

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 786**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2012 PCT/IB2012/057227**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2012 E 12816137 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2793928**

54 Título: **Procedimiento de purificación de una muestra de anticuerpo H38C2**

30 Prioridad:

**22.12.2011 US 201161579609 P**  
**09.05.2012 US 201261644831 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.07.2017**

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (50.0%)**  
**235 East 42nd Street**  
**New York, NY 10017, US y**  
**COVX TECHNOLOGIES IRELAND LIMITED**  
**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANNATHUR, GOPINATH VEDACHALAM;**  
**BALU, PALANI;**  
**FINN, RORY FRANCIS;**  
**HUANG, JIE;**  
**LAURENT, OLIVIER ALEXANDRE;**  
**LEVIN, NANCY JANE;**  
**LUKSHA, NICHOLAS GARY;**  
**MARTIN, JOSEPH PATRICK JR.;**  
**MOSKOWITZ, HAIM;**  
**PALANKI, MOORTHY SITHARAMAIAH**  
**SURIYANARAYANA;**  
**POZZO, MARK JOHN;**  
**WASZAK, GREGORY ALLAN y**  
**XIE, JIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 623 786 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

Procedimiento de purificación de una muestra de anticuerpo H38C2

La presente divulgación se refiere a nuevos compuestos que potencian la secreción de insulina y niveles inferiores de glucemia, y a procedimientos de fabricación y uso de estos compuestos.

5 **Antecedentes**

La diabetes de tipo II es la forma más frecuente de diabetes. La enfermedad está causada por la resistencia a la insulina y la insuficiencia de las células  $\beta$  pancreáticas, que da lugar a una reducción de la secreción de insulina estimulada por la glucosa. El factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) 21, un miembro de la familia de FGF, se ha identificado como un regulador metabólico y se expresa preferentemente en el hígado y en el tejido adiposo, y ejerce sus actividades biológicas a través de un complejo de receptor de superficie celular compuesto de FGFR1c y  $\beta$ -Klotho sobre células diana tales como tejidos hepáticos y adiposos (documento WO0136640 y documento WO0118172). Se cree que el complejo de receptor desencadena señalización citoplasmática y regula positivamente la expresión de GLUT1 a través de la vía de Ras/MAP quinasa. Su capacidad para proporcionar un control sostenido de glucosa y lípidos, y potenciar la sensibilidad a la insulina y la función de las células  $\beta$ , sin causar efectos adversos aparentes en entornos preclínicos, han hecho del FGF21 un atractivo agente terapéutico para la diabetes de tipo 2 y los trastornos metabólicos asociados.

Ha habido una serie de esfuerzos hacia el desarrollo de terapias basadas en FGF21. Los documentos WO2006065582, WO2006028714, WO2006028595 y WO2005061712 se refieren a muteínas de FGF21, que comprenden sustituciones individuales de aminoácidos. El documento WO2006078463 se dirige a un procedimiento de tratamiento de enfermedades cardiovasculares usando FGF21. El documento WO2005072769 se refiere a procedimientos de tratamiento de la diabetes usando combinaciones de FGF21 y tiazolidindiona. El documento WO03059270 se refiere a procedimientos de reducción de la mortalidad de pacientes críticamente enfermos que comprenden la administración de FGF21. El documento WO03011213 se refiere a un procedimiento de tratamiento de la diabetes y la obesidad que comprende administrar FGF21.

Sin embargo, muchas de estas terapias propuestas tienen el problema de que FGF21 tiene una semivida *in vivo* de entre 1,5 y 2 horas en seres humanos. Se han hecho algunos intentos para superar este inconveniente. Los documentos WO2005091944, WO2006050247 y WO2008121563 desvelan moléculas de FGF21 unidas a PEG a través de restos de lisina o cisteína, grupos glicosilo y restos de aminoácidos no naturales, respectivamente. El documento WO2005113606 describe moléculas de FGF21 fusionadas de forma recombinante a través de su extremo C-terminal a albúmina y moléculas de inmunoglobulina usando engarces de poliglicina.

Sin embargo, el desarrollo de conjugados de proteínas en productos farmacéuticos útiles y rentables presenta una serie de desafíos significativos y muchas veces competitivos: debe establecerse un equilibrio entre la eficacia *in vivo*, la semivida *in vivo*, la estabilidad para el almacenamiento *in vitro*, y la facilidad y eficacia de fabricación, incluyendo la eficacia y la especificidad de la conjugación. En general, es imperativo que el procedimiento de conjugación no elimine ni reduzca significativamente la acción biológica deseada de la proteína en cuestión. Las interacciones proteína-proteína requeridas para la función pueden requerir que múltiples regiones de la proteína actúen en concierto, y perturbar cualquiera de ellas con la presencia cercana de un conjugado puede interferir en el sitio o los sitios activos, o causar suficientes alteraciones en la estructura terciaria como para reducir la función del sitio activo. A menos que la conjugación sea a través del extremo N' o C', pueden ser necesarias mutaciones internas para facilitar el enlace. Estas mutaciones pueden tener efectos imprevisibles sobre la estructura y función de las proteínas. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de terapias alternativas basadas en FGF21.

Las incretinas, que son compuestos que estimulan la secreción de insulina dependiente de la glucosa e inhiben la secreción de glucagón, han surgido como atractivos candidatos para el tratamiento de la diabetes de tipo II. El péptido del tipo glucagón (7-36) amida (GLP1) es uno de los miembros de la familia de las incretinas, y se ha demostrado que aumenta la secreción de insulina, reduce la secreción de glucagón, estimula la transcripción del gen pro-insulina, ralentiza el tiempo de vaciado gástrico y reduce la ingesta de alimentos (documento WO98019698). GLP1 ejerce sus efectos fisiológicos uniéndose al receptor de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1R), un receptor putativo de siete dominios transmembrana.

Un inconveniente del uso terapéutico de GLP1 es su corta semivida *in vivo* (1-2 min). Esta corta semivida es el resultado de una rápida degradación del péptido por la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-IV). Esto ha conducido a la identificación de homólogos de GLP1 que presentan mayores semividas a la vez que mantienen la capacidad de agonizar la actividad de GLP1R. Los ejemplos de estos homólogos incluyen la exendina4 y GLP1-Gly8.

El documento WO2009020802 desvela un procedimiento de reducción del peso corporal que comprende administrar un compuesto de FGF21 en combinación con un compuesto de GLP1.

La referencia a cualquier técnica en la presente memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento de cualquier forma o sugerencia de que la técnica a la que se hace referencia forme parte del conocimiento general común.

**Sumario de la invención**

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición de fórmula:

**[FGF21-primer engarce]-[Ab]-[segundo engarce-Ex4];**

en la que

- 5 FGF21 es un homólogo de FGF21;  
y Ex4 es un homólogo de Exendina4; y  
Ab es un anticuerpo catalítico de aldolasa o una parte de unión al antígeno del mismo; y  
el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y a  
un sitio de combinación del anticuerpo; y  
10 el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos en Ex4 y a un  
sitio de combinación del anticuerpo; y en la que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes; o sus  
estereoisómeros, tautómeros, solvatos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables.

- En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende una molécula de FGF21  
unida covalentemente a un primer sitio de combinación de un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo a  
15 través de un primer engarce, en la que el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto  
de unión a proteínas dentro de FGF21, y que comprende además un homólogo de Exendina4 unido covalentemente  
a un segundo sitio de combinación del anticuerpo a través de un segundo engarce, en la que el segundo engarce  
está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos dentro del homólogo de Exendina4; o  
sus estereoisómeros, tautómeros, solvatos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 En algunos aspectos, la divulgación comprende la fórmula: [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo  
engarce]-[Ex4], en la que FGF21 es un homólogo de FGF21, y puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ  
ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24; y Ex4 es un homólogo de  
Exendina4, y puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,  
25 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72, y el anticuerpo es un  
anticuerpo catalítico de aldolasa o parte de unión al antígeno del mismo; y el primer engarce está unido  
covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del  
anticuerpo, y el segundo engarce 2 está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos  
en Ex4 y al sitio de combinación del anticuerpo, y en la que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes.  
El primer y segundo engarce se puede seleccionar cada uno independientemente del grupo que consiste en L1, L2,  
30 L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9 y L10.

- El resto de unión a proteínas puede ser cisteína o lisina. El resto de unión a proteínas puede estar situado en una  
posición seleccionada del grupo que consiste en los restos de aminoácidos números 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 y  
129, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1. El resto de unión a proteínas puede estar situado en una  
posición seleccionada del grupo que consiste en los restos de aminoácido números 56, 59, 86 y 122 de acuerdo con  
35 la numeración de SEQ ID NO: 1. El resto de unión a proteínas puede estar situado en una posición seleccionada del  
grupo que consiste en el resto 79, 125 y 129 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1. El resto de unión a  
proteínas puede estar situado en una posición seleccionada del grupo que consiste en los restos 125 y 129 de  
acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1.

- La cadena lateral del resto de unión a proteínas puede comprender un grupo tiol. El resto de unión a proteínas  
40 puede ser cisteína.

La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 3. La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 4.  
La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3,  
SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID  
NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

- 45 El resto de unión a proteínas puede estar situado en la posición 125 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO:  
1. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste SEQ ID NO: 3,  
SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de FGF21 es  
SEQ ID NO: 7.

- El resto de unión a proteínas puede estar situado en la posición 129 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO:  
50 1. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste SEQ ID NO: 3,  
SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la secuencia de FGF21 es  
SEQ ID NO: 10. La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

- El resto de unión a proteínas puede estar situado en la posición 79 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1.  
La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste SEQ ID NO: 3, SEQ  
55 ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la secuencia de FGF21 es  
SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el resto de enlace de proteína puede estar situado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 1, 2, 56, 59, 69 y 122 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto de unión a proteínas puede estar situado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 1, 2, 56, 59 y 122 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1. El resto de unión a proteínas puede ser lisina. La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 17. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 23.

En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 puede comprender la fórmula:



en la que  $x^2$  es Aib, y  $x^{40}$  es un resto de unión a péptidos que comprende cualquier aminoácido o está ausente, y en la que uno de L<sup>10</sup>, S<sup>11</sup>, K<sup>12</sup>, Q<sup>13</sup>, M<sup>14</sup>, E<sup>16</sup>, E<sup>17</sup>, V<sup>19</sup>, R<sup>20</sup>, L<sup>21</sup>, E<sup>24</sup>, L<sup>26</sup>, K<sup>27</sup>, N<sup>28</sup>, S<sup>32</sup>, S<sup>33</sup>, G<sup>34</sup>, A<sup>35</sup>, P<sup>36</sup>, P<sup>37</sup>, P<sup>38</sup>, S<sup>39</sup> o X<sup>40</sup> comprende o está sustituido con un resto de unión a péptidos [LR], de manera que el resto de unión a péptidos comprende una cadena terminal nucleófila o un grupo carboxilo del extremo C-terminal unido covalentemente al segundo sitio de combinación del anticuerpo a través del segundo engarce, y donde es enlazable a través de la cadena lateral nucleófila, seleccionándose el resto de unión a péptidos del grupo que consiste en K, K(SH), K(S-MAL), R, Y, C, T, S, homocisteína, homoserina, Dap y Dab.

El resto de unión a péptidos puede estar situado en una posición seleccionada del grupo que consiste en los restos de aminoácidos números 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 39 y 40, de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos está situado en una de las posiciones de 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 24, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos está situado en una de las posiciones 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 24 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 28. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54.

En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos está situado en una de las posiciones 12, 14, 17, 19, 20 o 21, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 55.

En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos está situado en una de las posiciones 12, 14, 19, 20, 21 o 40, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 38.

El homólogo de Exendina4 puede comprender SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, y SEQ ID NO: 72.

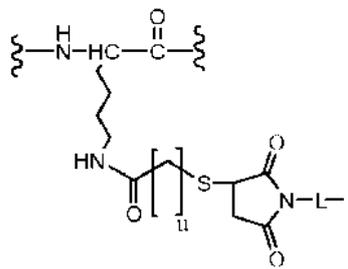
El homólogo de Exendina4 puede comprender SEQ ID NO: 60 cuando  $x^{40}$  está ausente. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70.

En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos está situado en una de las posiciones 14, 19, 20 o 21, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70.

En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos puede estar situado en la posición 14, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 77. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende SEQ ID NO: 53. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende SEQ ID NO: 63. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende SEQ ID NO: 64. En algunas realizaciones, el homólogo de Exendina4 comprende SEQ ID NO: 77.

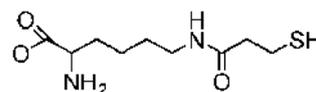
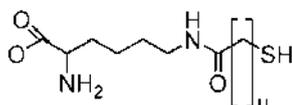
El resto de unión a péptidos puede comprender una cadena lateral nucleófila unida covalentemente al segundo engarce. El resto de unión a péptidos puede seleccionarse del grupo que consiste en K, Y, C, Dap, Dab, K(SH) y K(S-MAL). La cadena lateral del resto de unión a péptidos puede comprender un grupo tiol.

El resto de unión a péptidos [LR] puede comprender la estructura: K(S-MAL)



5 en la que u es 1, 2 o 3, y L es el segundo engarce. En algunas realizaciones u es 1. En algunas realizaciones, u es 2. En algunas realizaciones, u es 3. A menos que se indique lo contrario, cuando se usa K(SMAL) en los ejemplos, u = 2.

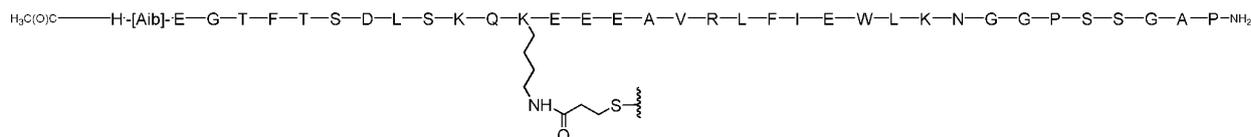
En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos comprende la estructura K(SH), en la que u es 1, 2 o 3; donde u = 2, K(SH)=



A menos que se indique lo contrario, cuando se usa K(SH) en los ejemplos y en el listado de secuencias, u = 2.

