usa para describir una afección en la que los pacientes que se han sometido a o se tratan con una o más terapias disponibles en la actualidad (por ejemplo, terapias de cáncer, tales como quimioterapia,

radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpos anti-VEGF, particularmente un régimen terapéutico convencional para el cáncer particular) no son clínicamente adecuadas para tratar a los pacientes o los pacientes ya no reciben ningún efecto beneficioso de la terapia de modo que estos pacientes necesitan terapia eficaz adicional. Como se usa en el presente documento, la frase también puede referirse a una afección del paciente "no sensible/refractario", por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia pero padecen efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En diversas realizaciones, un cáncer es crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante cuando 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 consigue ninguna reducción adicional del tamaño o del número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante puede realizarse bien *in vivo* o bien *in vitro* por cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia del tratamiento en células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica de "recidivante" o "refractario" o "no sensible" en dicho contexto. Un tumor resistente a tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de un crecimiento tumoral recidivante.

La invención se refiere a métodos para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o el crecimiento de células cancerosas recidivante en un sujeto administrando uno o más anticuerpos anti-FGF19 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o el crecimiento de células cancerosas recidivante en el sujeto. En ciertas realizaciones, el antagonista puede administrarse después del producto terapéutico de cáncer. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FGF19 se administra simultáneamente con terapia de cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, la terapia de anticuerpo anti-FGF19 se alterna con otra terapia de cáncer, que puede realizarse en cualquier orden. La invención también se refiere a métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para evitar la aparición o reaparición de cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. En general, el sujeto estaba o se está sometiendo simultáneamente a terapia de cáncer. En una realización, la terapia de cáncer es tratamiento con un agente antiangiogénesis por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente antiangiogénesis incluye los conocidos en la técnica y los hallados en las definiciones del presente documento. En una realización, el agente antiangiogénesis es un anticuerpo neutralizante anti-VEGF o fragmento (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; solicitudes de patente de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y documento WO2005012359. Pueden administrarse agentes adicionales en combinación con antagonista de VEGF y un anticuerpo anti-FGF19 para bloquear o reducir el crecimiento tumoral recidivante o crecimiento de células cancerosas recidivante.

Los anticuerpos de la invención (y agente terapéutico adyuvante) se administran por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, los anticuerpos se administran convenientemente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por 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 localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede tomarse en consideración en la preparación y administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención proporcionan que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para introducir en la célula en la que se localiza la diana de unión. En una realización, un anticuerpo de la invención puede expresarse intracelularmente como un intracuerpo. El término "intracuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo que se expresa intracelularmente y es capaz de unirse selectivamente con una molécula diana, como se describe, por ejemplo, en Marasco, Gene Therapy 4:11-15 (1997); Kontermann, Methods 34:163 -170 (2004); Patentes de Estados Unidos números 6.004.940 y 6.329.173; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0104402 y Publicación de PCT N.º WO2003/077945. Véase también, por ejemplo, documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996, con respecto al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Puede efectuarse expresión intracelular de un intracuerpo introduciendo un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o parte de unión a antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y señales secretoras normalmente asociadas al gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) en una célula diana. Pueden suministrarse uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una parte de un anticuerpo de la invención a una célula diana, de modo que se expresen uno o más intracuerpos que sean capaces de unirse con polipéptido diana intracelular y modular la actividad del polipéptido diana. Puede usarse cualquier método convencional para introducir ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, liposomas y transfección con vectores retrovirales, adenovirales, víricos adenoasociados y vaccinia que portan el ácido nucleico de interés.

En ciertas realizaciones, puede introducirse ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de

un paciente por métodos *in vivo* y *ex vivo*. En un ejemplo de suministro *in vivo*, se inyecta ácido nucleico directamente en el paciente, por ejemplo, en el sitio donde se requiere intervención terapéutica. En un ejemplo adicional de suministro *in vivo*, se introduce ácido nucleico en una célula usando transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociado) y sistemas basados en lípidos (son lípidos  
5 útiles para la transferencia mediada por lípidos DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para revisión de ciertos protocolos de marcación génica y terapia génica, véase Anderson *et al.*, Science 256: 808-813 (1992) y documento WO 93/25673 y las referencias citadas en los mismos. En un ejemplo de tratamiento *ex vivo*, se retiran las células de un paciente, se introduce ácido nucleico en esas células aisladas, y las células modificadas se administran al  
10 paciente bien directamente o bien, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 4.892.538 y 5.283.187). Un vector usado habitualmente para suministro *ex vivo* de un ácido nucleico es un vector retroviral.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos de internalización. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características que potencian el suministro de anticuerpos a células, o pueden modificarse para poseer dichas características. Se conocen en este campo técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, se sabe que la cationización  
15 de un anticuerpo facilita su captación en células (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.703.019). También pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo a células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente con la proteína diana puede ser ventajoso. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variables de un anticuerpo, pueden  
20 diseñarse moléculas peptídicas que conservan la capacidad para unirse con la secuencia de proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993).

La entrada de anticuerpos en células diana puede potenciarse por otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas de Tat de HIV o la proteína de homeodominio de antenapedia son capaces de dirigir captación eficaz de proteínas heterólogas a través de las membranas celulares.  
25 Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329.

Cuando la diana de unión de un anticuerpo se localiza en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención posibilitan que el anticuerpo atraviese la barrera hematoencefálica. Existen varios enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos,  
30 métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, evitar la barrera hematoencefálica completamente, o crear aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de elusión incluyen, pero sin limitación, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, Gene Therapy 9: 398-406 (2002), suministro potenciado por convección/infusión intersticial (Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)), e implantación de un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, Nature Med. 9:589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford  
40 Pharmaceutical). Los métodos para crear aperturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos (véase, por ejemplo, publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N.º 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416), y transfección  
45 de neuronas que atraviesan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, Publicación Patente de Estados Unidos N.º 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsular el anticuerpo en liposomas que se acoplan con fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20020025313) y recubrir el anticuerpo con partículas lipoproteicas de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20040131692).  
50

Los métodos basados en células madre para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica implican modificar por ingeniería genética células progenitoras neurales (NPC) para expresar el anticuerpo de interés y después implantar las células madre en el cerebro del individuo para tratar. Véase Behrstock *et al.* (2005) Gene Ther. 15 Dic. 2005 publicación en línea avanzada (indica que las NPC modificadas genéticamente para expresar el factor neurotrófico GDNF redujeron los síntomas de enfermedad de Parkinson cuando se implantaron en los cerebros de modelos de roedores y primates).  
60

Los métodos basados en receptor y canal de transporte de un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, uso de bloqueadores de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); activación de canales de potasio (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2005/0089473), inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo,  
65

Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0073713); recubrimiento de anticuerpos con una transferrina y modulación de la actividad del o los receptores de transferrina (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0129186) y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.004.697).

5 Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por  
10 los practicantes médicos. El anticuerpo puede formularse opcionalmente con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, aunque no es necesario. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en el presente documento, o aproximadamente de 1 a 99 % de las dosificaciones  
15 descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de  
20 enfermedad para tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para  
25 administración al paciente, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o bien mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente se mantendría hasta que se produjera una supresión deseada de síntomas de la enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo  
30 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) puede administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguida de una  
35 o más dosis menores. Un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

#### 40 **Métodos de diagnóstico y métodos de detección**

Los anticuerpos anti-FGF19 de la invención son útiles en ensayos que detectan la expresión de FGF19 (tales como ensayos de diagnóstico o pronóstico) en células o tejidos específicos en los que los anticuerpos se marcan como se describe continuamente y/o se inmovilizan en una matriz insoluble. Sin embargo, se entiende que puede usarse  
45 cualquier anticuerpo anti-FGF19 adecuado en realizaciones que impliquen detección y diagnóstico. Se describen en el presente documento algunos métodos para preparar anticuerpos anti-FGF19 y se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos anti-FGF19.

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

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

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

60 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 está *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGF19 se marca de forma detectable.

65 Pueden usarse anticuerpos anti-FGF19 (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos FGF19 descritos en el presente

documento) para la detección de FGF19 en uno cualquiera de varios métodos de ensayo de detección bien conocidos.

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

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para seleccionar tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) detectar la expresión de FGF19 en la muestra biológica de un individuo, si la hubiera; y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar tratamiento para el individuo, en el que la selección del tratamiento se basa en la expresión de FGF19 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 aumentada en la muestra biológica del individuo en relación con un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 reducida en la muestra biológica de un individuo en relación con un valor de referencia o una muestra de control en el individuo. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 y se selecciona tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19. Se describen en el presente documento métodos para tratar un trastorno con un anticuerpo anti-FGF19 y se ejemplifican en el presente documento algunos métodos.

En otro aspecto, la divulgación 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) administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19, en el que además se detecta expresión de FGF19 y/o FGFR4 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 sobreexpresión de FGF19 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGFR4 antes, durante y/o después de la administración del 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 de para tratar un trastorno con un anticuerpo anti-FGF19 y se ejemplifican en el presente documento algunos métodos.