10 En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 comprende además un grupo de protección amino-terminal  $\text{R}^1$  seleccionado del grupo que consiste en  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C(O)CH}_3$ ,  $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  o  $\text{C(O)CH(CH}_3\text{)CH}_3$ . En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 comprende además un grupo de protección carboxi-terminal  $\text{R}^2$  seleccionado del grupo que consiste en  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH(CH}_3\text{)}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{NHCH(CH}_3\text{)CH}_3$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{NHCH(CH}_3\text{)CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{NHC}_6\text{H}_5$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $\text{NHOCH}_3$ ,  $\text{NHOCH}_2\text{CH}_3$ , un grupo protector carboxi, un grupo de ácido graso lipídico o un hidrato de carbono. En algunas realizaciones,  $\text{R}^1$  es  $\text{C(O)CH}_3$ .  
15 En algunas realizaciones,  $\text{R}^2$  es  $\text{NH}_2$ . En algunas realizaciones en las que el péptido Ex4 comprende SEQ ID NO: 64 y  $\text{R}^1$  es  $\text{C(O)CH}_3$  y  $\text{R}^2$  es  $\text{NH}_2$ , el péptido Ex4 se puede indicar como SEQ ID NO: 77.

En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 comprende la fórmula:



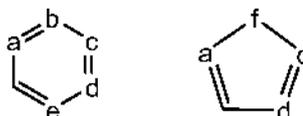
20 Tanto el primer como el segundo engarce desempeñan cada uno un papel crítico en la presentación de la proteína y del péptido respectivamente. Es esencial que la composición y la longitud del engarce se optimicen tanto para la proteína como para el péptido con el fin de maximizar la capacidad de cada uno para interactuar con su respectivo afín. Una complicación adicional con una molécula bifuncional asimétrica (es decir, aquella que presente una proteína/un péptido diferente en cada uno de los dos brazos) es la importancia de que la disposición o funcionalidad del engarce-péptido de un brazo no interfiera con la disposición ni funcionalidad del engarce-proteína del otro brazo, y viceversa. En algunas realizaciones, una longitud de engarce más larga tiene una tendencia a reducir la interferencia entre los diferentes brazos. En contra de esto, sin embargo, está la tendencia de que los engarces más largos ofrezcan menos protección contra las proteasas. Además, en algunas circunstancias, un engarce corto puede permitir que un péptido o una proteína se presente óptimamente para la interacción afín, el aumento de la longitud del engarce puede aumentar la flexibilidad, y por tanto, perder esta ventaja. Por el contrario, algunas interacciones de proteínas o péptidos con la respectiva diana se mejoran mediante cierta cantidad de flexibilidad en el engarce. Por lo tanto, la determinación de la longitud óptima del engarce y la composición para cada proteína/péptido activo, y el equilibrio de cada uno de manera holística a través de toda la molécula ensamblada es fundamental con el fin de encontrar el equilibrio correcto entre la semivida y la actividad tanto de la proteína como del péptido. Todo esto se debe compensar entonces con el coste de fabricación adicional y la complejidad inherente de tener un engarce diferente para cada proteína/péptido. El uso del mismo engarce para cada molécula activa tiene un coste y eficiencias de fabricación evidentes.  
35

Ciertos engarces adecuados se desvelan en el documento US2009098130. En particular, en el presente documento, se incluyen aspectos del documento US2009098130 relativos a las fórmulas generales que describen los engarces,

la estructura específica del engarce, la síntesis de los engarces y las combinaciones de diferentes elementos de los grupos X, Y (que también se puede escribir como yy) y Z, como se describe de manera específica y general en el dicho documento. El primer y/o segundo engarce puede ser lineal o ramificado y, opcionalmente, incluye uno o más grupos carbocíclicos o heterocíclicos. La longitud del engarce se puede ver en términos del número de átomos lineales, con fracciones cíclicas tales como anillos aromáticos y similares que se cuentan tomando la ruta más corta alrededor del anillo. En algunas realizaciones, el primer y/o segundo engarce tiene un tramo lineal de entre 5-15 átomos, en otras realizaciones de 15-30 átomos, en otras realizaciones más de 30-50 átomos, en otras realizaciones más de 50-100 átomos, y en otras realizaciones más de 100-200 átomos. Otras consideraciones de los engarces incluyen el efecto sobre las propiedades físicas o farmacocinéticas del compuesto resultante, tales como solubilidad, lipofilicidad, hidrofiliicidad, hidrofobicidad, estabilidad (más o menos estable, así como la degradación planificada), rigidez, flexibilidad, inmunogenicidad y modulación de la unión del anticuerpo, la capacidad de incorporarse en una micela o liposoma, y similares.

El primer y/o segundo engarce puede comprender la fórmula: X-Y-Z; en la que X es una cadena de unión biológicamente compatible que incluye cualquier átomo seleccionado del grupo que consiste en C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, y puede comprender un polímero o copolímero de bloques, y está unido de manera covalente al resto de unión a proteínas y/o resto de unión a péptidos donde el engarce es lineal, Y es un grupo de reconocimiento opcionalmente presente que comprende al menos una estructura de anillo; y Z es una fracción de unión que comprende un enlace covalente con una cadena lateral de aminoácidos en un sitio de combinación de un anticuerpo.

Cuando está presente, Y puede tener la estructura opcionalmente sustituida:

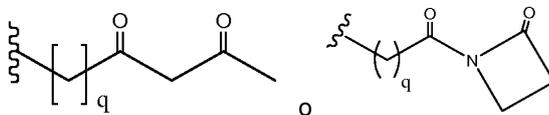


en la que a, b, c, d y e son independientemente carbono o nitrógeno; f es carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre; Y está unido a X y Z independientemente en dos posiciones cualquiera de anillo de suficiente valencia; y no más de cuatro de a, b, c, d, e o f son simultáneamente nitrógeno y, preferentemente, a, b, c, d y e en la estructura de anillo son cada uno carbono. En algunos aspectos, Y puede ser fenilo. Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, se cree que el grupo Y puede ayudar a posicionar el grupo reactivo en un sitio de combinación de anticuerpo, de modo que el grupo Z pueda reaccionar con una cadena lateral reactiva de aminoácidos.

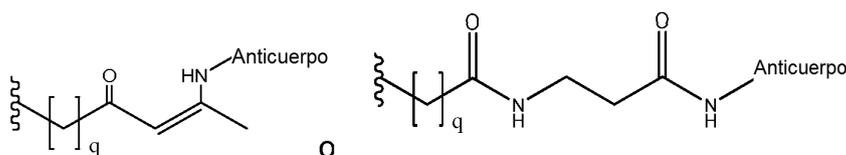
El primer y/o segundo engarce puede estar diseñado de manera que contenga un grupo reactivo capaz de formar covalente o no covalentemente un enlace con una macromolécula, tal como un anticuerpo, una proteína o un fragmento del mismo. El grupo reactivo se selecciona para su uso con un resto reactivo en un determinado sitio de combinación. Por ejemplo, una fracción química para la modificación por un anticuerpo de aldolasa puede ser una cetona, dicetona, beta-lactama, éster activo, halocetona, lactona, anhídrido, maleimida, alfa-haloacetamida, ciclohexildicetona, epóxido, aldehído, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, dicetona enmascarada o protegida (cetal, por ejemplo), lactama, halocetona, aldehído y similares. En realizaciones de la presente divulgación que enlazan un péptido con un engarce, Z es el grupo reactivo.

En algunas realizaciones, Z, antes de la conjugación con la cadena lateral de un resto en el sitio de combinación de un anticuerpo, incluye uno o más grupos C=O dispuestos para formar una azitidinona, dicetona, acil beta-lactama, un éster activo, una halocetona, un grupo ciclohexildicetona, un aldehído, una maleimida, un alqueno activado, un alquino activado o, en general, una molécula que comprende un grupo saliente susceptible de desplazamiento nucleófilo o electrófilo. Otros grupos pueden incluir una lactona, un anhídrido, una alfa-haloacetamida, una imina, una hidrazida o un epóxido. Los ejemplos de grupos reactivos electrófilos de engarce que pueden unirse covalentemente a un grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, una cadena lateral de lisina o cisteína) en un sitio de combinación de anticuerpo incluyen acil beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con engarce, halocetona, ciclohexildicetona, aldehído, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, una dicetona enmascarada o protegida (un cetal, por ejemplo), lactama, sulfonato y similares, grupos C=O enmascarados tales como iminas, cetales, acetales y cualquier otro grupo electrófilo conocido. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo incluye uno o más grupos C=O dispuestos para formar una acil beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con engarce, halocetona, ciclohexildicetona o aldehído. Z puede ser un alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heterociclo sustituido o heterocicloalquilo sustituido, en el que al menos un sustituyente es una fracción 1,3-dicetona, acil beta-lactama, un éster activo, una alfa-halocetona, un aldehído, una maleimida, una lactona, un anhídrido, una alfa-haloacetamida, una amina, una hidrazida o un epóxido. En algunos aspectos, el grupo Z está unido covalentemente a un armazón macromolecular que puede proporcionar una mayor semivida a los péptidos. En algunos aspectos, el grupo Z, si está presente, está unido covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo.

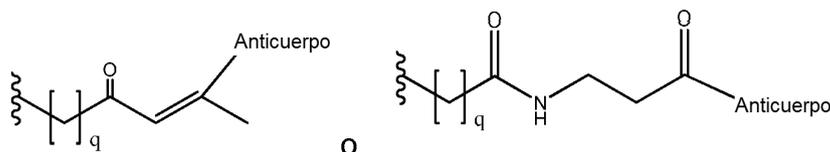
En algunos aspectos, antes de la conjugación (por ejemplo, con el sitio de combinación de un anticuerpo), Z tiene la estructura:



5 En la que  $q = 0-5$ .  $q$  puede ser 1 o 2.  $q$  puede ser 1. En otros aspectos,  $q$  puede ser 2. En algunos aspectos, después de la conjugación con el sitio de combinación de anticuerpos, Z tiene la estructura:

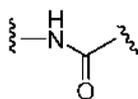


o

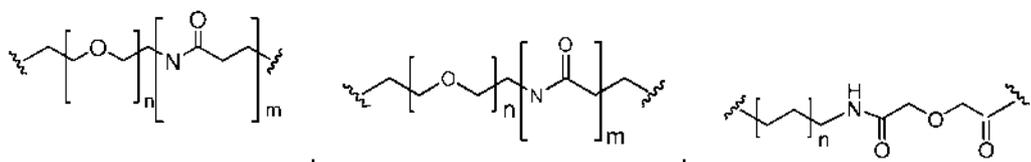


en la que  $q = 0-5$  y Anticuerpo-N- es un enlace covalente a una cadena lateral en un sitio de combinación de un anticuerpo (en el que el NH es el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina, la cadena lateral del sitio de combinación de anticuerpos).  $q$  puede ser 1 o 2.  $q$  puede ser 1. En otros aspectos,  $q$  puede ser 2.

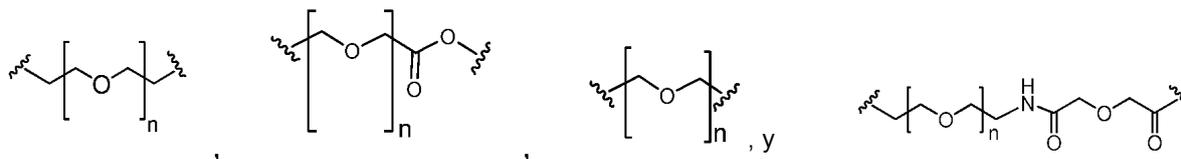
10 X puede ser un grupo que comprende tres componentes;  $X_p$ - $X_s$ - $X_y$ , en el que  $X_p$  es un grupo adaptado específicamente para ser combinable con la cadena lateral del resto de unión a proteínas de la proteína FGF21 y/o del resto de unión a péptidos de un homólogo de Exendina4,  $X_s$  es una región espaciadora del grupo X, y  $X_y$  es un grupo adaptado a unirse al grupo Y. En algunos aspectos,  $X_y$  se selecciona entre un enlace amida, un enlace enamina o un enlace guanidinio.  $X_y$  se puede seleccionar de manera que proporcione una molécula de hidrógeno adyacente (dentro de dos átomos) al grupo Y. Aunque no se desea quedar limitado por la teoría, se cree que el átomo de H puede ayudar al reconocimiento del grupo Y de un bolsillo hidrófobo a través de la interacción del enlace H, en particular, con respecto al bolsillo hidrófobo de la hendidura de unión de un anticuerpo catalítico, tal como h38C2. Así pues, el enlace de amida, por ejemplo, puede estar orientado de manera que el grupo NH esté unido directamente al grupo Y, proporcionando el H del grupo NH para la unión de hidrógeno. Como alternativa, el grupo C=O de una amida puede estar unido al grupo Y, con el H del grupo NH con 2 átomos adyacentes al grupo Y, pero todavía está disponible para la unión de H. En algunas realizaciones,  $X_y$  está ausente. En algunas realizaciones, el grupo  $X_y$  tiene la fórmula.