Por ejemplo, una muestra biológica puede ensayarse con respecto a FGF19 obteniendo la muestra de una fuente deseada, mezclando la mezcla con anticuerpo anti-FGF19 para permitir que el anticuerpo forme complejo de anticuerpo/FGF19 con cualquier FGF19 presente en la mezcla, y detectar cualquier complejo de anticuerpo/FGF19 presente en la mezcla. La muestra biológica puede prepararse para ensayo por métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra particular. Los métodos de mezcla de la muestra con anticuerpos y los métodos de detección de complejo de anticuerpo/FGF19 se eligen de acuerdo con el tipo de ensayo usado. Dichos ensayos incluyen inmunohistoquímica, ensayos competitivos y de tipo sándwich y ensayos de inhibición estérica. Para la preparación de muestras, puede usarse una muestra tisular o celular de un mamífero (normalmente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, pero sin limitación, células de cáncer tales como células de cáncer de colon, de mama, de próstata, de ovario, de pulmón, de estómago, de páncreas, linfoma y leucemia. FGF19 también puede medirse en suero. La muestra puede obtenerse por diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser nuevo o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. La muestra tisular puede fijarse (es decir conservarse) por metodología convencional (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 fijador se determina por el fin para el que va a teñirse histológicamente o analizarse de otro modo la muestra. Un experto habitual en la materia también apreciará que la longitud de fijación depende del tamaño de la muestra tisular y el fijador usado. Como ejemplo, puede usarse formalina tamponada neutra, de Bouin o paraformaldehído para fijar una muestra. En general, la muestra se fija en primer lugar y se deshidrata después mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se incluye en parafina u otro medio de sección de modo que la muestra tisular pueda seccionarse. Como alternativa, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. Como ejemplo, la muestra tisular puede incluirse y procesarse en parafina por metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", mencionado anteriormente). Los ejemplos de parafina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez que la muestra tisular se ha incluido, la muestra puede seccionarse mediante un microtomo o similares (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", mencionado anteriormente). Como ejemplo de este procedimiento, las secciones pueden variar de aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de grosor. Una vez seccionadas, las secciones pueden unirse a portaobjetos por varios métodos convencionales. Los ejemplos de adhesivos de portaobjetos incluyen, pero sin limitación, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. Como ejemplo, las secciones incluidas en parafina pueden unirse con portaobjetos con carga positiva y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Si se ha usado parafina como el material de inclusión, las

secciones tisulares generalmente se desparafinizan y se rehidratan en agua. Las secciones tisulares pueden desparafinizarse por varias metodologías convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie descendiente gradualmente de alcoholes (véase por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", mencionado anteriormente). Como alternativa, pueden usarse agentes no orgánicos desparafinizantes disponibles en el mercado tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

Todos los métodos analíticos para FGF19 usan 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 "indicadores".

El marcado usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de FGF19 y anticuerpo anti-FGF19. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayo, incluyendo los ejemplos restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que deben hacerse reaccionar o derivatizarse para poder detectarse.

El marcador usado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión de FGF19 y anticuerpo anti-FGF19. Se conocen numerosos marcadores para su uso en inmunoensayo, incluyendo los ejemplos restos que pueden detectarse directamente, tales como fluorocromo, marcadores quimioluminiscentes y radiactivos, así como restos, tales como enzimas, que deben hacerse reaccionar o derivatizarse para poder detectarse. 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 quelados de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano rústico (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Están disponibles métodos convencionales para unir estos marcadores covalentemente con 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. Véase, por ejemplo, Patente 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. Methods*, 40: 219-230 (1981); y Nygren, *J. Histochem. y Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Son marcadores preferidos en el presente documento enzimas tales como peroxidasa de rábano rústico y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento de manipulación convencional para un experto habitual en las técnicas de inmunoensayo. Véase, 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), pp. 147-166.

Se requiere inmovilización de reactivos para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-FGF19 de cualquier FGF19 que permanezca libre en solución. Esto se consigue convencionalmente mediante insolubilización del anticuerpo anti-FGF19 o análogo de FGF19 antes del procedimiento de ensayo, como mediante adsorción a 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 análogo de FGF19 posterior, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

La expresión de proteínas en una muestra puede examinarse usando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha mostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares es un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para explorar y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes. Para preparación de muestras, puede usarse una muestra tisular o celular de un mamífero (normalmente un paciente humano). La muestra puede obtenerse por diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser nuevo o congelado. En una realización, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. La muestra tisular puede fijarse (es decir conservarse) por metodología convencional. Un experto habitual en la materia apreciará que la elección de un fijador se determina por el fin para el que la muestra va a teñirse histológicamente o analizarse de otro modo. Un experto habitual en la materia también apreciará que la longitud de fijación depende del tamaño de la muestra tisular y el fijador usado.

Puede realizarse IHC en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* de fluorescencia. Están disponibles dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión de anticuerpo con el antígeno diana (por ejemplo, FGF19) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como un marcador fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que puede visualizarse sin interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo

primario no conjugado se une con el antígeno y después se une un anticuerpo secundario marcado con el anticuerpo primario. Cuando se conjuga el anticuerpo secundario con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar visualización del antígeno. Se produce amplificación de señal porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

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

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

15 Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección tisular se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas para que el anticuerpo primario se una con el antígeno proteico diana en la muestra tisular. Las condiciones apropiadas para conseguir esto pueden determinarse por experimentación rutinaria. El alcance de la unión de anticuerpo con la muestra se determina usando uno cualquiera de los marcadores detectables analizados 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'-diaminobenzidina. Preferentemente el marcador enzimático se conjuga con un anticuerpo que se une específicamente con el anticuerpo primario (por ejemplo el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

25 Las muestras de ensayo preparadas de este modo pueden montarse y taparse con cubreobjetos. Después se determina la evaluación de portaobjetos, por ejemplo usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de tinción, usados habitualmente en la técnica.

30 Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o de tipo sándwich, están bien establecidos y se usan ampliamente en la industria de diagnóstico comercial.

Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de FGF19 indicador para competir con el FGF19 de la muestra de ensayo por un número limitado de sitios de unión a antígeno de anticuerpo anti-FGF19. El anticuerpo anti-FGF19 generalmente está insolubilizado antes o después de la competición y después el indicador y FGF19 unidos al anticuerpo anti-FGF19 se separan del indicador no unido y FGF19. Esta separación se consigue por decantación (cuando el compañero de unión estaba preinsolubilizado) o por centrifugación (cuando el compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de FGF19 de muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de indicador unido como se mide por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan curvas de respuesta a 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 de ELISA cuando se usan enzimas como los marcadores detectables.

Otra especie de ensayo competitivo, denominado un ensayo "homogéneo", no requiere una separación de fases. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el FGF19 y se usa de modo que cuando el anticuerpo anti-FGF19 se una con el FGF19 la presencia del anticuerpo anti-FGF19 modifique la actividad enzimática. En este caso, el FGF19 o sus fragmentos activos inmunológicamente se conjugan con un enlace orgánico bifuncional con una enzima tal como peroxidasa. Se seleccionan conjugados para su uso con anticuerpo anti-FGF19 de modo que la unión del anticuerpo anti-FGF19 inhiba o potencie la actividad enzimática del marcador. Este método en sí mismo se practica ampliamente con el nombre de EMIT.

50 Se usan conjugados estéricos en métodos de impedimento estérico para ensayo homogéneo. Estos conjugados se sintetizan mediante enlaces covalentes de un hapteno de bajo peso molecular con un fragmento de FGF19 pequeño de modo que el anticuerpo para hapteno sea sustancialmente incapaz de unirse con el conjugado al mismo tiempo que un anticuerpo anti-FGF19. En este procedimiento de ensayo el FGF19 presente en la muestra de ensayo se unirá con un anticuerpo anti-FGF19, permitiendo de este modo que el anti-hapteno se una con el conjugado, dando como resultado un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

Los ensayos de tipo sándwich son particularmente útiles para la determinación de FGF19 o anticuerpos anti-FGF19. En ensayos de tipo sándwich secuenciales se usa un anticuerpo anti-FGF19 inmovilizado para adsorber la muestra de ensayo FGF19, la muestra de ensayo se retira como por lavado, el FGF19 unido se usa para adsorber un segundo anticuerpo anti-FGF19, marcado, y el material unido se separa después del indicador residual. La cantidad del indicador unido es directamente proporcional al FGF19 de muestra de ensayo. En ensayos de tipo sándwich "simultáneos" la muestra de ensayo no se separa antes de añadir el anti-FGF19 marcado. Un ensayo de tipo sándwich secuencial usando un anticuerpo monoclonal anti-FGF19 como un anticuerpo y un anticuerpo anti-FGF19 policlonal como el otro es útil en el ensayo de muestras para FGF19.

Los anteriores son meramente ensayos de detección a modo de ejemplo para FGF19. Otros métodos actuales o desarrollados posteriormente que usen anticuerpo anti-FGF19 para la determinación de FGF19 se incluyen dentro del alcance de la presente, incluyendo los bioensayos descritos en el presente documento.

5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para detectar (por ejemplo, presencia o ausencia o cantidad de) un polinucleótido o polinucleótidos (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, micromatrices de polinucleótidos y similares.

10 Se conocen bien métodos para la detección de polinucleótidos (tales como ARNm) e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (tal 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 similares).

15 Las muestras biológicas de mamíferos pueden ensayarse convenientemente, por ejemplo, con respecto a ARNm de FGF19 usando análisis de Northern, transferencia puntual o PCR. Por ejemplo, se conocen bien en la técnica ensayos de RT-PCR tales como ensayo de PCR cuantitativa. En una realización ilustrativa de la invención, un método para detectar ARNm de FGF19 en una muestra biológica comprende producir ADNc 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 con sentido y antisentido para amplificar ADNc de FGF19 en el mismo; y detectar la presencia o ausencia del ADNc de FGF19 amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar la cantidad (niveles) de ARNm de FGF19 en una muestra biológica (por ejemplo mediante examen simultáneo de 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.