25 En algunos aspectos,  $X_s$  se selecciona de manera que  $X_s$  no proporcione grupos excesivamente reactivos.  $X_s$  se puede seleccionar de manera que proporcione una longitud total de los grupos X de 2 a 15 átomos.  $X_s$  se puede seleccionar de manera que la longitud total del grupo X sea de entre 2 y 10 átomos.  $X_s$  se puede seleccionar de manera que la longitud total del grupo X sea de 4 a 8 átomos.  $X_s$  se puede seleccionar de manera que la longitud total del grupo X sea de 5 átomos.  $X_s$  se puede seleccionar de manera que la longitud total del grupo X sea de 6 átomos. En algunos aspectos,  $X_s$  puede comprender una de las siguientes fórmulas:

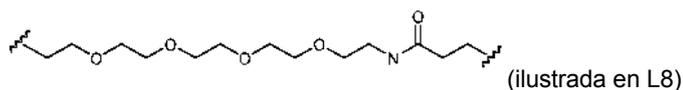
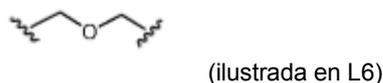
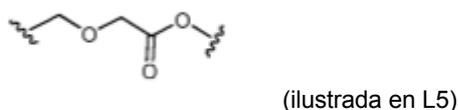
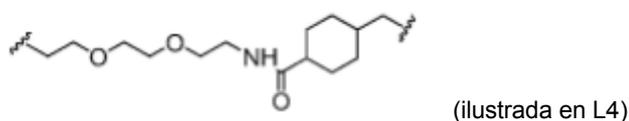
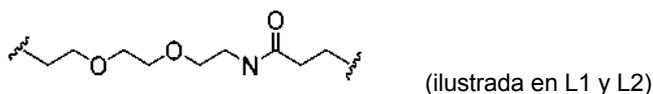


30



en la que  $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  o  $10$ , y  $m$  está presente o ausente;  $n$  puede ser  $1, 2, 3, 4, 5$  o  $6$ ;  $n$  puede ser  $1, 2, 3$  o  $4$ ;  $n$  puede ser  $1$ ;  $n$  puede ser  $2$ ;  $n$  puede ser  $3$ ;  $n$  puede ser  $4$ .

5 En algunos aspectos, Xs comprende una de las siguientes fórmulas:



10

15

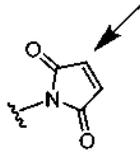
20

Xp se selecciona idealmente para permitir una estrategia de unión covalente direccional específica al resto de unión a proteínas de la proteína FGF21 y/o al resto de unión a péptidos del homólogo de Exendina4. Por ejemplo, cuando el resto de unión comprende un grupo nucleófilo, Xp puede ser un grupo electrófilo y viceversa. Por ejemplo, si la cadena lateral de restos de unión comprende un grupo amina, tal como K, H, Y, ornitina, Dap o Dab, Xp puede ser COOH, u otro electrófilo reactivo similar. Si el resto de unión es D o E, Xp puede comprender un grupo nucleófilo, tal como un grupo amina. Cualquiera de estas estrategias permite que se forme un enlace covalente entre el grupo Xp y el resto de unión mediante estrategias de formación de enlaces amida. Cuando el resto de unión comprende un grupo amina, Xp puede comprender la fórmula:



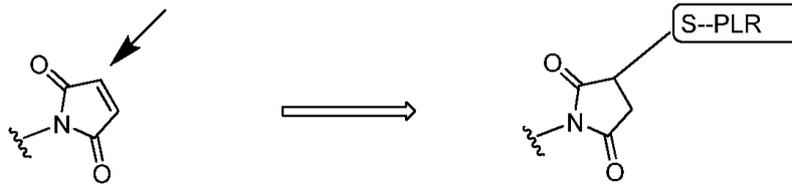
25

Quando el resto de unión es C, homólogos de C u otros restos que contienen grupos tiol tales como K(SH), Xp puede comprender un grupo maleimida (o similar) que permita una estrategia de reacción de adición de tiol-maleimida para unir covalentemente el grupo Xp al resto de unión. En algunos aspectos, Xp también puede comprender un grupo tiol, que permite la formación de un puente disulfuro entre el resto de unión y el grupo Xp. En algunos aspectos, Xp puede ser maleimida.



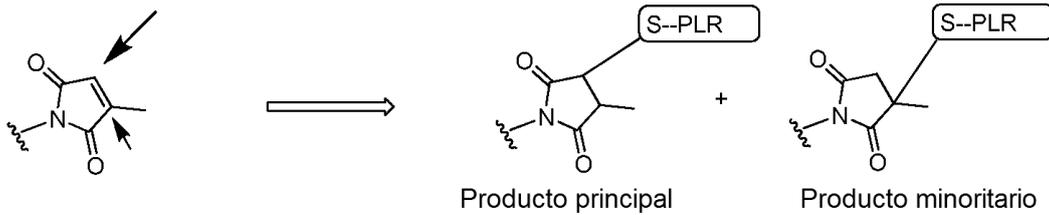
En la que la flecha indica el punto de unión al resto de unión, y la línea paralela representa la unión al grupo Y del engarce. Cuando el resto de unión es un resto de cisteína u otra cadena lateral que porta el tiol, el mecanismo de conjugación puede ser el siguiente:

5



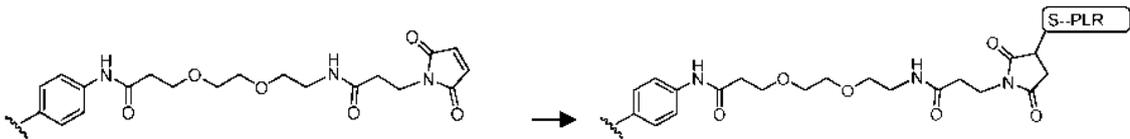
en el que PLR es el resto de unión a proteínas o el resto de unión a péptidos, y S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína u otro aminoácido portador de tiol, tal como K(SH)

En algunos aspectos, el Xp comprende una maleimida sustituida.

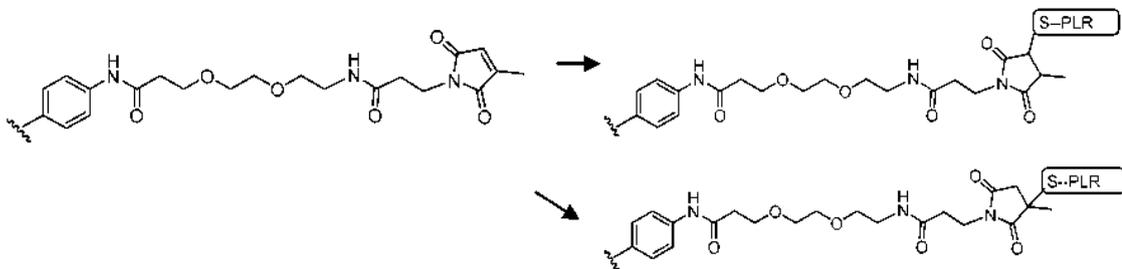


10 En algunos aspectos, los componentes XY del engarce antes de la conjugación y después de la conjugación se pueden seleccionar de entre los siguientes:

XY-1

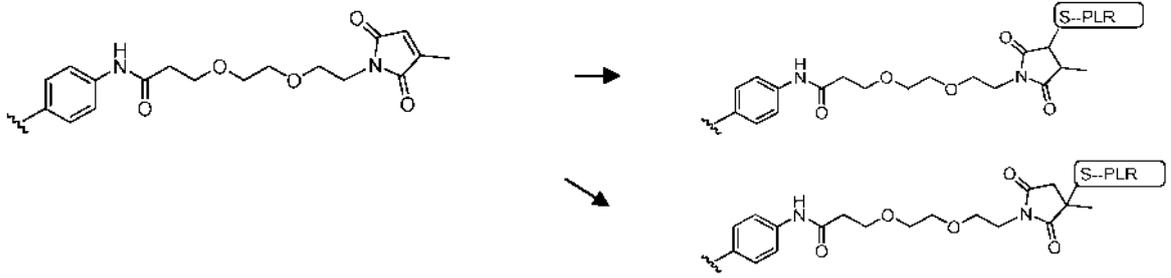


XY-2

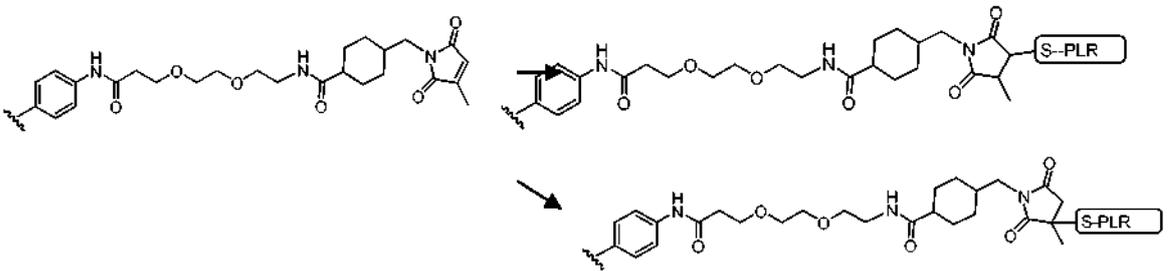


15

XY-3

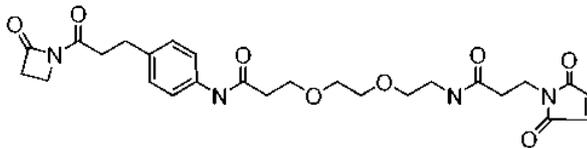


XY-4



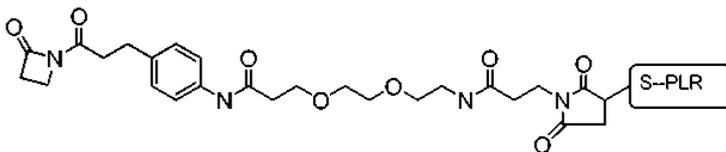
5 Los componentes XY-1, XY-2, XY-3 y XY-4 son particularmente útiles en realizaciones que se conjugan con una cadena lateral portadora de un grupo tiol en el resto de unión.

En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-1 (L1):



L1

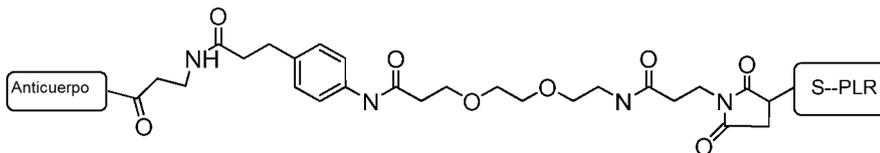
Cuando L1 se conjuga con el PLR, el complejo de L1-PLR puede comprender la fórmula:



L1-PLR

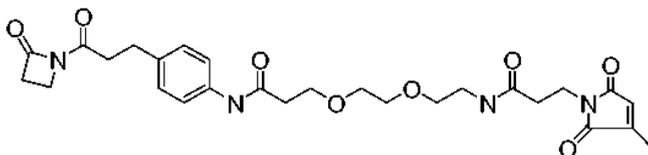
10

Cuando L1 se conjuga con el anticuerpo y PLR, el complejo de anticuerpo-L1-PLR puede comprender la fórmula:



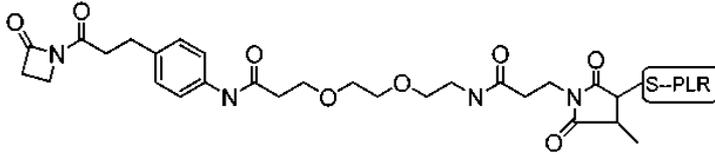
Ab-L1- PLR

En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-2 (L2):

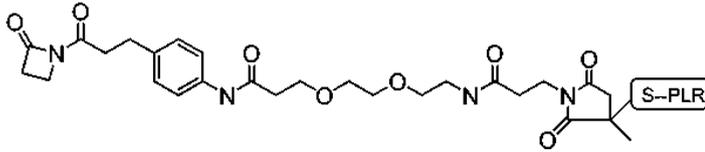


L2

Cuando L2 se conjuga con el PLR, el complejo de L2-PLR puede comprender una de las siguientes fórmulas:

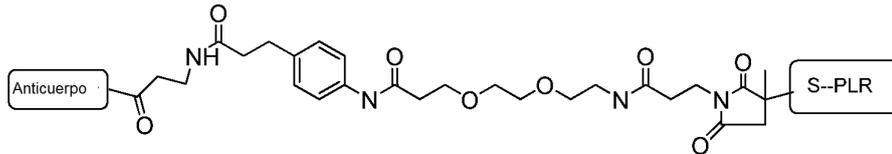
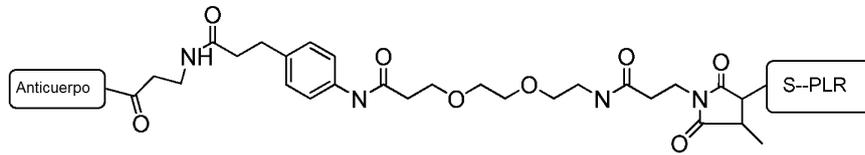


L2- PLR



L2- PLR

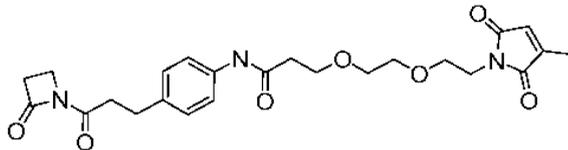
Cuando L2 se conjuga con el anticuerpo y el PLR, el complejo de anticuerpo-L2-PLR puede comprender una de las siguientes fórmulas:



Ab-L2- PLR

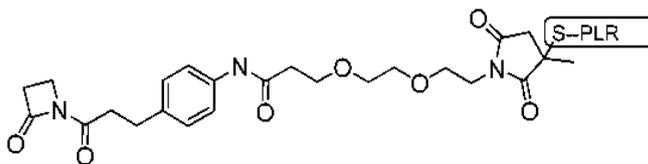
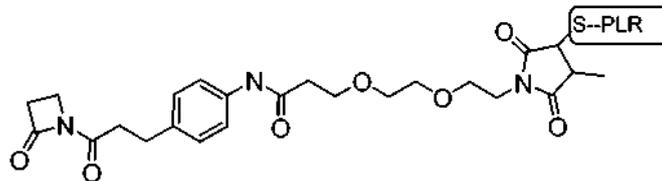
5

En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-3 (L3):