20 Pueden marcarse sondas y/o cebadores con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos de FGF19 en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa proteínas FGF19. Como entenderá el experto en la materia, pueden prepararse multitud de cebadores y sondas diferentes (por ejemplo, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento) y usarse eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia o ausencia de y/o cantidad de ARNm de FGF19.

25 Los métodos opcionales de la invención incluyen protocolos que comprenden detección de polinucleótidos, tales como polinucleótido de FGF19, en una muestra tisular o celular usando tecnologías de micromatrices. Por ejemplo, usando micromatrices de ácido nucleico, muestras de ARNm de ensayo y de control de muestras tisulares de ensayo y de control se transcriben de forma inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. Las sondas se hibridan después con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizado en un soporte sólido. La matriz se configura de modo que se conozca la secuencia y posición de cada miembro de la matriz. Por ejemplo, puede disponerse una selección de genes que tienen potencial para expresarse en ciertas patologías en un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido enfermo puede proporcionar información valiosa. La tecnología de micromatrices utiliza técnicas de hibridación de ácido nucleico y tecnología informática para evaluar el perfil de expresión de ARNm de miles de genes en un único experimento. (Véase, por ejemplo, documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (véase, por ejemplo, documento U.S. 5.700.637, Patente de Estados Unidos 5.445.934 y Patente de Estados Unidos 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14: 1675-1680 (1996); Cheung, V.G. *et al.*, Nature Genetics 21(Supl): 15-19 (1999) para un análisis de fabricación de matrices). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos génicos que se sintetizan directamente en o se aplican puntualmente en vidrio u otros sustratos. Habitualmente se representan miles de genes en una única matriz. Un experimento de micromatriz típico implica las siguientes etapas: 1. preparación de diana marcada con fluorescencia de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3. lavado, tinción y exploración de la matriz, 4. análisis de la imagen escaneada y 5. generación de perfiles de expresión génica. En la actualidad se usan dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (habitualmente de 25 a 70 unidades) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. Al formar una matriz, los oligonucleótidos pueden prefabricarse y aplicarse puntualmente a la superficie o sintetizarse directamente en la superficie (*in situ*).

30 El sistema Affymetrix GeneChip® es un sistema de micromatrices disponible en el mercado que comprende matrices fabricadas por síntesis directa de oligonucleótidos en una superficie de vidrio. Matrices de sonda/gen: se sintetizan oligonucleótidos, habitualmente de 25 unidades, directamente en una oblea de vidrio por una combinación de fotolitografía basada en semiconductor 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 ondas oligonucleotídicas se sintetizan en localizaciones conocidas en la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden



- interpretarse con respecto a identidad génica y niveles de expresión relativa por el software Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está presentado en la matriz por una serie de sondas oligonucleotídicas diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido perfectamente coincidente y un oligonucleótido desapareado. La sonda perfectamente coincidente tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y de este modo mide la expresión del gen. La sonda desapareada difiere de la sonda perfectamente coincidente por una sustitución de una única base en la posición de base central, alterando la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no especifica que contribuye a la señal medida para el oligo perfectamente coincidente. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas desapareadas de las de las sondas perfectamente coincidentes para determinar el valor o intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen basándose en la información actual de GenBank y otros depósitos de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un Horno de Hibridación GeneChip (horno "asador") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación de fluidos realiza lavado y tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo se controla independientemente mediante el software Microarray Suite usando protocolos de fluidos preprogramados. El escáner es un escáner de fluorescencia de 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 software Microarray Suite controla la estación de fluidos y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones de fluidos usando hibridación preprogramada, lavado y protocolos de tinción para la matriz de sondas. El software también adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una decisión de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos mediante análisis de comparación y formatea los resultados en archivos .txt que pueden usarse con otros programas informáticos para análisis de datos adicionales.
- En algunas realizaciones, se detecta supresión génica, mutación génica o amplificación génica de FGF19. La supresión génica, mutación génica o amplificación puede medirse por uno cualquiera de una amplia diversidad 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. USA, 77: 5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), usando una sonda marcada de forma apropiada, métodos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) usando una sonda marcada de forma apropiada. Además, estos métodos pueden emplearse para detectar supresión génica de ligando, mutación de ligando o amplificación génica de FGF19. Como se usa en el presente documento, "detectar la expresión de FGF19" abarca la detección de la supresión génica, mutación génica o amplificación génica de FGF19.
- Adicionalmente, se puede examinar el estado de metilación del gen de FGF19 en una muestra tisular o celular. Se producen con frecuencia desmetilación aberrante y/o hipermetilación de islas de CpG en regiones reguladoras génicas 5' en células inmortalizadas y transformadas, y puede dar como resultado 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 enfoques de hibridación de Southern, enzimas de restricción sensibles a metilación que no pueden escindir secuencias que contengan sitios de CpG metilados para evaluar el estado de metilación de islas de CpG. Además, MSP (PCR específica de metilación) puede perfilar rápidamente el 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 de ADN por bisulfito sódico (que convertirá todas las citocinas no metiladas en uracilo) seguido de amplificación usando cebadores específicos para ADN metilado frente al no metilado. También pueden encontrarse protocolos que implican interferencia en metilación por ejemplo en 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). Como se usa en el presente documento "detectar la expresión de FGF19" abarca detección de la metilación del gen de FGF19.
- En un aspecto, la divulgación proporciona detección de expresión del polipéptido y/o polinucleótido de FGFR4 (solos o en conjunto (simultáneamente y/o secuencialmente) con expresión de FGF19) en una muestra biológica. Usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento, puede detectarse la expresión del polinucleótido y/o polipéptido de FGFR4. Como ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente pueden emplearse para detectar la presencia de una o más de dichas moléculas en la muestra. Como se usa en el presente documento, se entiende que "en conjunto" abarca cualquier detección simultánea y/o secuencial. Por lo tanto, se contempla que en realizaciones en las que se está examinando una muestra biológica no solamente con respecto a la presencia de FGF19 sino también con respecto a la presencia de FGFR4, pueden prepararse portaobjetos separados del mismo tejido o la misma muestra, y cada portaobjetos ensayarse con un reactivo que se una con FGF19 y/o FGFR4, respectivamente. Como alternativa, puede prepararse un único portaobjetos de la muestra tisular o celular, y pueden usarse anticuerpos dirigidos a FGF19 y FGFR4 en relación con un protocolo de tinción multicolor para permitir la visualización y detección de FGF19 y FGFR4.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de FGFR4, comprendiendo los métodos detectar FGFR4 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es expresión aumentada o expresión anómala. 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 algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o de un tumor.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para diagnosticar un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de FGFR4 y FGF19, comprendiendo los métodos detectar FGFR4 y FGF19 en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es expresión aumentada o expresión anómala. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es expresión aumentada o expresión anómala. 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 algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o de un tumor. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGFR4 en una primera muestra biológica y se detecta expresión de FGF19 en una segunda muestra biológica.

15 En otro aspecto, la divulgación 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, si la hubiera; y (b) posteriormente a la etapa (a), seleccionar el tratamiento para un individuo, en el que la selección del tratamiento se basa en la expresión de FGFR4 detectada en la etapa (a). En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGFR4 aumentada en la muestra biológica del individuo en relación con un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGFR4 reducida en la muestra biológica del individuo en relación con un valor de referencia o una muestra de control en el individuo. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGFR4 y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo anti-FGF19.

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

35 En otro aspecto, la divulgación 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) administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGF19, en el que además la expresión de FGF19 y/o FGFR4 se detecta 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 sobreexpresión de FGF19 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo anti-FGF19. En algunas realizaciones, se detecta 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.

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

50 Algunas realizaciones que implican la detección comprenden además 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 y ejemplifican en el presente documento algunos ejemplos.

55 En algunas realizaciones, el tratamiento es para un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de la hipófisis, cáncer pancreático, fibroadenoma mamario, cáncer de próstata, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, sarcoma de tejido blando, cáncer de mama, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), carcinomas epiteliales, cáncer de cerebro, cáncer endometrial, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de la vesícula biliar y carcinoma hepatocelular.

65 Se describen en el presente documento muestras biológicas, por ejemplo, en la definición de muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o de un tumor.

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

En algunas realizaciones que implican la detección de expresión de FGF19 y/o FGFR4, puede detectarse presencia y/o ausencia y/o nivel de expresión de FGF19 y/o FGFR4. La expresión de FGF19 y/o FGFR4 puede aumentarse. 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 la observada para una muestra biológica de control (o nivel de control o de referencia de expresión). 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 de inmunohistoquímica ("IHC") que puntúa al menos 2 o más para intensidad de tinción. En algunas realizaciones, se determina que la expresión del polipéptido de FGF19 en un ensayo de IHC puntúa al menos 1 o más, al menos 3 o más para 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 algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 en suero y se detecta expresión de FGFR4 en una muestra tumoral. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 y expresión de FGFR4 en una muestra tumoral. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 en suero o una muestra tumoral, y se detecta señalización molecular corriente abajo de FGFR4 y/o expresión de FGFR4 en una muestra tumoral. En algunas realizaciones, se detecta expresión de FGF19 en suero o una muestra tumoral, y se detecta activación de la ruta de Wnt en una muestra tumoral. En algunas realizaciones, se detecta la expresión de FGF19 en suero o una muestra tumoral, y se detecta señalización molecular corriente abajo de FGFR4 y/o expresión de FGFR4 y/o activación de la ruta de Wnt en una muestra tumoral.

### Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí sola o cuando se combina con otra composición u otras composiciones eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección elegida, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo. El artículo de fabricación en esta realización puede comprender además un prospecto que indica que la primera y la segunda composiciones de anticuerpos pueden usarse para tratar una afección particular, por ejemplo, cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

### Ejemplos

Los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos.