L3

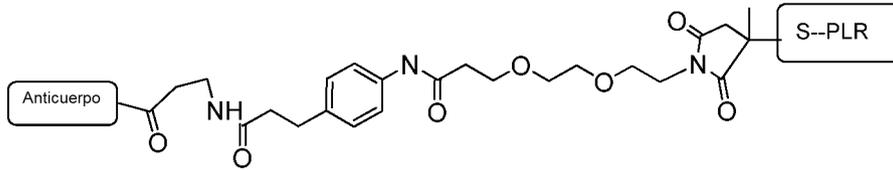
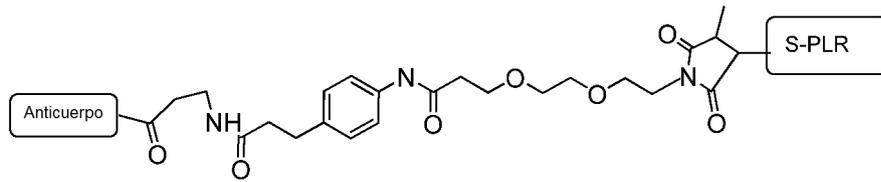
Cuando L3 se conjuga con el PLR, el complejo de L3-PLR puede comprender una de las siguientes fórmulas:



L3- PLR

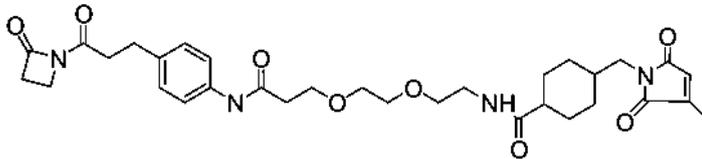
10

Cuando L3 se conjuga con el anticuerpo y el PLR, el complejo de anticuerpo-L3-PLR puede comprender la fórmula:



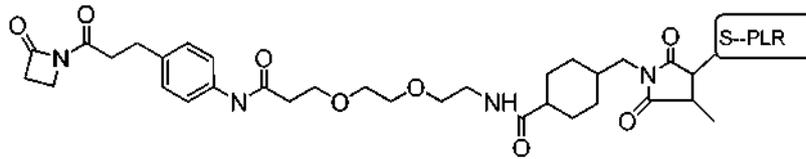
Ab-L3- PLR

En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-4 (L4):

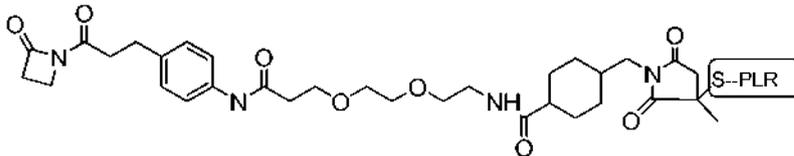


L4

Cuando se conjuga con el PLR, el complejo de L4-PLR puede comprender la fórmula:

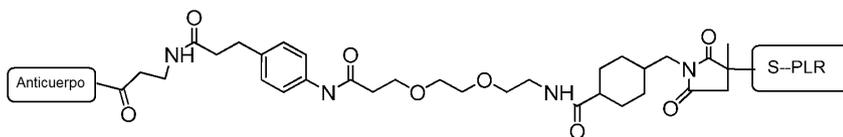
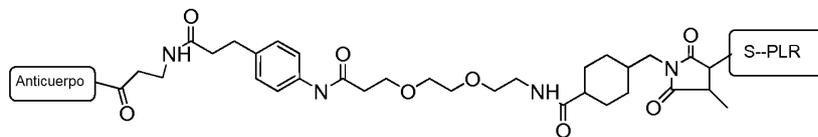


5



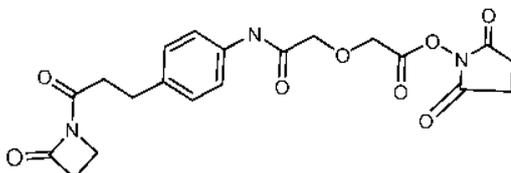
L4- PLR

Cuando L4 se conjuga con el anticuerpo y el PLR, el complejo de anticuerpo-L4-PLR puede comprender la fórmula:



Ab-L4- PLR

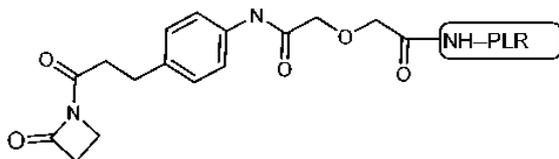
En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-5 (L5):



10

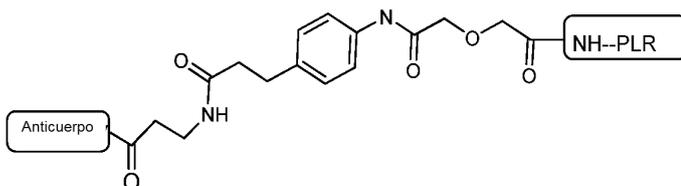
L5

Cuando L5 se conjuga con el PLR, el complejo de L5-PLR puede comprender la fórmula:



L5-PLR

Cuando L5 se conjuga con la molécula de anticuerpo y PLR, el complejo de anticuerpo-L5-PLR puede comprender la fórmula:

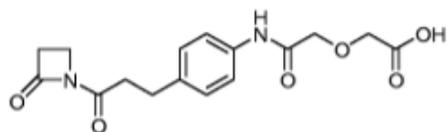


Ab-L5-PLR,

5

en la que NH es el grupo amino del final de una cadena lateral de LR, tal como lisina.

En algunos aspectos, el engarce puede ser el Engarce-6 (L6):

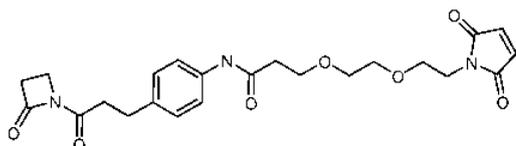


L6

10

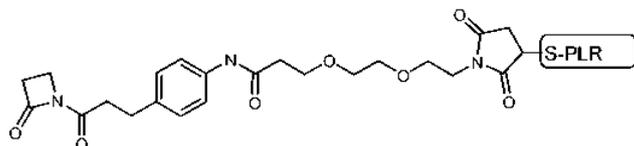
Cuando L6 se conjuga con PLR, el complejo de L6-PLR puede comprender la misma fórmula que para L5-PLR1. De forma similar, cuando L6 se conjuga con el anticuerpo y el PLR, el complejo de anticuerpo-L6-PLR puede comprender la misma fórmula que para el Ab-L5-PLR.

En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-7 (L7):



L7

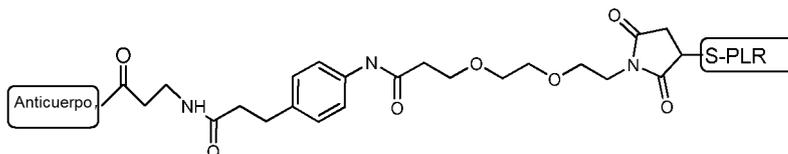
Cuando se conjuga con PLR, el complejo de L7-PLR puede comprender la fórmula:



L7-PLR

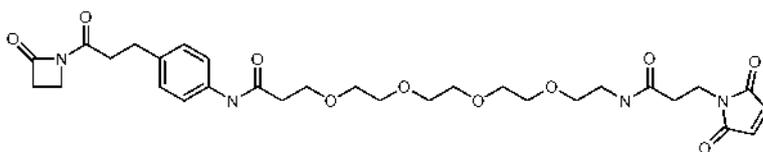
15

Cuando se conjuga con anticuerpo y PLR, el complejo de anticuerpo-L7-PLR puede comprender la fórmula:



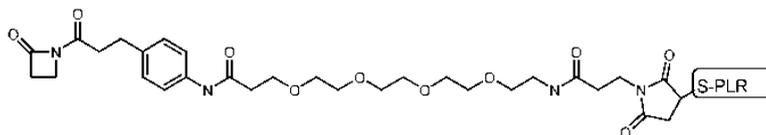
Ab-L7-PLR

En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-8 (L8):



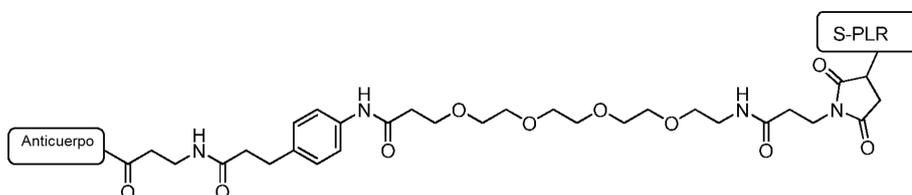
L8

Quando L8 se conjuga con PLR, el complejo de L8-PLR puede comprender la fórmula:



L8-PLR

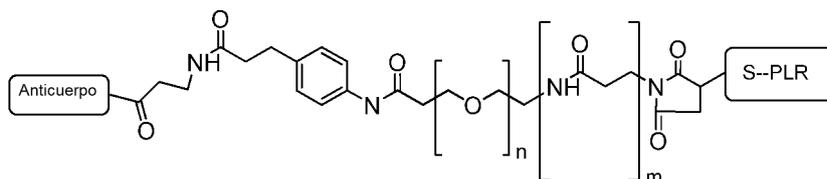
Quando L8 se conjuga con el anticuerpo y el PLR, el complejo de anticuerpo-L8-PLR puede comprender la fórmula:



Ab-L8-PLR

5

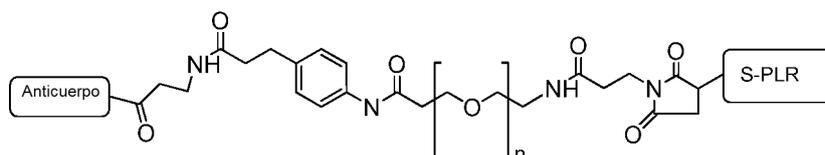
En algunas realizaciones, el engarce puede ser de fórmula:



10

en la que el anticuerpo es un enlace covalente al sitio de combinación de un anticuerpo, S-PLR es el enlace covalente a una cadena lateral portadora de tiol en el resto de unión a proteínas y/o el resto de unión a péptidos,  $n = 1$  o  $2$  o  $3$ , o  $4$ ,  $5$ ,  $6$ ,  $7$ ,  $8$ ,  $9$  o  $10$ ;  $n$  puede ser  $1$ ,  $2$ ,  $3$ ,  $4$ ,  $5$  o  $6$ ;  $n$  puede ser  $1$ ;  $n$  puede ser  $2$ ;  $n$  puede ser  $3$ ;  $n$  puede ser  $4$ .  $M$  puede estar ausente.  $M$  puede estar presente.  $M$  puede estar presente.

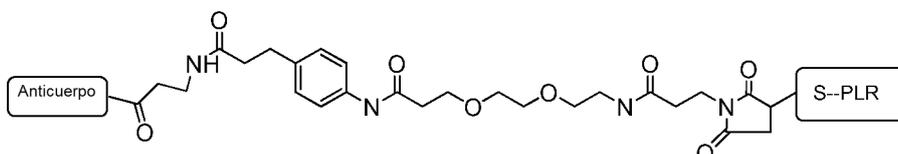
En algunas realizaciones, el primer y/o segundo engarce, cuando se conjuga con el anticuerpo y PLR, puede ser de fórmula:



15

en la que el anticuerpo es un enlace covalente al sitio de combinación de un anticuerpo, S-PLR es un enlace covalente a una cadena lateral portadora de tiol en el resto de unión a proteínas y/o el resto de unión a péptidos,  $n = 1$  o  $2$  o  $3$ , o  $4$ ,  $5$ ,  $6$ ,  $7$ ,  $8$ ,  $9$  o  $10$ ;  $n$  puede ser  $1$ ,  $2$ ,  $3$ ,  $4$ ,  $5$  o  $6$ ;  $n$  puede ser  $1$ ;  $n$  puede ser  $2$ ;  $n$  puede ser  $3$ ;  $n$  puede ser  $4$ .

En algunas realizaciones, la composición comprende la fórmula:



20

en la que el anticuerpo es un enlace covalente al sitio de combinación de un anticuerpo, y S-PLR es un enlace

covalente con una cadena lateral portadora de tiol en el resto de unión a proteínas y/o el resto de unión a péptidos.

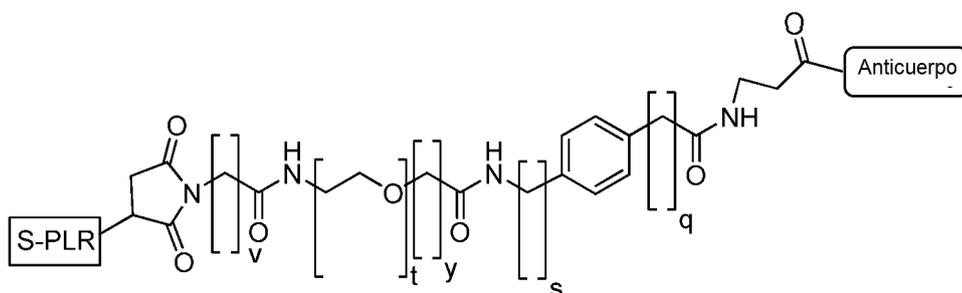
En algunas realizaciones, el resto de unión a proteínas comprende una cadena lateral portadora de amino o de tiol. En algunas realizaciones, el resto de unión a proteínas comprende lisina o cisteína. En algunas realizaciones, el resto de unión a proteínas comprende cisteína.

5 En algunas realizaciones, el resto de unión de proteínas se encuentra en uno de los restos número 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 y 129, de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la molécula de FGF21 comprende SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la molécula de FGF21 comprende SEQ ID NO: 7.

10 En algunas realizaciones, el resto de unión a péptidos se encuentra en una de las posiciones de 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 26, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 60.