Los números de restos son de acuerdo con Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>a</sup> Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

### Injertos de región hipervariable directos en el marco conservado consenso humano aceptor

El fagémido usado para este trabajo es un vector de presentación de Fab-g3 monovalente y consiste en 2 fases abiertas de lectura bajo el control de un único promotor de *phoA*. La primera fase abierta de lectura consiste en la secuencia señal stII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena ligera aceptora y la segunda consiste en la

5 segunda señal de stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada aceptora seguida de la proteína de cubierta de fago menor P3.

Para preparar los injertos de HVR, se injertaron regiones hipervariables de anticuerpo 1A6 murino ( $\mu$ 1A6) (Figura 8; véase documento US20070673411) en los marcos conservados aceptores consenso huK1 y huL1 para generar el

10 injerto de HVR directo de 1A6 (injerto de 1A6) (Figuras 1 y 2). En el dominio VL las siguientes regiones se injertaron en el aceptor consenso humano: posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3). En el dominio VH, se injertaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 93-102 (H3). MacCallum *et al.* (MacCallum *et al.* J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) han analizado estructuras cristalinas de complejos de antígeno y de anticuerpo y han descubierto que las

15 posiciones 49, 93 y 94 de la cadena pesada son parte de la región de contacto por lo tanto parece razonable incluir estas posiciones en la definición de HVR-H2 y HVR-H3 cuando se humanizan anticuerpos. Se evaluaron clones correctos por secuenciación de ADN.

### **Maduración de afinidad**

20 Se expresó FGF19 humano en células CHO y se purificó por medios convencionales.

Para maduración de la afinidad, se generaron bibliotecas de fagos basadas en el injerto de HVR que tenían mutaciones introducidas en los bucles de HVR, por ejemplo, como se describe en Dennis, documento WO2005080432.

25 Se identificaron clones de alta afinidad mediante cinco ciclos de selección frente a proteína FGF19 humana con rigurosidad progresivamente aumentada. Brevemente, para los 2 primeros ciclos de selección, se inmovilizó FGF19 directamente en placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) a 2  $\mu$ g/ml en PBS. Ciclos sucesivos de selección usaron FGF19 biotinilado (b-FGF19) en un método de selección soluble (véase, por ejemplo, Fuh *et al.* J. Mol. Biol. (2004)).

30 FGF19 se biotiniló (b-IFGF-19) usando Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce). Se utilizaron un periodo de unión corto y concentraciones bajas de b-FGF19 para permitir la selección de clones que poseían velocidades de asociación más rápidas.

### **Producción de Fab e IgG**

35 Para expresar proteína Fab para medidas de afinidad, se introdujo un codón de terminación entre la cadena pesada y g3 en el vector de presentación en fagos. Los clones se transformaron en células *E. coli* 34B8 y se cultivaron en medio C.R.A.P. completo a 30 °C (Presta *et al.* Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Las células se recogieron por centrifugación, se suspendieron en PBS, PMSF 100  $\mu$ M, benzamidina 100  $\mu$ M, EDTA 2,5 mM y se rompieron usando un microfluidificador. Se purificó Fab con cromatografía de afinidad de Proteína G.

40

Para fines de exploración, se produjeron inicialmente variantes de IgG en células 293. Se transfectaron vectores que codificaban VL y VH (25  $\mu$ g) en células 293 usando un sistema FuGene. Se mezclaron 500  $\mu$ l de FuGENE con 4,5 ml de medio DMEM que no contenía FBS. Este se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los 25  $\mu$ g de cada cadena se añadieron a esta mezcla y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se pipeteó 1 ml de mezcla en cada matraz para transfección durante una noche a 37 °C en CO<sub>2</sub> 5 %. Al día siguiente el medio que contenía la mezcla de transfección se retiró y se reemplazó con 23 ml de medio PS04 con 0,1 ml/l de oligoelementos (A0934) y 10 mg/l de insulina (A0940). Las células se devolvieron al incubador de CO<sub>2</sub> 5 % a 37 °C

45 durante 5 días adicionales después de lo cual se recogió el medio. El medio se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y después se esterilizó por filtración usando un filtro de baja unión a proteína de 0,22  $\mu$ m. Se añadieron 2,5 ml de PMSF 0,1 M por cada 125 ml de medio como un inhibidor de proteasa y después se almacenó a 4 °C.

50

### **Determinaciones de afinidad**

55 Se realizaron determinaciones de afinidad por resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000. Se usaron dos protocolos. Se inmovilizó IgG variante 1A6 purificado directamente (aproximadamente 550 UR) en acetato sódico 10 mM pH 4,8 en una microplaca sensora CM5 y se inyectaron diluciones dobles en serie del FGF19 (0,08-1250 nM) en PBST a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Cada muestra se analizó con asociación de 4 minutos y disociación de 10 minutos. Después de cada inyección la microplaca se regeneró usando Glicina 10 mM pH 1,7. La respuesta de unión se corrigió restando las UR de una celda de flujo con un IgG irrelevante inmovilizado a densidad similar. Se usó un modelo de Langmuir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para análisis cinético.

60

También se ensayó IgG variante 1A6 no purificado a partir de sobrenadantes de cultivo usando un método de captura anti-IgG humano en el BIAcore™ 2000. Se inmovilizaron aproximadamente 2700 UR de IgG de conejo anti-humano (Pierce n.º 31143) en acetato sódico 10 mM pH 4,0 en una microplaca sensora CM5. La concentración de

65

IgG variante 1A6 no purificado se normalizó para capturar aproximadamente 200 UR de IgG de 5  $\mu$ l de sobrenadante; se capturó un IgG irrelevante en una celda de flujo de control. Se inyectó FGF19 (una dilución en serie doble, de 0,08 a 1000 nM en PBST) a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Cada muestra se analizó con asociación de 4 minutos y disociación de 10 minutos. Después de cada inyección la microplaca se regeneró usando Glicina 10 mM pH 1,7. El IgG anti-humano inmovilizado se recargó después con sobrenadante de cultivo que contenía IgG variante 1A6 no purificado para la siguiente dilución de FGF19. Se corrigió la respuesta de unión restando el control de celda de flujo de IgG irrelevante de celdas de flujo de IgG variantes 1A6. Se usó un modelo de Langmuir 1: 1 de ajuste simultáneo de  $K_{on}$  y  $K_{off}$  para análisis cinético.

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

Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorb durante una noche a 4 °C con 50  $\mu$ l de inmunoglobulina anti-humana específica de fragmento  $Fc\gamma$  (Jackson ImmunoResearch) 2  $\mu$ g/ml y se usó para capturar proteínas quiméricas FGFR-Fc 1  $\mu$ g/ml (R & D Systems). Los sitios de unión no específica se saturaron con PBS/BSA a 3 % durante 1 hora y se incubó FGF19 (0,25  $\mu$ g/ml) durante 2 h en PBS/BSA a 0,3 % en presencia de oligosacáridos (0,5  $\mu$ g/ml; Neoparin Inc.) y el anticuerpo anti-FGF19 indicado (0-10  $\mu$ g/ml). La unión de FGF19 se detectó usando un anticuerpo policlonal específico de FGF19 biotinilado (0,5  $\mu$ g/ml; BAF969; R & Systems) seguido de estreptavidina-HRP y sustrato colorimétrico TMB.

#### 20 **Fosforilación de FGFR4/MAPK**

Se trataron células HEPG2 privadas de alimento durante una noche en medio sin suero con 250 ng/ml de FGF19 durante 10 min en presencia o ausencia de anticuerpos. Las células se lisaron en tampón R27A (Upstate) con NaF 10 mM, ortovanadato sódico 1 mM, y comprimido inhibidor de proteasa completo (Roche). Se prepararon lisados, se sometieron a electroforesis y se analizaron por inmunotransferencia usando anticuerpos específicos anti-fosfo-MAPK y anti-MAPK (Cell Signaling). Para inmunoprecipitación de FGFR4, se incubaron cantidades iguales de proteínas con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-FGFR4 específico (1G7; Genentech, Inc.) inmovilizado en proteína A-Sepharose durante 2 h a 4 °C y después se lavó con tampón de lisis y se eluyó con tampón Laemmli 2x, se hirvió y se microcentrifugó. Se realizó inmunotransferencia con anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10, UpState), anticuerpo anti-fosfo-ERK2 (Santa Cruz Biotech). Se desprendieron las membranas (Pierce) y se volvieron a explorar con anticuerpos apropiados para determinar proteínas totales.

#### **Transferencia de Western para FGF19**

Se homogeneizaron tejidos de hígado en tampón RIPA modificado (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; IGEPAL 1 %; EDTA 1 mM; desoxicolato sódico 0,25 %; NaF 1 mM;  $Na_3VO_4$  1 mM; cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se clarificó por centrifugación. Se determinaron las concentraciones proteicas de los lisados usando el reactivo de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). Se incubaron cantidades iguales de proteínas con anticuerpo específico inmovilizado en proteína A-Sepharose (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 4 °C con rotación suave. Las perlas se lavaron exhaustivamente con tampón de lisis y se eluyeron inmunocomplejos en tampón Laemmli 2X, se hirvieron y se microcentrifugaron. Se resolvieron proteínas en SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos primarios específicos. Después de lavar e incubar con anticuerpos secundarios, se visualizaron proteínas inmunorreactivas por el sistema de detección de ECL (Amersham, Arlington Ht. IL). Se cargaron proteínas humanas y de cynomolgus recombinantes a una concentración de 100 ng o 200 ng.