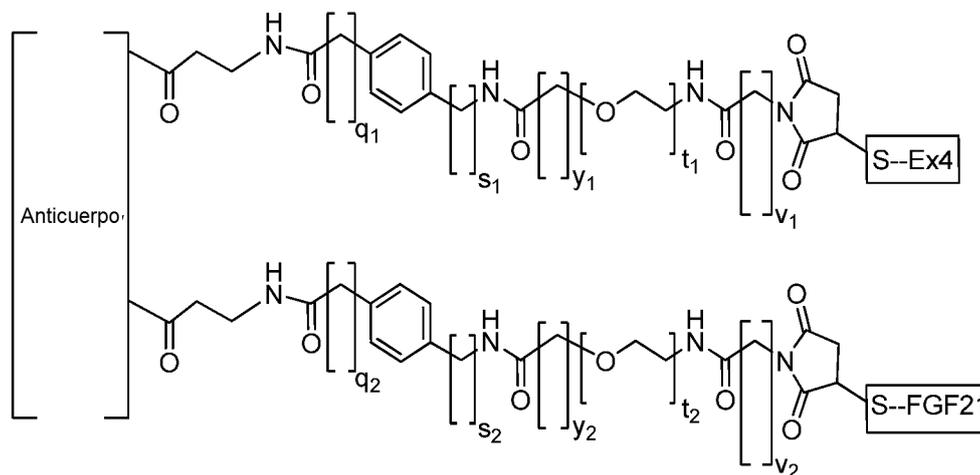
En algunas realizaciones, el primer y segundo engarce son iguales. En algunas realizaciones, el primer y segundo engarce comprenden L1.

En algunos aspectos, la estructura del resto de unión a proteínas [S-PLR] y/o el resto de unión a péptidos [S-PLR] cuando está unido al anticuerpo es de fórmula:



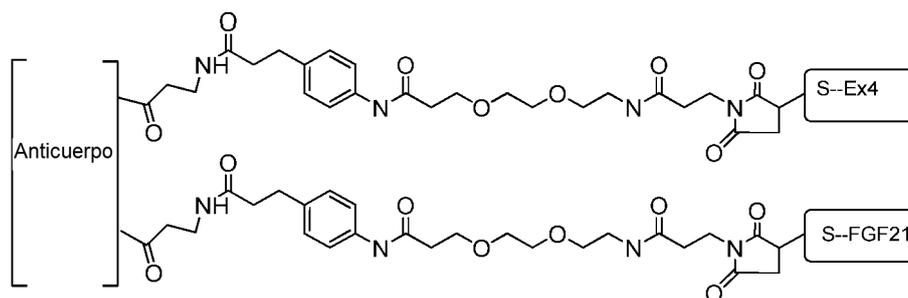
15 en la que v es 1 o 2, t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y es 0, 1 o 2; s es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y q es 1, 2, 3, 4, o 5. En algunos aspectos, v es 2, t es 2, y es 1, s es 0 y q es 2.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula:



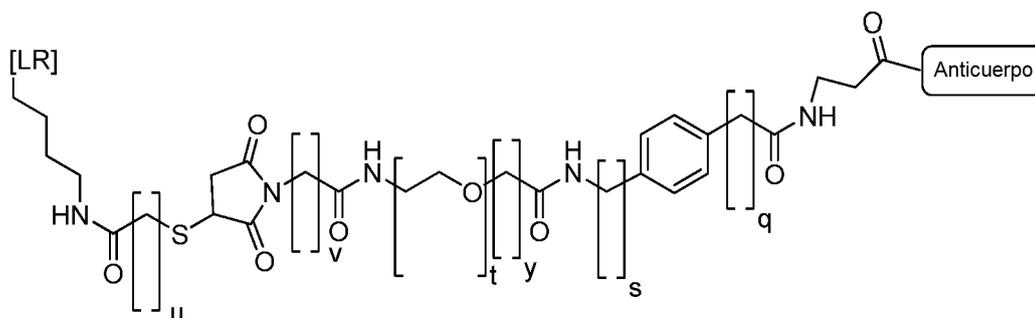
20 en la que cada uno independientemente de  $v_1$  y  $v_2$  es 1 o 2, cada uno independientemente de  $t_1$  y  $t_2$  es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, cada uno independientemente de  $y_1$  e  $y_2$  es 0, 1 o 2; cada uno independientemente de  $s_1$  y  $s_2$  es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y cada uno independientemente de  $q_1$  y  $q_2$  es 1, 2, 3, 4 o 5. En algunos aspectos,  $v_1$  y  $v_2$  son ambos 2. En algunos aspectos,  $t_1$  y  $t_2$  son ambos 2. En algunos aspectos,  $y_1$  e  $y_2$  son ambos 1. En algunos aspectos  $s_1$  y  $s_2$  son ambos 0. En algunos aspectos  $q_1$  y  $q_2$  son ambos 2.

25 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición de fórmula:



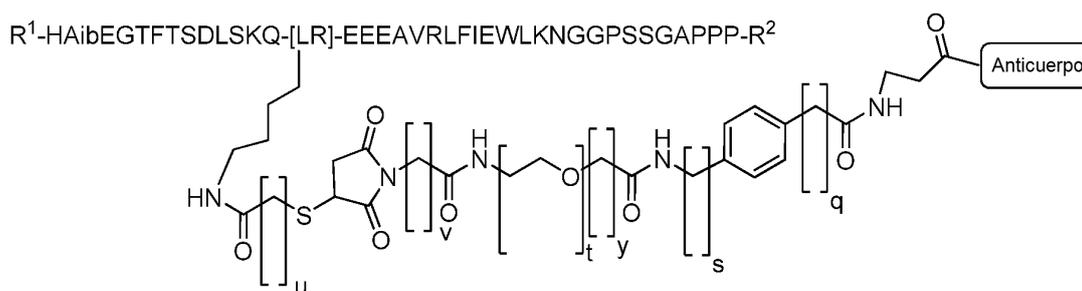
5 en la que el primer y el segundo engarce están conectados cada uno de manera covalente a uno de los dos sitios de combinación de anticuerpos, y el anticuerpo comprende SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, y S-Ex4 denota un enlace covalente a través de un grupo tiol a K(SH) de SEQ ID NO: 64, y S-FGF21 denota un enlace covalente a través de un grupo tiol a C<sup>129</sup> de SEQ ID NO: 10.

En algunos aspectos, la estructura del resto de unión a péptidos [LR] cuando se une al segundo engarce y al segundo sitio de combinación del anticuerpo es de fórmula:



10 en la que u es 1, 2 o 3; v es 1 o 2, t es 1, 2 o 3, y es 1 o 2; s es 0, 1 o 2 y q es 1 o 2. En algunos aspectos, u es 2, v es 2, t es 2, y es 1, s es 0 y q es 2.

En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 y el segundo engarce comprenden la fórmula:



15 en la que u es 1, 2 o 3; v es 1 o 2, t es 1, 2 o 3, y es 1 o 2; s es 0, 1 o 2 y q es 1 o 2, y [LR] es el resto de unión a péptidos. En algunos aspectos, u es 2, v es 2, t es 2, y es 1, S es 0 y q es 2. En algunos aspectos, [LR] es K, K(S-MAL) o K(SH).

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere una composición de fórmula:



20 en la que FGF21 es un homólogo de FGF21; y Ex4 es un homólogo de Exendina4; y Ab es un anticuerpo catalítico de aldolasa; y el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del anticuerpo, y el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos de Ex4 y al sitio de combinación del anticuerpo, y en la que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes, de modo que la semivida subcutánea del complejo de proteína-anticuerpo conjugado es al menos de 20 horas en modelos murinos. En algunas realizaciones, la semivida SC es de al menos aproximadamente 25 horas. En algunas realizaciones, la semivida SC es de al menos aproximadamente 30 horas.

25 En algunas realizaciones, la semivida SC es de al menos aproximadamente 33 horas. En algunas realizaciones, la semivida SC es de al menos aproximadamente 40 horas en modelos de primates. En algunas realizaciones, la

- semivida SC es de al menos aproximadamente 45 horas en modelos de primates. En algunas realizaciones, la semivida SC es de al menos 48 horas en modelos de primates. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 28 horas en modelos murinos. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 30 horas en modelos murinos. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 34 horas en modelos murinos. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 40 horas en modelos murinos. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 50 horas en modelos de primates. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 55 horas en modelos de primates. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un complejo de anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 60 horas en modelos de primates.
- En algunas realizaciones, la divulgación se refiere una composición de fórmula:

**[FGF21-primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce-Ex4]**

- en la que FGF21 es un homólogo de FGF21; y Ex4 es un homólogo de Exendina4; y el Anticuerpo es un anticuerpo catalítico de aldolasa; y el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del anticuerpo, y el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos de Ex4 y al sitio de combinación del anticuerpo, y en la que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes, de modo que la biodisponibilidad subcutánea del complejo de proteína-anticuerpo conjugado es de al menos aproximadamente 80 % en modelos murinos. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 90%. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 50 % en modelos de primates. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 50 % en modelos de primates. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 60 % en modelos de primates.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere una composición de fórmula:

**[FGF21-primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce-Ex4]**

- en la que FGF21 es un homólogo de FGF21; y Ex4 es un homólogo de Exendina4; y el Anticuerpo es un anticuerpo catalítico de aldolasa; y el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del anticuerpo, y el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos de Ex4 y al sitio de combinación del anticuerpo, y en la que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes, de modo que la biodisponibilidad subcutánea del complejo de proteína-anticuerpo conjugado tenga una potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo de hGLP-1 R (iAMP) inferior a aproximadamente 1 nM. En algunos aspectos, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo de hGLP-1 R (iAMP) es inferior a aproximadamente 500 pm. En algunos aspectos, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo de hGLP-1 R (iAMP) es inferior a aproximadamente 100 pm. En algunos aspectos, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo de hGLP-1 R (iAMP) es inferior a aproximadamente 50 pm. En algunos aspectos, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo de hGLP-1 R (iAMP) es aproximadamente de 10 a 50 pm.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere una composición de fórmula:

**[FGF21-primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce-Ex4]**

- en la que FGF21 es un homólogo de FGF21; y Ex4 es un homólogo de Exendina4; y el Anticuerpo es un anticuerpo catalítico de aldolasa; y el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del anticuerpo, y el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos de Ex4 y al sitio de combinación del anticuerpo, y en la que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes, de modo que el complejo de proteína-anticuerpo conjugado tiene una potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo Taqman de Glut1 inferior a aproximadamente 5 nM. En algunas realizaciones, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo Taqman de Glut1 es inferior a aproximadamente 4 nM. En algunas realizaciones, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo Taqman de Glut1 es inferior a aproximadamente 3 nM. En algunas realizaciones, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo Taqman de Glut1 es inferior a aproximadamente 2 nM. En algunas realizaciones, la potencia de CE<sub>50</sub> en un ensayo Taqman de Glut1 es inferior a aproximadamente 1 nM.

- En algunas realizaciones, el complejo de proteína-anticuerpo conjugado combina dos o más ventajas favorables, tales como la semivida SC, la semivida IV, la captación de glucosa, la potencia, la biodisponibilidad, la facilidad de fabricación, la eficacia de conjugación, la estabilidad *in vivo*, la estabilidad *in vitro*, la resistencia a la hidrólisis y la compatibilidad entre el anticuerpo, el engarce y la proteína.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición que comprende una molécula de FGF21

conectada covalentemente a al menos una fracción que aumenta la semivida en un resto de unión situado en el resto número 171 de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la molécula de FGF21 está conectada covalentemente a una fracción que aumenta la semivida. En algunos aspectos, la molécula de FGF21 está conectada covalentemente a más de una fracción que aumenta la semivida. En algunos aspectos, el resto de unión se selecciona del grupo que consiste en los restos número 79, 129 y 171. En algunos aspectos, el resto de unión es la posición 171. La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 73. La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 74. La molécula de FGF21 puede comprender SEQ ID NO: 75. La expresión "fracción que aumenta la semivida" se refiere a cualquier molécula que cuando está conectada a la molécula de FGF21, aumenta la semivida circulante de la molécula de FGF21 e/o inhibe o reduce la eliminación renal de la molécula de FGF21. Los ejemplos de fracciones que aumentan la semivida incluyen PEG, mPEG, polímeros que contienen fosforilcolina, dominios Fc, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub>, dsF<sub>v</sub>, scF<sub>v</sub>, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos, anticuerpos catalíticos (descritos a continuación), proteínas (tales como albúmina) y otras macromoléculas conocidas en la técnica.

#### Anticuerpos

"Aproximadamente", cuando se usa en proporción con una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95 % para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor.

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" engloba no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "parte de unión al antígeno") o cadena única del mismo, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno que incluye, por ejemplo, sin limitación, scFv, anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136). Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase del mismo), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Se conocen dos tipos de regiones constantes de cadena ligera humana: lambda (CL-λ) y kappa (CL-κ). Hay tres variantes conocidas de CL-κ, basadas en los polimorfismos V/A en la posición 46 y A/L en la posición 84 (numeración de acuerdo con SEQ ID NO: 78). Los 3 polimorfismos de CL-κ identificados son Km(1):V<sup>46</sup>/L<sup>84</sup>, Km(1,2):A<sup>46</sup>/L<sup>84</sup> y Km(3) A<sup>46</sup>/V<sup>84</sup>. Por lo tanto, los anticuerpos pueden comprender un dominio kappa constante de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 78, 79, 80 o 81, o sus variantes que comprendan no más de 5, 4, 3, 2 o 1 inserciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos. El experto en la materia entiende que el resto R<sup>1</sup> de SEQ ID NO: 78, 79, 80 y 81, mediante algunos procedimientos de recuento, puede incluirse en el dominio variable, y que también se puede considerar que los dominios constantes parten del resto T<sup>2</sup> de dichas secuencias.

La expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, la diana X). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro de la expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen Fab; Fab'; F(ab')<sub>2</sub>; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (dAb) (Ward y col., 1989 *Nature* 341:544-546), y una región aislada determinante de la complementariedad (CDR).

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, bien sola o en combinación. Como se sabe en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones marco conservadas (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables, que contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Si se desean variantes de una región variable en cuestión, particularmente con la sustitución en restos de aminoácidos fuera de una región CDR (es decir, en la región marco conservada), se puede identificar una sustitución de aminoácidos apropiada, preferentemente, una sustitución conservativa de aminoácidos, comparando la región variable en cuestión con las regiones variables de otros anticuerpos que contienen secuencias de CDR1 y CDR2 en la misma clase canónica que la región variable en cuestión (Chothia y Lesk, *J Mol Biol* 196(4): 901-917, 1987). Cuando se selecciona la FR para flanquear las CDR en cuestión, por ejemplo, cuando se humaniza u se optimiza un anticuerpo, se prefieren las

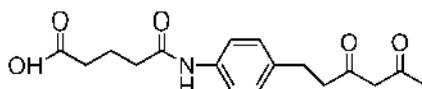
FR de los anticuerpos que contienen las secuencias CDR1 y CDR2 en la misma clase canónica.