#### **Experimento de xenoinjertos**

Se inocularon ratones hembras BALB/c atímicos de seis a ocho semanas de edad (Charles Rivers Inc.) por vía subcutánea con tumor de colon HCT116  $5 \times 10^6$  (200  $\mu$ l/ratón). Después de 7 días, se separaron aleatoriamente ratones portadores de tumores de volúmenes equivalentes ( $\sim 100$  mm<sup>3</sup>) en grupos (n=10) y se trataron por vía intraperitoneal una vez a la semana. Los tumores se midieron con un calibrador electrónico (Fowler Sylvac Ultra-Cal Mark III) y se reguló el volumen tumoral promedio usando la fórmula:  $(W_2 \times L)/2$  (W, el diámetro menor; L, el diámetro mayor).

#### **Fosforilación de FGFR4, FRS2, ERK y $\beta$ -catenina en tumores de xenoinjertos**

Se homogeneizaron tumores escindidos de animales tratados en tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, EDTA 1 mM, desoxicolato sódico 0,25 %, NaF 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, inhibidor de proteasa completa (Roche)]. Se incubaron cantidades iguales de proteínas con 1  $\mu$ g de anticuerpo específico de FGFR4 (1G7; Genentech, Inc.) o FRS2 (UpState) inmovilizado en proteína A-Sepharose durante 2 h a 4 °C y después se lavó con tampón de lisis y se eluyó con tampón de Laemmli 2x, se hirvió, y se microcentrifugó. Se realizaron inmunotransferencias con anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10, UpState), anticuerpo anti-fosfo-ERK2 (Santa Cruz Biotech) o anticuerpo anti- $\beta$ -catenina desfosforilada en el extremo N terminal (UpState). Las membranas se desprendieron (Pierce) y se volvieron a explorar con anticuerpos apropiados para determinar las proteínas

totales.

## **Resultados y análisis**

### **5 Humanización de 1A6**

El marco conservado aceptor humano usado para humanización de 1A6 consiste en el dominio VL kappa I humano consenso y el dominio VH consenso de subgrupo III humano. Los dominios VL y VH de mu1A6 se alinearon con los dominios kappa I y de subgrupo III humanos; cada HVR se identificó y se injertó en el marco conservado aceptor humano para generar un injerto de HVR 1A6 que podía presentarse como un Fab en fagos (Figuras 1 y 2).

Los fagos que expresaban el injerto 1A6 se unieron con huFGF19 inmovilizado; sin embargo, cuando se expresó el injerto de 1A6 como un IgG, el análisis de Biacore de su afinidad por FGF19 reveló que la afinidad de unión se había reducido en más de 50 veces en relación con el anticuerpo 1A6 quimérico, en gran medida debido a una reducción en la velocidad de asociación ( $K_{on}$ ) (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis de Biacore de 1A6 quimérico e injerto de 1A6

	Unión a FGF19 humano soluble		
	Ka (M/s)	Kd (s-1)	KD (pM)
1A6 quimérico	1,47E+06	5,30E-05	36
injerto de 1A6	5,93E+04	1,24E-04	2091

Se generaron bibliotecas de fagos basadas en el injerto de HVR 1A6 que tenían mutaciones introducidas en los bucles de HVR. Estas bibliotecas se seleccionaron durante 2 ciclos frente a FGF19 inmovilizado seguido de 3 ciclos adicionales de selección usando duraciones cortas para unión a concentraciones bajas de b-FGF19 soluble. Se observó enriquecimiento, definido como el número de fagos recuperados en presencia de b-FGF dividido por el número de fagos recuperados en ausencia de b-FGF después del ciclo 3. Después de 5 ciclos de selección, se seleccionaron clones para análisis de secuencia de ADN. Se observaron cambios de secuencia que se dirigen a cada uno de los HVR (Figura 3).

Se reformatearon clones seleccionados como IgG para análisis adicional por Biacore. Varios clones tuvieron afinidades mejoradas en comparación con el anticuerpo de injerto 1A6 (Tabla 3). Esos clones tuvieron cambios en la región variable de cadena ligera (S34T, S34A o Q90S) o en la región variable de cadena pesada (V34A, H35Q, V50L, A100bR o A100bP/M100cS).

Tabla 3: Análisis de Biacore de anticuerpos con afinidad madurada seleccionada

	Unión a FGF19 humano soluble		
	Ka (veces más lento)	Kd (veces más rápido)	KD (veces más débil)
1A6 quimérico	1	1	1
injerto de 1A6	24,8	2,3	58,1
hu1A6.S34T (HVR-L1)	12,0	1,2	14,0
hu1A6.S34A (HVR-L1)	7,7	1,2	9,1
hu1A6.Q90S (HVR-L3)	10,4	1,5	16,0
hu1A6.V34A (HVR-H1)	12,5	0,9	10,5
hu1A6.H35Q (HVR-H1)	5,0	1,3	6,6
hu1A6.V50L (HVR-H2)	6,3	0,9	5,7
hu1A6.A100bR (HVR-H3)	2,6	0,9	2,3
hu1A6.A100bP/M100kS (HVR-H3)	1,7	0,5	0,9

Los mejores clones tuvieron un cambio del injerto 1A6 (bien S34A o S34G) y mostraron afinidad de unión similar al anticuerpo 1A6 por FGF19 humano.

### **Eliminación de un sitio formador de ácido iso-aspartico potencial en HVR-L2 de 1A6 humanizado**

Para evitar problemas de fabricación potenciales, se eliminó un sitio formador de ácido iso-aspartico potencial (Asp-Gly) en HVR-L2 de las variantes 1A6 humanizadas convirtiendo D56 a Glu (D56E) o Ser (D56S). Ninguna sustitución tuvo un efecto en la unión con FGF19 como se determinó por Biacore. Las Tablas 4 y 5 muestran el análisis de Biacore en los anticuerpos sustituidos D56S.

Tabla 4: Análisis de Biacore de anticuerpo 1A6 quimérico y variantes 1A6 de afinidad madurada con FGF19 humano

	Unión a FGF19 humano soluble		
	Ka (M/s)	Kd (s-1)	KD (pM)
1A6 quimérico	1,70E+06	5,40E-05	32
hu1A6.S34A/D56S (HVR-L1/L2)	3,90E+05	4,60E-05	118
hu1A6.S34G/D56S (HVR-L1/L2)	1,40E+05	1,60E-05	114

45

Tabla 5: Análisis de Biacore de anticuerpo 1A6 quimérico y variantes 1A6 de afinidad madurada con FGF19 de cynomolgus

	<b>Unión a FGF19 de Cyno soluble</b>		
	<b><u>Ka (M/s)</u></b>	<b><u>Kd (s-1)</u></b>	<b><u>KD (pM)</u></b>
1A6 quimérico	7,60E+05	6,60E-05	87
hu1A6.S34A/D56S (HVR-L1/L2)	1,60E+05	7,70E-05	481
hu1A6.S34G/D56S (HVR-L1/L2)	5,30E+04	4,80E-05	906

5 Por tanto, partiendo de un injerto de los 6 HVR 1A6 murinos, la expansión de HVR-H2 para incluir la posición 49 (Glicina), la expansión de HCR-H3 para incluir las posiciones 93 (Valina) y 94 (Arginina), la adición de 1 cambio en HVR-L1 conduce a un anticuerpo 1A6, de alta afinidad, completamente humanizado, con una afinidad de unión por FGF19 humano que es similar a la del anticuerpo 1A6 murino parental. También se han identificado otras variantes de 1A6 humanizadas que son potencialmente terapéuticamente adecuadas. Además, se ha determinado que anticuerpos humanizados seleccionados descritos en el presente documento tienen al menos actividad biológica comparable con el anticuerpo 1A6 parental, por ejemplo, en ensayos de fosforilación de receptores, etc.

#### **Caracterización de un anticuerpo de la invención**

15 Se caracterizó el anticuerpo anti-FGF19 humanizado 1A6.v1 de la siguiente manera:

(1) En un ensayo para ensayar la capacidad de 1A6.v1 para bloquear la unión de FGF19 con su receptor, FGFR4, 1A6.v1 fue capaz de bloquear la unión de FGF19 con su receptor al menos tan bien como un anticuerpo comparador, concretamente un anticuerpo quimérico (que comprendía las regiones variables del anticuerpo 1A6 parental murino (dominios variables representados en la Figura 8) fusionado con una región Fc humana). Cuando se ensayó a través de un intervalo de concentración de anticuerpos de aproximadamente 1 – 67 nM, en condiciones como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos anterior, se descubrió que 1A6.v1 tenía un valor de CI50 que era similar a un anticuerpo comparador tal como el anticuerpo 1A6 quimérico. Véase Figura 9.

25 (2) 1A6.v1 también se ensayó con respecto a unión entre especies entre ser humano y primate (mono Cynomolgus). Se descubrió que 1A6.v1 se unía específicamente con receptor de FGF19 humano y de primate (mono Cynomolgus). El análisis *in situ* reveló que la expresión de FGF19 de cyno en hígado mostraba un patrón similar a la expresión de FGF19 humano en tejido de hígado. Véase Figura 10.

(3) Se ensayó 1A6.v1 con respecto a eficacia *in vitro* usando una línea celular del tumor de colon (células HCT116). Los resultados de este estudio mostraron que el anticuerpo 1A6.v1 era capaz de inhibir la fosforilación de FGFR4, FRS2 y ERK *in vitro*. Véase Figura 11.

35 (4) 1A6.v1 se ensayó con respecto a eficacia *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto tumoral basado en una línea celular de tumor de colon (células HCT116). Los resultados de este estudio de eficacia mostraron que el anticuerpo 1A6.v1 era capaz de inhibir el crecimiento de tumores *in vivo*. Además, la fosforilación de FGFR4, FRS2 y ERK se inhibió en tumores de xenoinjerto HCT116 tratados con anticuerpo anti-FGF19 1A6.v1. Véase Figura 12.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle como ilustración y ejemplo con el fin de mejorar la claridad del entendimiento, las descripciones y ejemplos no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

40

**REIVINDICACIONES**

1. Una forma humanizada de un anticuerpo anti-FGF19 murino que comprende:
  - 5 (i) una cadena ligera que comprende (a) secuencias de región hipervariable (HVR)-L1 que comprende la secuencia A1-A11, en donde A1-A11 es KASQDINSFLA (SEQ ID NO: 11); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en donde B1-B7 es RANRLVD (SEQ ID NO: 2), RANRLVS (SEQ ID NO: 13) o RANRLVE (SEQ ID NO: 14); y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en donde C1-C9 es LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 3); y
  - 10 (ii) una cadena pesada que comprende (a) la HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en donde D1-D10 es GFSLTTYGVH (SEQ ID NO: 4); (b) la HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E17, en donde E1-E17 es GVIWPGGGTDYNAAFES (SEQ ID NO: 7); y (c) la HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F13, en donde F1-F13 es VRKEYANLYAMDY (SEQ ID NO: 8); y
  - 15 (iii) una secuencia marco conservada consenso del subgrupo 1 K humano de cadena ligera y (iv) una secuencia marco conservada consenso del subgrupo III humano de cadena pesada.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que B1-B7 es RANRLVD (SEQ ID NO: 2).
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que B1-B7 es RANRLVS (SEQ ID NO: 13).
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que B1-B7 es RANRLVE (SEQ ID NO: 14).
5. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 6. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
8. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde, opcionalmente, la composición comprende un vehículo.
- 30 9. Un método para preparar un anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo dicho método (a) expresar un vector de la reivindicación 6 en una célula hospedadora adecuada y (b) recuperar el anticuerpo, en donde, opcionalmente, la célula hospedadora es procariota o eucariota.
- 35 10. Un anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de dicho anticuerpo anti-FGF19 a un individuo que necesite dicho tratamiento.
- 40 11. El anticuerpo anti-FGF19 para uso de la reivindicación 10, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer ovárico, cáncer pancreático y carcinoma hepatocelular, o en donde el trastorno proliferativo es cáncer.
- 45 12. El anticuerpo anti-FGF19 para uso de las reivindicaciones 10 u 11, que comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo medicamento, en donde el anticuerpo anti-FGF19 es un primer medicamento.
13. El anticuerpo anti-FGF19 para uso de la reivindicación 12, en donde el segundo medicamento es (i) otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente anti-angiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citocina, un antagonista de citocina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un anti-emético, una vacuna de cáncer, un analgésico o un agente inhibidor del crecimiento, o (ii) tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecán, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib o trastuzumab.
- 50 14. El anticuerpo anti-FGF19 para uso de las reivindicaciones 12 o 13, en donde el segundo medicamento se administra antes de o después de la administración del anticuerpo anti-FGF19, o se administra simultáneamente con el anticuerpo anti-FGF19.
- 55 15. Un anticuerpo anti-FGF19 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para modular una enfermedad asociada a la desregulación del eje de señalización FGF19/FGFR4, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo, en donde la enfermedad es cirrosis.
- 60



Secuencias VL

Kabat n.º 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

huKI DIQM TQSSPSSL S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A M Y Q  
 mu1A6 DIK 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  
 injerto de hu1A6 DIQM TQSSPSSL S A S V G D R V T I T C K A S Q D I N S F L S W Y Q

Kabat - CDR L1  
 Choithia - CDR L1  
 Contacto - CDR L1

Kabat n.º 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

huKI QKPGKAPKLLIY AASLLES GVPSSRFSSGSGSGTDFTLT  
 mu1A6 QKPGKSPKTLIYRANRLLVDGVPSSRFSSGSGGQDYSLLT  
 injerto de hu1A6 QKPGKAPKLLIYRANRLLVDGVPSSRFSSGSGGTDFTLLT

Kabat - CDR L2  
 Choithia - CDR L2  
 Contacto - CDR L2

Kabat n.º 75 76 77 78 79 80 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

huKI ISSLQPEDFATYYC QQYNSSLPWTFGQGTGXVEIKR  
 mu1A6 ISSLEYEEDMGIYYYC LQYDDEFPLTFPGA GTKVEIKR  
 injerto de hu1A6 ISSLQPEDFATYYC LQYDEFFPLTFGQGTGXVEIKR

Kabat - CDR L3  
 Choithia - CDR L3  
 Contacto - CDR L3

FIG. 1

Secuencias VH

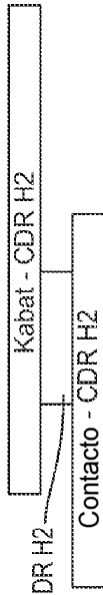
Kabat n.º 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

hum III EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYAMSWVRQAP  
 mu1A6 QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSSGFFSLTFTYGVHWVRRQS  
 injerto de hu1A6 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFSLTFTYGVHWVRRQAP



Kabat n.º 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

Choithia-CDR H2 Kabat-CDR H2  
 Contacto-CDR H2  
 hum III SVISGGGSTYYADSVKGRRFTISSRDNSKNTLYL  
 mu1A6 GKGLKGLLGVINWPGGGTQYNAAFISRLSITKIDNSKNSQVFF  
 injerto de hu1A6 GKGLKGLLGVINWPGGGTQYNAAFISRFITISRRDNSKNTLYL



Kabat n.º 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

Kabat-CDR H3  
 Choithia-CDR H3  
 Contacto-CDR H3  
 hum III QMNSLR A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S  
 mu1A6 KMNSSL L A N D T A I Y F C V R K E Y A N L Y A M D Y W G Q G T L T V S A  
 injerto de hu1A6 QMNSLR A E D T A V Y Y C V R K E Y A N L Y A M D Y W G Q G T L V T V S S

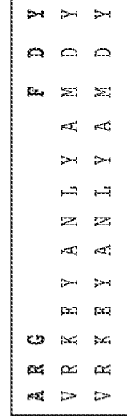


FIG. 2

L1										L2													
Seq. ID	24	26	28	30	32	34	Seq. ID	50	52	54	56												
	K	A	S	Q	D	I	N	S	F	L	S	R	A	N	R	L	V	D					
18	K	A	S	Q	D	I	N	S	F	L	S	87	R	A	N	R	L	V	E				
52	K	A	S	Q	D	I	N	S	F	L	S	88	R	A	N	R	L	V	E				
53	K	A	S	Q	D	I	N	S	F	L	S	89	R	A	N	R	L	V	E				
54	K	A	S	Q	D	I	N	S	F	L	S	90	R	A	N	R	L	V	E				
55	K	A	S	Q	D	I	N	S	F	L	S	91	K	A	N	R	L	V	E				
56	T	A	S	E	H	I	N	S	F	L	S	92	G	A	N	R	L	V	E				
57	S	V	V	Q	D	I	N	S	F	L	S	93	R	A	N	M	L	V	E				
58	Q	A	Y	Q	D	I	N	S	F	L	S	94	T	T	K	R	L	V	E				
59	Q	S	I	Q	D	I	N	S	F	L	S	95	S	A	K	R	L	V	E				
60	Q	S	R	L	D	I	N	S	F	L	S	96	S	S	A	N	G	Q	V	E			
61	N	A	N	H	N	F	D	S	F	L	S	97	S	S	A	N	R	M	M	D	E		
62	N	A	R	K	G	I	N	S	F	L	S	98	S	S	A	S	R	L	V	E			
63	N	A	R	H	N	I	Y	N	F	L	S	99	R	A	G	R	L	V	D				
64	N	A	S	Q	D	L	K	A	Y	I	A	100	R	A	K	R	L	A	N	A	E		
65	N	A	S	H	H	A	N	S	S	L	S	101	R	A	N	R	L	E	N	A	E		
66	K	A	K	Q	R	I	N	S	F	L	S	102	R	A	N	G	L	V	E				
67	K	A	K	Q	R	I	N	S	F	L	S	103	R	A	N	R	L	G	D	D	D		
68	K	A	K	E	D	I	N	S	Y	L	T	104	R	A	N	R	M	E	D	D	D		
69	K	A	Q	Q	E	I	N	S	F	M	T	105	R	A	N	R	L	E	D	D	D		
70	K	A	R	Q	D	I	N	S	F	L	T	106	R	A	N	R	V	M	E	D	D		
71	K	A	R	K	D	I	Y	K	F	V	S	107	R	A	N	R	L	E	D	D	D		
72	K	A	S	R	D	I	N	S	F	V	T	108	R	A	S	R	L	E	G				
73	K	A	S	Q	D	I	I	S	F	L	S	109	R	A	Y	R	I	E	D				
74	K	A	S	Q	D	V	I	R	F	M	T	110	R	A	Y	Y	L	V	D				
75	K	A	S	K	D	I	D	S	F	L	T	111	R	G	K	H	I	E	D				
76	K	A	S	K	Y	I	K	S	F	M	T	112	R	G	N	R	L	E	N	G			
77	K	A	S	H	D	I	N	S	F	M	T	113	R	G	N	R	L	E	N	G			
78	K	A	S	H	D	K	N	S	F	L	S	114	R	G	S	R	L	E	N	G			
79	K	A	S	H	D	S	N	S	F	M	G	115	R	R	S	R	L	E	N	G			
80	K	A	S	H	G	M	N	S	F	L	S	116	R	T	N	R	L	R	E	N	G		
81	K	A	S	E	N	I	N	Y	F	L	S	117	Q	A	E	R	Q	P	E				
82	K	A	S	E	N	I	N	Y	F	L	T	118	Q	G	N	R	L	V	D				
83	K	L	I	S	D	I	N	S	L	M	S	119	Q	H	A	I	R	H	R	D			
84	K	P	R	R	D	I	N	K	F	L	S	120	H	A	N	R	L	E	D				
85	K	P	S	Q	D	I	N	S	F	L	T	121	H	A	N	R	Q	R	D				
86	K	S	N	L	D	I	Y	R	F	L	G	122	H	A	S	R	L	V	D				
												123	H	G	N	R	L	V	D				
												124	H	S	N	R	L	E	D				
												125	H	S	N	L	L	V	N	A			
												126	H	S	N	R	L	E	R	A			
												127	G	A	K	R	L	R	D				