Una "CDR" de un dominio variable son restos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación tanto de Kabat como de Chothia, AbM, el contacto y/o las definiciones conformacionales o cualquier procedimiento de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Las CDR de anticuerpo pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat y col. Véase, por ejemplo, Kabat y col., 1992, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también se pueden identificar como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia y col., 1989, *Nature* 342: 877-883. Otras metodologías para la identificación de CDR incluyen la "definición de AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia, y se obtiene usando el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®) o la "definición de contacto" de CDR basada en los contactos antigénicos observados, establecida en MacCallum y col., 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745. En otra metodología, denominada en el presente documento la "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los restos que hacen contribuciones entálpicas a la unión del antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe y col., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166. Otras definiciones más de los límites de las CDR pueden no seguir estrictamente una de las metodologías anteriores, sino que, sin embargo, se superponen con al menos una parte de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o hallazgos experimentales de que restos o grupos de restos particulares o incluso CDR completas no afectan significativamente la unión al antígeno. Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a CDR definidas por cualquier metodología conocida en la técnica, incluyendo combinaciones de metodologías. Los procedimientos usados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estas metodologías. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto y/o conformacionales.

El documento US2006205670 describe una serie de composiciones y técnicas directamente aplicables a la presente solicitud, en particular, en los párrafos, que describen anticuerpos, fragmentos útiles, y variantes y modificaciones de los mismos, sitios de combinación y CDR, preparación de anticuerpos, expresión, humanización, modificación de aminoácidos, glicosilación, ADCC, CDC, aumento de la semivida en suero de anticuerpos, vectores de expresión, sistemas hospedadores de mamíferos y plegamiento, entre otros elementos de la tecnología de anticuerpos.

La expresión "sitio de combinación", como se usa en el presente documento, (también conocido como sitio de unión del anticuerpo) se refiere a la región de los dominios de inmunoglobulina o Ig que se combinan (o pueden combinarse) con el determinante de un antígeno apropiado (o una proteína estructuralmente similar). En general, el término incluye las CDR y los restos estructurales adyacentes que están implicados en la unión al antígeno.

La expresión "anticuerpos de aldolasa", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que contienen partes de sitio de combinación que, cuando no están impedidos (por ejemplo, por conjugación), catalizan una reacción de adición de aldol entre un donante de cetona alifática y un aceptor de aldehído. Los anticuerpos de aldolasa se pueden generar mediante la inmunización de un animal sensible a la inmunidad con un inmunógeno que incluye un hapteno de 1,3-dicetona de fórmula:



acoplado a un vehículo proteico, y que además se caracteriza por tener una lisina con un grupo  $\epsilon$ -amino reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo. Los anticuerpos de aldolasa se caracterizan además sometiendo su actividad catalítica a inhibición con el hapteno de 1,3-dicetona mediante la formación de un complejo entre el hapteno de 1,3-dicetona y el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina del anticuerpo catalítico.

Como se ha comentado, en ciertas realizaciones, ciertos anticuerpos que se pueden usar junto con compuestos de la divulgación pueden requerir una cadena lateral reactiva en el sitio de combinación del anticuerpo. Una cadena lateral reactiva puede estar presente de manera natural o puede colocarse en un anticuerpo por mutación. El resto reactivo del sitio de combinación del anticuerpo puede estar asociado con el anticuerpo, tal como cuando el resto está codificado por el ácido nucleico presente en la célula linfocítica identificada por primera vez para formar el anticuerpo. Como alternativa, el resto de aminoácido puede surgir modificando intencionalmente el ADN para codificar el resto en particular (por ejemplo, el documento WO 01/22922). El resto reactivo puede ser un resto no natural que se origina, por ejemplo, mediante la incorporación biosintética usando un codón único, ARNt y aminoacil-ARNt como se ha mencionado en el presente documento. En otra metodología, el resto de aminoácido o sus grupos funcionales reactivos (por ejemplo, un grupo amino nucleófilo o un grupo sulfhidrilo) se pueden unir a un resto de aminoácido en el sitio de combinación del anticuerpo. Así pues, el enlace covalente con el anticuerpo que se produce "a través de un resto de aminoácido en un sitio de combinación de un anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa que el enlace puede ser directamente a un resto de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpo o a través de una fracción química que está unida a una cadena lateral de un resto de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpo. En algunas realizaciones, el aminoácido es cisteína, y el

grupo reactivo de la cadena lateral es un grupo sulfhidrilo. En otras realizaciones, el resto de aminoácido es lisina, y el grupo reactivo de la cadena lateral es un grupo  $\epsilon$ -amino. En algunas realizaciones, el aminoácido es Lys93 de la cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas realizaciones, el aminoácido es Lys-99 en HC h38C2 (SEQ ID NO: 26).

- 5 Los anticuerpos catalíticos son una fuente de anticuerpos con sitios de combinación adecuados que comprenden una o más cadenas laterales de aminoácidos reactivas. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos de aldolasa, anticuerpos de beta-lactamasa, anticuerpos de esterasa y anticuerpos de amidasa.

Una realización comprende un anticuerpo de aldolasa tal como los anticuerpos monoclonales de ratón mAb 33F12 y mAb 38C2, así como versiones quiméricas y humanizadas adecuadas de dichos anticuerpos (por ejemplo, h38C2, SEQ ID NO: 25 y 26). El mAb de ratón 38C2 (y h38C2) tiene una lisina reactiva cerca pero fuera de HCDR3, y es el prototipo de una nueva clase de anticuerpos catalíticos que se generaron mediante inmunización reactiva e imitan mecánicamente a las enzimas aldolasas naturales. Véase C. F. Barbas 3<sup>o</sup> y col., *Science* 278:2085-2092 (1997). Otros anticuerpos catalíticos de aldolasa que se pueden usar incluyen los anticuerpos producidos por el hibridoma 85A2, que tiene el número de acceso ATCC PTA-1015; el hibridoma 85C7, que tiene el número de acceso ATCC PTA-1014; el hibridoma 92F9, que tiene el número de acceso ATCC PTA-1017; el hibridoma 93F3, que tiene el número de acceso ATCC PTA-823; el hibridoma 84G3, que tiene el número de acceso ATCC PTA-824; el hibridoma 84G11, que tiene el número de acceso ATCC PTA-1018; el hibridoma 84H9, que tiene el número de acceso ATCC PTA-1019; el hibridoma 85H6, que tiene el número de acceso ATCC PTA-825; el hibridoma 90G8, que tiene el número de acceso ATCC PTA-1016. A través de una lisina reactiva, estos anticuerpos catalizan reacciones de aldol y retro-aldol usando el mecanismo de enamina de las aldolasas naturales. Los anticuerpos de aldolasa y los procedimientos de generación de anticuerpos de aldolasa se desvelan en las patentes de EE.UU. n.º 6.210.938, 6.368.839, 6.326.176, 6.589.766, 5.985.626 y 5.733.75.

Los compuestos de la divulgación también se pueden formar uniendo un compuesto de la divulgación a una cisteína reactiva, tal como los encontrados en los sitios de combinación de anticuerpos catalíticos de tioesterasa y de esterasa. Los anticuerpos catalíticos de tioesterasa adecuados se describen por K. D. Janda y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:2532-2536 (1994). Los anticuerpos de esterasa adecuados se describen por P. Wirsching y col., *Science* 270:1775-1782 (1995). Los anticuerpos reactivos que contienen aminoácidos pueden prepararse por medios bien conocidos en la técnica, incluyendo la mutación de un resto de sitio de combinación de anticuerpo para codificar el aminoácido reactivo o la derivatización química de una cadena lateral de aminoácidos en un sitio de combinación de anticuerpos con un engarce que contiene el grupo reactivo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. Cuando los compuestos de la divulgación están unidos covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo, y dichos anticuerpos se humanizan, es importante que dichos anticuerpos se humanicen con la conservación de alta afinidad de unión por el grupo Z. Se contemplan diversas formas de anticuerpos murinos de aldolasa humanizados. Una realización usa el anticuerpo catalítico de aldolasa humanizado h38c2 IgG1 o h38c2 Fab con dominios constantes humanos C<sub>K</sub> y C<sub>V1</sub>1. C. Rader y col., *J. Mol. Bio.* 332:889-899 (2003) desvela las secuencias de genes y los vectores que se pueden usar para producir h38c2 Fab y h38c2 IgG1. El gen V<sub>K</sub> de la línea germinal humana DPK-9 y el gen J<sub>K</sub> humano JK4 se usaron como armazones para la humanización del dominio variable de la cadena ligera kappa de m38c2, y el gen de la línea germinal humana DP-47 y el gen J<sub>H</sub> humano JH4 se usaron como marcos para la humanización del dominio variable de cadena pesada de m38c2. La Figura 1 ilustra una alineación de secuencias entre las cadenas ligera y pesada variables en m38c2, h38c2 y líneas germinales humanas. h38c2 puede utilizar dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, incluyendo cualquiera de sus alotipos. En ciertas realizaciones de los compuestos de la divulgación en los que el anticuerpo es h38c2 IgG1 con el alotipo G1 m(f), Z se une a la cadena lateral del resto lisina en la posición 99 de la cadena pesada. Otra realización usa un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables (V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>) de h38c2 (SEQ ID NOS: 27 y 28) y los dominios constantes de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub>, dsF<sub>v</sub>, scF<sub>v</sub>, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, diacuerpo o minicuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa y puede seleccionarse del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG<sub>2Δa</sub>, IgG3, IgG4, IgG<sub>4Δb</sub>, IgG<sub>4Δc</sub>, IgG<sub>4</sub> S228P, IgG<sub>4Δb</sub> S228P e IgG<sub>4Δc</sub> S228P. El anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo puede comprender los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de h38c2. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que comprende los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de h38c2 y un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG<sub>2Δa</sub>, IgG3, IgG4, IgG<sub>4Δb</sub>, IgG<sub>4Δc</sub>, IgG<sub>4</sub> S228P, IgG<sub>4Δb</sub> S228P e IgG<sub>4Δc</sub> S228P. El anticuerpo puede ser IgG1 h38C2 (SEQ ID NO: 25 y 26). El anticuerpo puede ser IgG2 h38C2 (SEQ ID NO: 25 y 76). El anticuerpo puede ser una versión humanizada de un anticuerpo murino de aldolasa que comprende una región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD o IgE humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende la región V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un anticuerpo de aldolasa murino y una región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD o IgE humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de m38C2 (SEQ ID NO: 29 y 30). En realizaciones adicionales, el anticuerpo es una versión completamente humana de un anticuerpo murino de aldolasa que comprende una secuencia de polipéptido de anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD o IgE humano natural o nativo. En algunos aspectos, el anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende una CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> y CDR3 de V<sub>L</sub> de la secuencia de V<sub>L</sub> mostrada en SEQ ID NO: 27; y una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende una CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub> y CDR3 de V<sub>H</sub> de la secuencia de V<sub>H</sub> mostrada en SEQ ID NO: 28. Como se ha indicado anteriormente, las CDR pueden determinarse mediante una serie de procedimientos conocidos de la técnica.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena ligera al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 25 y una cadena pesada al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 26. La cadena ligera puede ser al menos un 96 % idéntica a SEQ ID NO: 25. La cadena ligera puede ser al menos un 97 % idéntica a SEQ ID NO: 25. La cadena ligera puede ser al menos un 98 % idéntica a SEQ ID NO: 25. La cadena ligera puede ser al menos un 99 % idéntica a SEQ ID NO: 25. La cadena pesada puede ser al menos un 96 % idéntica a SEQ ID NO: 26. La cadena pesada puede ser al menos un 97 % idéntica a SEQ ID NO: 26. La cadena pesada puede ser al menos un 98 % idéntica a SEQ ID NO: 26. La cadena pesada puede ser al menos un 99 % idéntica a SEQ ID NO: 26. En algunos aspectos, la cadena ligera puede diferir de SEQ ID NO: 25 en un aminoácido. En algunos aspectos, la cadena pesada puede diferir de SEQ ID NO: 26 en un aminoácido. En algunos aspectos, las diferencias entre la cadena ligera y SEQ ID NO: 25 pueden estar situadas solamente en la región constante. En algunos aspectos, las diferencias entre la cadena pesada y SEQ ID NO: 26 pueden estar situadas solamente en la región constante.

También se contemplan diversas formas de fragmentos de anticuerpos de aldolasa humanizados. Una realización usa F(ab')<sub>2</sub> de h38c2. El F(ab')<sub>2</sub> de h38c2 puede producirse mediante la digestión proteolítica de IgG1 h38c2. Otra realización usa un scFv de h38c2 que comprende los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de h38c2 que están conectados opcionalmente por el engarce intermedio ((Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 31). Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces, tras la inmunización (o la inmunización reactiva en el caso de los anticuerpos catalíticos) de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción endógena de inmunoglobulina.

Como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* usando repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden ser generados por linfocitos B activados *in vitro*, por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 5.567.610 y 5.229.275.

Se contemplan una o varias modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se hace cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procedimientos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación puede derivatizarse o ligarse a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o parte de los mismos se derivatizan de manera que la capacidad del engarce para conjugarse covalentemente con la combinación del anticuerpo no se vea afectada negativamente por la derivatización o el marcaje. Por consiguiente, los anticuerpos y las partes de anticuerpo de la divulgación pretenden incluir formas tanto intactas como modificadas de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación se puede ligar funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

En otras realizaciones, el anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo de la divulgación puede ser un anticuerpo de fusión o un anticuerpo unido a otro polipéptido. En algunos aspectos, solo las regiones variables del anticuerpo están unidas al polipéptido. En algunos aspectos, el anticuerpo se conjuga covalentemente con un péptido de manera que no interfiera con la capacidad de unión del sitio de combinación.