FIG. 3A

L3								H1							
Seq. ID	89	91	93	95	97	Seq. ID	26	28	30	32	34				
	L	Q*	Y	D	E	F	P	L	T	T	Y	G	V*	H*	
128	L	S	Y	D	E	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
129	L	Q	Y	D	G	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
130	L	Q	Y	D	K	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
131	L	Q	Y	D	T	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
132	L	Q	Y	S	E	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
133	L	Q	Y	D	E	M	P	L	T	T	Y	G	V	H	
134	L	Q	Y	D	E	F	P	L	S	T	Y	G	V	H	
135	L	T	Y	D	N	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
136	M	T	Y	D	N	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
137	L	S	Y	D	E	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
138	L	S	Y	D	D	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
139	L	Q	Y	A	V	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
140	M	Q	Y	A	D	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
141	L	Q	Y	D	G	F	P	L	I	T	Y	G	V	H	
142	L	Q	Y	D	V	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
143	Q	Q	Y	D	E	F	P	L	T	T	Y	G	V	H	
144	L	Q	Y	D	V	F	P	L	I	V	Y	G	V	H	
145	L	Q	Y	G	V	F	P	L	L	S	Y	G	V	H	
146	M	Q	Y	G	Y	F	P	L	L	S	Y	G	V	H	
147	M	Q	Y	H	A	F	A	L	L	T	Y	G	V	H	
148	M	N	Y	D	V	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	
149	L	N	Y	Y	E	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	
150	L	K	D	D	E	M	P	L	L	T	Y	G	V	H	
151	L	H	Y	G	E	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	
152	M	E	F	N	D	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	
153	M	D	Y	D	I	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	
154	M	D	Y	V	E	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	
155	L	A	Y	A	D	F	P	L	L	T	Y	G	V	H	

FIG. 3B

H2

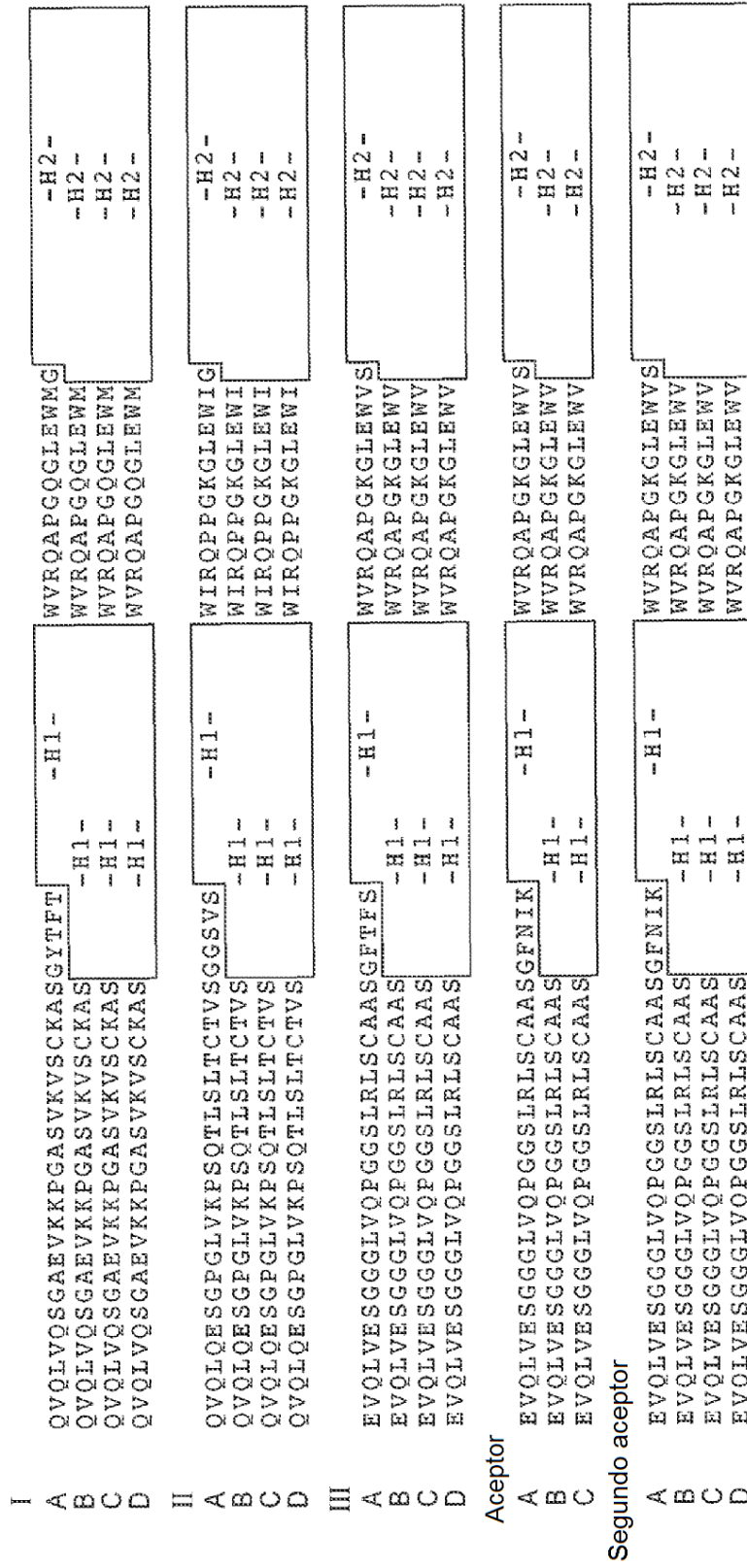
Seq. ID	49	51	53	55	56	57	58	60	62	63	65						
	G	V	I	W	P	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	I	S
177	G	V	I	W	P	G	G	G	T	D	Y	N	A	R	F	I	S
178	G	V	I	W	P	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	I	S
179	G	V	I	W	P	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	T	S
180	G	I	I	W	P	G	G	G	I	D	Y	N	A	A	F	I	S
181	G	I	I	W	P	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	E	T
182	G	I	I	W	P	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	I	S
183	G	L	S	W	P	G	G	G	I	D	Y	N	A	L	F	N	R
184	G	L	I	W	P	G	G	G	I	D	Y	N	A	A	F	L	N
185	G	L	I	W	P	G	G	G	I	D	Y	N	A	A	F	I	S
186	G	L	M	W	P	G	G	G	I	D	S	N	E	A	F	I	G
187	G	L	I	W	P	G	G	G	A	I	D	S	N	K	G	F	I
188	G	L	I	W	P	G	G	G	G	I	D	Y	N	S	A	F	I
189	G	L	I	W	P	G	G	G	G	L	D	Y	N	G	A	F	I
190	G	L	S	W	P	A	G	G	G	S	D	Y	N	A	F	L	S
191	G	L	V	W	P	G	G	G	G	S	D	F	N	A	A	F	S
192	G	L	I	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	S
193	G	L	M	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	V
194	G	L	V	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	A	A	F	I
195	G	L	L	W	P	G	G	G	G	T	D	L	N	A	A	F	I
196	G	L	I	W	P	G	G	G	G	T	D	L	N	A	A	F	I
197	G	L	F	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	E	A	F	L
198	G	L	I	W	P	G	G	G	G	T	D	V	N	K	A	L	I
199	G	L	V	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	S	P	E	F
200	G	L	L	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	S	D	V	L
201	G	L	I	W	P	G	G	G	G	T	D	L	N	T	A	F	I
202	G	L	I	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	T	T	L	S
203	G	L	V	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	T	A	L	N
204	G	M	I	W	P	G	G	G	G	I	D	Y	N	A	G	L	I
205	G	M	Y	W	P	G	G	G	G	I	E	F	N	A	A	F	I
206	G	M	I	W	P	G	G	G	T	S	E	F	N	S	E	F	I
207	G	M	I	W	P	G	G	G	G	T	D	L	N	E	A	F	M
208	G	M	M	W	P	G	G	G	G	T	E	Y	N	G	A	S	N
209	G	M	I	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	K	T	S	L
210	G	M	I	W	P	G	G	G	G	T	D	Y	N	T	A	F	I
211	G	M	L	W	P	G	G	G	S	V	I	D	Y	N	A	A	F
212	G	V	I	W	P	G	G	G	S	Y	I	D	Y	N	A	G	F
213	G	V	I	W	P	G	G	G	R	I	D	Y	N	E	G	F	I
214	G	V	F	W	P	G	G	G	G	I	D	Y	N	P	S	F	I
215	G	V	I	W	P	G	G	G	G	I	D	Y	N	T	A	F	I
216	G	V	Y	W	P	G	G	G	G	S	D	W	A	E	K	F	A
217	G	V	V	W	P	G	G	G	S	S	D	F	K	K	E	F	A
218	G	V	I	W	P	G	G	G	G	S	D	F	T	S	R	F	H
219	G	V	I	W	P	G	G	G	G	S	D	Y	N	T	A	F	H
220	G	V	I	W	P	G	G	G	G	S	D	Y	N	K	T	E	F
221	G	V	I	W	P	G	G	G	R	I	D	L	N	A	A	F	I
222	S	V	T	W	P	G	G	G	S	T	D	F	N	P	A	F	L
223	S	V	T	W	P	G	G	G	G	T	N	F	N	P	A	F	D
224	G	V	I	W	P	G	G	G	A	T	A	Y	N	S	D	V	I
225	G	V	I	W	P	G	G	G	G	T	N	F	S	S	A	L	S
226	G	V	I	W	P	G	G	G	G	T	D	I	N	T	A	L	N
227	G	V	V	W	P	G	G	G	G	T	D	W	T	T	A	V	S
228	G	V	I	W	P	G	G	G	G	T	H	Y	N	T	A	F	F
229	G	V	I	W	P	G	G	G	S	Y	D	W	N	G	A	F	N

FIG. 3C

**H3**

Seq. ID	93	95	97	99	100	100a	100b	100c	101	
	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	
230	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
231	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
232	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
233	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
234	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
235	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
236	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
237	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
238	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
239	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
240	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
241	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
242	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
243	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
244	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
245	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
246	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
247	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
248	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
249	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
250	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
251	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
252	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
253	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
254	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
255	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
256	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
257	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
258	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
259	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y
260	V	R	K	E	Y	A	N	L	Y	Y

**FIG. 3D**



I	A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 19
	B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 20
	C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 21
	D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 22
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 23
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 24
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 25
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 26
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 27
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 28
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 29
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 30
	Aceptor				
	A	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 31
	B	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 32
	C	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 33
	Segundo aceptor				
	A	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 34
	B	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 35
	C	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 36
	D	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 37

FIG. 4B



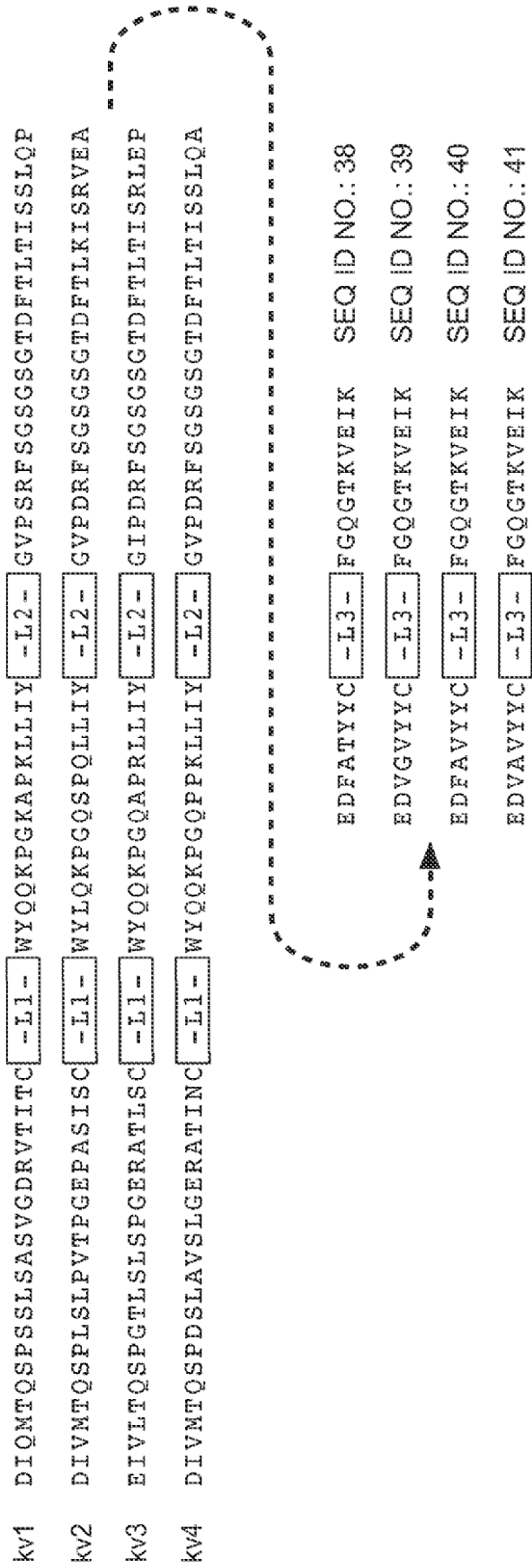


FIG. 5

Secuencias de marco conservado de cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup>  
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup>  
(SEQ ID NO: 44)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO: 45)

Secuencias de marco conservado de cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup>  
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup>  
(SEQ ID NO: 48)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEQ ID NO: 49)

**FIG. 6**Secuencias de marco conservado de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 (subrayada)

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup>  
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup>  
(SEQ ID NO: 50)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO: 45)

Secuencias de marco conservado de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

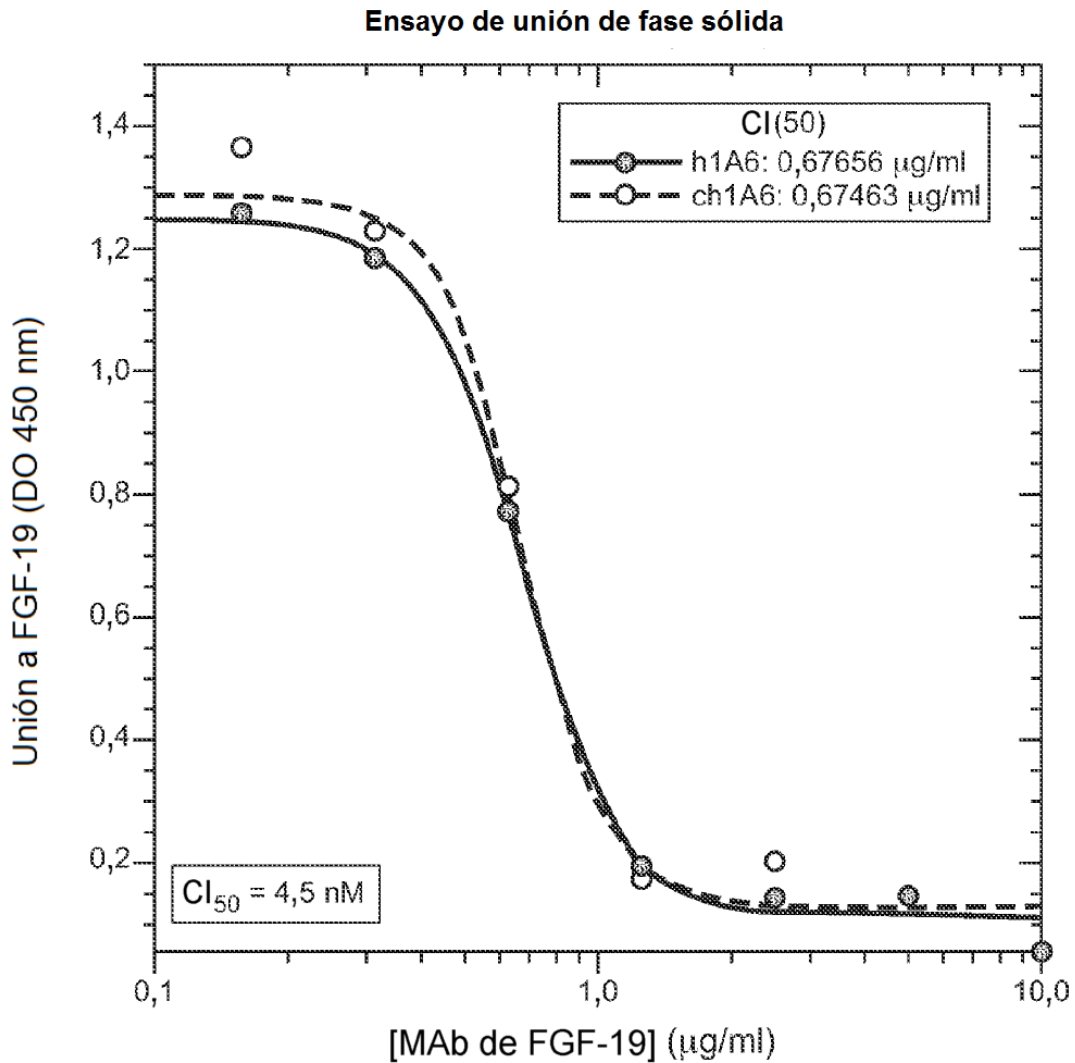
- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup>  
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
Cys<sup>92</sup> (SEQ ID NO: 51)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEQ ID NO: 49)

**FIG. 7**

VH  
 QVQLKQSGPGLVQPSSQSLSTCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWPGGGTDYNAAFI  
 SRLSITKDNSKSQVFFKMNSLLANDTAIYFCVRKEYANLYAMDYWGQGTLLTVSA  
 (SEQ ID NO:16)

VL  
 DIKMTQSPSSMYASLGERTVTPCKASQDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSG  
 SGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKVEIKR  
 (SEQ ID NO:17)

**FIG. 8**



**FIG. 9**