El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como un agente de dirección, péptido, agonista de proteína, antagonista de proteína, regulador metabólico, hormona, toxina, factor de crecimiento u otra proteína reguladora, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima que se pueda visualizar fácilmente, tal como la peroxidasa de rábano picante. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos monocatenarios están enlazados entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena polipeptídica, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado reticulando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Entre los agentes reticulantes adecuados se incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo).

Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Los agentes de detección útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que sean útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo está marcado con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que se puede diferenciar. Por ejemplo, cuando está presente el agente de peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina, y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo puede marcarse con un agente magnético, tal como gadolinio. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores de epítipo). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

El anticuerpo también puede ser derivatizado con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero o para aumentar la unión del tejido.

### Procedimiento de conjugación

La divulgación proporciona procedimientos de generación de compuestos de fórmula:



en la que FGF21 es un homólogo de FGF21; y

Ex4 es un homólogo de Exendina4; y

Ab es un anticuerpo catalítico de aldolasa o un aparte de unión al antígeno del mismo; y

el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del anticuerpo; y

el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos en Ex4 y al sitio de combinación del anticuerpo; y

en la que el primer y/o segundo engarce son iguales o diferentes. De acuerdo con una realización, la divulgación proporciona un procedimiento que comprende las etapas:

(i) mezclar FGF21 y el primer engarce entre sí en una proporción de entre aproximadamente 1:4 y aproximadamente 1:1 para formar el complejo [FGF21-primer engarce];

(ii) mezclar [FGF21-primer engarce] y Ab entre sí en una proporción de entre aproximadamente 1,1:1 y aproximadamente 1:5 para formar una mezcla que contiene [Ab], [Ab]-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [Ab]-[FGF21-primer engarce]<sub>2</sub>;

(iii) extraer las moléculas de [Ab]-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> de la mezcla formada en (ii);

(iv) mezclar Ex4 y el segundo engarce entre sí en una proporción de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2 para formar el complejo [segundo engarce-Ex4];

(v) mezclar [Ab]-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> con [segundo engarce-Ex4] en una proporción de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2 para formar una mezcla que contenga [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>.

### Conjugación de FGF21 con el primer engarce

En algunas realizaciones, el homólogo de FGF21 se proporciona en Tris aproximadamente 20 mM, NaCl aproximadamente 50 mM, pH = aproximadamente 7. En algunas realizaciones, el homólogo de FGF21 se proporciona en MES aproximadamente 25 mM; pH = aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, se puede añadir tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a una concentración final de x0,1 a x10 veces en comparación con FGF21 (x0,5 y x0,75 han demostrado funcionar particularmente bien). Esto tiene la ventaja de reducir al mínimo la tendencia de FGF21ΔH-A129C para dimerizarse, de manera que aproximadamente ≥ 75 % de la proteína está en forma monomérica. Si la proteína está dimerizada, entonces TCEP se volverá a romper en monómero. Aparte del TCEP, se pueden usar mercaptoetanol (β-ME) o ditiotreitól (DTT) a concentraciones de entre x0,1 a x10 para romper la ruptura dimerica en monómero. Los reactivos tales como β-mercaptoetanol (β-ME) o ditiotreitól (DTT) también reaccionan con FGF21 y forman un enlace covalente con tiol-azufre, y TCEP no forma un enlace covalente con FGF21. Otros reactivos tales como el cloruro de tetraquis-hidroximetilfosfonio y tris-dietilaminometilfosfina pueden reducir fácilmente el disulfuro y son útiles para reducir el dímero en monómero. En algunas realizaciones, el primer engarce se proporciona en DMSO al aproximadamente 100 % a una concentración de aproximadamente 10 mM.

En algunos aspectos, el FGF21 y el primer engarce pueden conjugarse entre sí mediante incubación a aproximadamente temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos con agitación suave. Los complejos de [FGF21-primer engarce] se pueden obtener eluyendo la mezcla a través de una columna Zeba previamente

equilibrada, de modo que el engarce en exceso permanezca en la resina de la columna Zeba.

La conjugación de FGF21 con el primer engarce puede llevarse a cabo a una proporción de entre aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:4. En algunas realizaciones, la conjugación entre FGF21 y el primer engarce puede llevarse a cabo en un intervalo de proporciones, en el que el límite inferior se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:1,25, aproximadamente 1:1,5, aproximadamente 1,75, aproximadamente 1:2, y el límite superior se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:2,25, aproximadamente 1:2,5, aproximadamente 1:2,75, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:3,5 y aproximadamente 1:4. En algunos aspectos, la cantidad de engarce puede aumentarse hasta un exceso de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces en base equivalente en comparación con FGF21. La mayor cantidad del primer engarce puede ayudar a agilizar el tiempo de conjugación. Sin embargo, la adición de engarce en exceso superior a aproximadamente 4 veces no produce ningún aumento adicional en la formación del producto ni en el tiempo de reacción. En un exceso de aproximadamente 2 veces del primer engarce es preferible que proporcione el material de engarce a FGF21. La reducción de la cantidad de primer engarce hasta menos de 1 equivalente da como resultado una cantidad reducida de formación del producto. A medida que se reduce la cantidad de engarce hasta aproximadamente 0,9 equivalentes, y aproximadamente 0,8 equivalentes, 0,7 equivalentes, y así sucesivamente, la cantidad de producto formado disminuye. La cantidad más alta de producto formado es cuando la proporción de FGF21 y el primer engarce está entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1: 2.

#### Conjugación de [FGF21-primer engarce] a anticuerpo

En algunos aspectos, [FGF21-primer engarce] se conjuga con el anticuerpo en un tampón de MES o de fosfato, a una concentración de entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 150 mM, con un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, a entre aproximadamente 0 °C y 37 °C, y preferentemente entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente la temperatura ambiente. En algunos aspectos, [FGF21-primer engarce] se conjuga con el anticuerpo en un tampón de fosfato 100 mM con un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 a temperatura ambiente. El [FGF21-primer engarce] puede conjugarse con el anticuerpo en una reacción llevada a cabo durante un tiempo seleccionado del grupo que consiste en al menos 30 minutos, al menos aproximadamente 60 minutos, al menos aproximadamente 90 minutos, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 18 horas y al menos aproximadamente 24 horas.

#### Extracción de Ab-[FGF21-primer engarce]

En algunos aspectos, es ventajoso extraer moléculas de Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> de la mezcla formada en (ii) por cromatografía de fase inversa. En parte, la divulgación se basa en la aplicación sorprendente de la cromatografía de fase inversa para aislar Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> con alta pureza.

En algunos aspectos, la cromatografía de fase inversa se realiza sobre una columna de butilo de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). La resina de HIC normalmente comprende perlas (por ejemplo, de polímero metilacrilado hidroxilado) unidas covalentemente a ligandos de butilo (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de extracción de Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> de una mezcla de anticuerpo no conjugado, [FGF21-primer engarce], Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>2</sub>, mediante cromatografía de fase inversa sobre una columna de butilo.

El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser inferior a aproximadamente 50 μM. El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser inferior a aproximadamente 40 μM. El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser de entre aproximadamente 50 μM y aproximadamente 20 μM. El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser de entre aproximadamente 40 μM y aproximadamente 30 μM. El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser de aproximadamente 35 μM. En algunos aspectos, se puede usar una columna de butilo de grado "S".

En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de al menos aproximadamente 500 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de al menos aproximadamente 750 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de al menos aproximadamente 1.000 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de entre aproximadamente 450 Å y 1.050 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de entre aproximadamente 950 Å y 1.050 Å.

En algunos aspectos, la columna de HIC puede comprender perlas de resina conjugada con butilo de aproximadamente 35 μM que comprenden poros de entre aproximadamente 1.000 Å. En algunos aspectos, la columna puede ser una columna de butilo 650 S.

Esto puede estar a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y 37 °C. Esto puede estar a temperatura ambiente (de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C). Esto puede estar a una temperatura de entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 20 °C. Esto puede estar a una temperatura de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 18 °C. En algunos aspectos de la divulgación, una temperatura demasiado alta puede dar lugar a

especies de Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>2</sub> en exceso, mientras que una temperatura demasiado baja, hace que no quede atrapada suficiente especie Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> por la columna.

En algunos aspectos, la columna de butilo puede someterse a una etapa de lavado isocrática que comprende 1,6-hexanodiol a una concentración del aproximadamente 2 % al aproximadamente 3 %, preferentemente de entre aproximadamente el 2,2 % y aproximadamente el 2,6 %, y lo más preferentemente del aproximadamente 2,4 %. El tampón de lavado puede estar entre aproximadamente pH 6,5 y aproximadamente pH 7,5, y puede ser aproximadamente pH 7,0. El tampón de lavado puede comprender fosfato de sodio 50 mM. En algunos aspectos, el 1,6-hexanodiol puede estar sustituido con un diol orgánico alternativo, tal como propilenglicol o nonoxol. Los alcoholes tales como el isopropanol no proporcionaron resultados satisfactorios.

Las columnas de HIC normalmente se pasan sobre una concentración de sal decreciente a un ritmo constante. La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de ventajas particulares asociadas con el funcionamiento de un tampón de elución de concentración de sal relativamente baja con una concentración creciente de diol en el aislamiento de especies de AB-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> de la reacción de conjugación.

En algunos aspectos, la elución en la columna de butilo puede realizarse usando un gradiente lineal con un tampón que comprende 1,6-hexanodiol. El gradiente lineal de elución puede progresar desde una concentración inicial de entre aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 3 %, y preferentemente de entre aproximadamente el 2,2 % y aproximadamente el 2,6 %, y lo más preferentemente del aproximadamente 2,4 %.

La elución de diol se puede hacer pasar sobre un gran volumen de columna (al menos 20, preferentemente al menos 25 volúmenes de columna (VC). En dichas realizaciones, aunque la concentración inicial de diol puede ser como se ha descrito anteriormente, la concentración final del gradiente lineal puede ser superior al 20 % y puede ser del aproximadamente 25 %. En algunas realizaciones, la etapa de elución se ejecuta entre 5 y 15 VC, preferentemente entre 8 y 13 VC, más preferentemente entre 10 y 12 VC, más preferentemente 11 VC. En dichas realizaciones, puede ser ventajoso limitar la concentración final del gradiente lineal a entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 10 %, preferentemente entre aproximadamente el 7 % y aproximadamente el 9 %, más preferentemente entre aproximadamente el 7,5 % y aproximadamente el 8,5 %, lo más preferentemente aproximadamente el 8 %. El tampón de elución puede estar entre aproximadamente pH 6,5 y aproximadamente pH 7,5, y puede ser aproximadamente pH 7,0. El tampón de elución puede comprender fosfato de sodio entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mM. El tampón de elución puede comprender fosfato de sodio entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 80 mM. El tampón de elución puede comprender fosfato de sodio entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 60 mM. El tampón de elución puede comprender fosfato de sodio 50 mM.

Este material se puede entonces someter a diafiltración en tampón adecuado (por ejemplo, lactato de sodio 30 mM, pH 4,8 o glutamato de sodio 20 mM, pH 4,5).

#### **Generación de [segundo engarce-Ex4]**

En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 y el segundo engarce se pueden mezclar entre sí a una proporción de entre aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2 para formar el complejo [segundo engarce-Ex4]. En algunos aspectos, la mezcla del homólogo de Exendina4 y el segundo engarce entre sí se puede hacer a una proporción de aproximadamente 1,5:1, para formar el complejo [segundo engarce-Ex4]. En algunos aspectos, la mezcla del homólogo de Exendina4 y el segundo engarce entre sí se puede hacer a una proporción de aproximadamente 1:1, para formar el complejo [segundo engarce-Ex4]. En algunos aspectos, la mezcla del homólogo de Exendina4 y del segundo engarce entre sí se puede hacer a una proporción de aproximadamente 1:1,5, para formar el complejo [segundo engarce-Ex4]. En algunos aspectos, la mezcla del homólogo de Exendina4 y del segundo engarce entre sí se puede hacer a una proporción de aproximadamente 1:2, para formar el complejo [segundo engarce-Ex4].

En algunos aspectos, los homólogos de Exendina4 comprenden un resto de unión a péptidos cuya cadena lateral comprende un grupo tiol. En algunas realizaciones, este grupo tiol puede entonces experimentar una reacción de Michael o adiciones de conjugación al anillo de maleimida de ciertos engarces desvelados en el presente documento.

Las adiciones de conjugación entre los homólogos de Exendina4 adecuados y los segundos engarces se pueden llevar a cabo en una amplia selección de disolventes que incluyen dimetilsulfóxido, dimetilformamida, diclorometano, agua, etanol, acetonitrilo, acetona, propilenglicol y cualquier combinación de los anteriores disolventes. En algunos aspectos, el disolvente para la reacción de Exendina4/segundo engarce se selecciona del grupo que consiste en dimetilsulfóxido, dimetilformamida y agua. La reacción de conjugación también puede realizarse en un sistema disolvente mixto tal como acetonitrilo-agua, dimetilsulfóxido-agua y dimetilformamida-agua. Se prefiere el uso de dimetilsulfóxido, dimetilformamida, disolventes de agua-acetonitrilo debido a la facilidad de solubilidad de los péptidos de Exendina4 y el segundo engarce, la eficacia de la reacción de conjugación y la posterior facilidad de purificación del producto. El criterio clave es la solubilidad de los homólogos de Exendina4 a concentraciones que serían adecuadas para la conjugación y la eficacia de la conjugación con productos secundarios mínimos. Si el péptido Exendina4 y el segundo engarce son escasamente solubles (por ejemplo, menos de aproximadamente 0,1

M), entonces se reducirá la eficacia de conjugación.

La presencia de una base orgánica o base inorgánica facilita en gran medida la formación de anión tiolato en péptidos de Exendina4 y la posterior conjugación a un segundo engarce. En general, no se prefieren las aminas primarias ni las aminas secundarias debido a su reactividad con el engarce. Sin embargo, se pueden usar aminas primarias o aminas secundarias en ciertas realizaciones, con la condición de que reaccionen mal con el engarce, aminas terciarias tales como trimetilamina, trietilamina, dietilmetilamina, diisopropilmetilamina, dietilisopropilamina, triisopropilamina, tributilamina, *N*-metilmorfolina y *N*-metilpiperidina en las reacciones de conjugación. La mayoría de las bases de amina mencionadas anteriormente son adecuadas para la reacción de conjugación. Sin embargo, la eficacia de la reacción es diferente entre diferentes bases. Algunas bases son más resistentes a reaccionar con el engarce que otras. En general, se prefieren bases más voluminosas, ya que estas bases no reaccionan fácilmente con el engarce. Se prefieren bases tales como diisopropiletanina, triisopropilamina y dietilisopropilamina, ya que ofrecen un buen equilibrio de casi ninguna reactividad con el engarce y la formación eficiente del producto.

Las reacciones también pueden llevarse a cabo en un sistema acuoso usando bases inorgánicas tales como bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio, bicarbonato de litio, carbonato de litio, siempre que estas bases no reaccionen con el engarce o el péptido. Las reacciones también pueden llevarse a cabo en sistemas acuosos tamponados con o sin un codisolvente orgánico. La adición de tiol a un doble enlace se logra más fácilmente cuando el pH es de aproximadamente 7 y superior. La reacción de conjugación es más lenta a pH < aproximadamente 7. Las reacciones de conjugación entre la Ex4 y el engarce pueden tener lugar, en general, entre pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8. Sin embargo, en condiciones más básicas, los engarces son menos estables. El pH más cercano al nivel neutro ofrece tanto eficiencia como estabilidad. Se puede usar una amplia selección de tampones para facilitar las reacciones. Muchos tampones son adecuados para las reacciones de conjugación, incluyendo, pero sin limitación, tampón fosfato, tampón citrato, tampón glicina/histidina, tampón 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, ácido 4-2-hidroxietyl-1-piperazinoetanosulfónico y ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico.

#### 25 **Conjugación de [segundo engarce-Ex4] a Ab-[FGF21-engarce]<sub>1</sub>**

En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar a una proporción de aproximadamente Ab-[FGF21-enlace]<sub>1</sub>: [segundo engarce-Ex4] de entre aproximadamente 0,7:1 a aproximadamente 2:1. En algunos aspectos, la proporción es de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 1,7:1. En algunos aspectos, la proporción es de aproximadamente 1,3:1 a aproximadamente 1,5:1. La proporción puede ser de aproximadamente 1,4:1.

En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar a un pH de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5. En algunos aspectos, Ab-[primer FGF21-engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar a un pH de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 6,5. En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar a un pH de aproximadamente 6,3.

En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar a temperatura ambiente. En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar entre aproximadamente 17 °C y aproximadamente 22 °C. En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar a aproximadamente 19 °C.

En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar después de una reacción de al menos 6 horas. En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar después de una reacción de al menos 8 horas. En algunos aspectos, Ab-[FGF21-primer engarce]<sub>1</sub> y [segundo engarce-Ex4] se pueden combinar después de una reacción de al menos 12 horas. De acuerdo con otra realización de un procedimiento de generación de compuestos de la divulgación, el procedimiento comprende las etapas:

- (i) mezclar Ex4 y el segundo engarce entre sí en una proporción de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2 para formar el complejo [segundo engarce-Ex4];
- (ii) mezclar el [segundo engarce-Ex4] y Ab entre sí a una proporción de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:3 para formar una mezcla que contenga [Ab], [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> y [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>;
- (iii) extraer las moléculas de [Ab]-[segundo engarce][Ex4]<sub>1</sub> de la mezcla formada en (ii);
- (iv) mezclar FGF21 y el primer engarce entre sí a una proporción de entre aproximadamente 1:4 y aproximadamente 1:1 para formar el complejo [FGF21-primer engarce];
- (v) mezclar [FGF21-primer engarce] con [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> a una proporción de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2 para formar una mezcla que contenga [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>.

[FGF21-primer engarce] y [Ex4-segundo engarce] se pueden preparar como se ha descrito anteriormente.

**Generación de [Ex4-segundo engarce]<sub>1</sub>-Ab**

En algunas realizaciones, [segundo engarce-Ex4] y Ab se pueden conjugar entre sí a una proporción de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 1:3 para formar [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,6:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,7:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,75:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,8:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,9:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 1,2:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,5:1. En algunas realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,7:1.

En algunas realizaciones, en las que la proporción de [segundo engarce-Ex4] y Ab es de aproximadamente 1:1, esto proporciona la cantidad máxima de especies de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>, con respecto a Ab no conjugado y [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>. Cuando la proporción es de aproximadamente 1:1, se observa una distribución favorable del aproximadamente 40-50 % de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>, junto con aproximadamente el 25 % de Ab no conjugado y aproximadamente el 25 % de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>.

Sin embargo, para purificar [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> de la mezcla, es ventajoso tratar de reducir al mínimo la cantidad de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>, ya que estas especies pueden interferir con la extracción de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. Además, [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub> representa el material que no se puede reciclar. Por lo tanto, también es ventajoso reducir al mínimo la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>. Para hacer esto, la cantidad de [segundo engarce-Ex4] se puede reducir de aproximadamente 1 equivalente a aproximadamente 0,7 equivalentes, o incluso tanto como y 0,5 equivalentes (en comparación con el anticuerpo). Al reducir la cantidad de [segundo engarce-Ex4] en comparación con Ab, se puede reducir al mínimo la formación de especies de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>.

Mientras que la reducción de la proporción de [segundo engarce-Ex4] con respecto al Ab puede ayudar a mejorar el equilibrio de los productos formados para favorecer Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> en relación con [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>, esto debe compensarse con la necesidad de que la reacción proporcione un rendimiento tolerable, y se reduzca al mínimo la cantidad de anticuerpo no conjugado y, por lo tanto, estrictamente innecesario, al final de la reacción. Por lo tanto, la reducción de la proporción de [segundo engarce-Ex4]:[Ab] por debajo de aproximadamente 0,5:1 puede reducir el rendimiento global de Ab-[segundo engarce-Ex4]. Se ha encontrado sorprendentemente que la proporción óptima de [segundo engarce-Ex4]:[Ab] está entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la proporción de reacción puede estar dentro de un intervalo de dos proporciones definidas por un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 0,5:1, aproximadamente 0,6:1, aproximadamente 0,7:1, aproximadamente 0,8:1, aproximadamente 0,9:1 y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 0,6:1, aproximadamente 0,7:1, aproximadamente 0,8:1, aproximadamente 0,9:1 y aproximadamente 1:1. En algunos aspectos, la proporción está entre aproximadamente 0,6:1 y aproximadamente 0,8:1. En algunos aspectos, la proporción es de aproximadamente 0,7:1.

Las proporciones ventajosas de [segundo engarce-Ex4]:[Ab] ayudan a reducir al mínimo la formación de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub> mientras se mantiene la cantidad de formación de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. Al reducir la cantidad de [segundo engarce-Ex4], el péptido puede conservarse mientras se mantienen los rendimientos. Al aumentar la cantidad de [segundo engarce-Ex4] más allá de 1 equivalente (por ejemplo, [segundo engarce-Ex4]:[Ab] = aproximadamente 1,25:1 a aproximadamente 2:1), la formación de la especie Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub> aumenta espectacularmente y reduce la cantidad de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>, el producto deseado. Mayores cantidades de [segundo engarce-Ex4] en comparación con Ab (en base equivalente) dan lugar a una caída dramática de la cantidad de formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>.

La formación de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> entre el péptido Ex4 y el anticuerpo puede ocurrir a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8. En algunas realizaciones, especialmente en las que el segundo engarce es L1, el engarce conectado a Ex4 es relativamente más estable en condiciones ácidas que en condiciones básicas. Sin embargo, en condiciones ácidas, la reacción de conjugación es más lenta. En condiciones básicas (pH > aproximadamente 7), la reacción de conjugación es más rápida; sin embargo, el engarce unido a Ex4 puede sufrir hidrólisis. Por lo tanto, es fundamental identificar una condición que muestre una estabilidad razonable y una conjugación eficiente.

Las condiciones más cercanas al pH neutro (aproximadamente 6,5-aproximadamente 7,5) muestran la mayor estabilidad para el engarce con una eficacia de reacción concomitante. Mientras que la conjugación funciona a pH aproximadamente 7, parece que la estabilidad del engarce y la eficacia de la conjugación son mejores a pH de aproximadamente 6,5.

Aunque la reacción es viable en agua pura, es mucho más deseable tener un sistema tamponado en el que el pH pueda mantenerse para mejorar la eficacia de conjugación. Varios sistemas tampón incluyendo el tampón de formulación (compuestos de glicina, histidina, sacarosa), tampón de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico), tampón de ácido *N*-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico, tampón de ácido 3-(*N*-

morfolin)propanosulfónico, tampón de ácido 2-(*N*-morfolin)etanosulfónico, tampón de ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-propanosulfónico.

En algunos casos, se puede usar tampón de fosfato, aunque puede potenciar la agregación de anticuerpos. Pueden usarse otros tampones para mantener el pH entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. El pH apropiado, junto con el tampón apropiado, desempeñan un papel fundamental en la formación de la cantidad máxima de aducto de Ex4 y anticuerpo. El tampón de fusión de anticuerpo (que comprende histidina, sacarosa, glicina, pH 6,5-7,5, preferentemente a aproximadamente pH 7) parece tener todas las cualidades que se espera de un tampón para la reacción de conjugación. Dependiendo del tampón, el tiempo de reacción para conjugar Ex4 con anticuerpo puede variar entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas. En la mayoría de los tampones adecuados, los tiempos de reacción están comprendidos entre aproximadamente 6 y aproximadamente 14 horas. En el tampón de fusión de anticuerpos, la reacción se completa en aproximadamente 12 a aproximadamente 15 horas. El tiempo de reacción para conjugar [segundo engarce-Ex4] con Ab puede estar entre dos puntos de tiempo; el más bajo de los cuales puede ser de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 12 horas o aproximadamente durante toda la noche, y el punto más alto de los cuales puede ser de aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 36 y aproximadamente 48 horas.

En algunas realizaciones, la reacción de conjugación entre el [segundo engarce-Ex4] y Ab puede tener lugar entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 40 °C. A mayor temperatura, la reacción de conjugación es más rápida. Sin embargo, la estabilidad del péptido y del engarce puede verse comprometida manteniéndolos a mayor temperatura durante un período de tiempo más largo. A medida que se baja la temperatura, se mejora la estabilidad del anticuerpo, péptido y engarce, pero la eficiencia de conjugación se somete a gradación de temperatura. La temperatura entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 25 °C es lo más preferible. La temperatura entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C ofrece conjugación y estabilidad eficientes de reactivos y productos. La temperatura a la que se puede conjugar [segundo engarce-Ex4] con Ab puede estar dentro de un intervalo definido por un límite inferior y un límite superior; cuyo límite inferior puede ser de aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21 grados centígrados, y cuyo límite superior puede ser de aproximadamente 11, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 18, aproximadamente 20, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33 y alrededor de 34 grados centígrados.

### 35 Extracción de [segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>-Ab

La mezcla de conjugación contiene anticuerpo libre ([Ab]), anticuerpo con un péptido Ex4 conjugado ([Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>) y anticuerpo con 2 péptidos Ex4 conjugados ([Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>), además de los conjugados de [segundo engarce-Ex4] libres. La siguiente etapa implica la purificación de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> del resto de los materiales. En algunos aspectos, el material se puede purificar usando columnas de cromatografía tales como columna de butilo, columna de carboximetilo y columna de intercambio iónico tal como columna de intercambio catiónico fuerte. Los disolventes adecuados para eluir los conjugados de anticuerpo incluyen soluciones tamponadas. El pH de las soluciones tampón puede estar entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Los tampones acuosos pueden estar constituidos por un o una combinación de sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio o ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, con o sin un codisolvente orgánico tal como isopropanol, propanol, butanol o alcohol etílico.

### Conjugación de Ab-[Segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> con [FGF21-primer engarce]

La mezcla del [primer engarce-FGF21] con [Ab]-[segundo engarce-Ex4] a una proporción de entre aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1 da lugar a la formación de molécula de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. Mientras que una proporción de aproximadamente 1:1 proporciona una cantidad razonable de producto, el aumento de la cantidad de [FGF21-primer engarce] a aproximadamente el doble mejoró la formación molécula de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>, y aproximadamente el triple, mejoró aún más la formación de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. Sin embargo, el aumento de la cantidad de [FGF21-primer engarce] más de aproximadamente el triple no mejora la eficiencia de formación de molécula de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>.

En algunas realizaciones, la conjugación de [segundo engarce-Ex4] con [Ab] en la proporción de 0,7:1 usando el procedimiento de la divulgación según lo descrito proporciona aproximadamente el 35 % de anticuerpo no conjugado; aproximadamente el 48 % de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>; y aproximadamente el 17 % de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub> en la etapa (ii) anterior. En algunas realizaciones, el anticuerpo no conjugado, [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>; y [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub> se separaron usando HPLC dotada de una columna CM

Sepharose usando tampón de carga (sulfato de amonio entre 0,6 M y 0,9 M, fosfato de sodio entre 25 mM y 75 mM, pH entre 6,5 y 7,5), y se eluyó con un tampón de elución (alcohol isopropílico del 15 al 25 % en fosfato de sodio 25 mM a 75 mM, pH entre = 6,5 y 7,5). También se exploró NaCl en lugar de sulfato de amonio como un componente del tampón de carga. La separación del anticuerpo no conjugado, [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>; y [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub> usando sulfato de amonio fue comparable al NaCl. La columna de HPLC se empaquetó con resina de CM Sepharose como fase estacionaria. La columna se equilibró con tampón de carga mencionado anteriormente. El intervalo de concentraciones de tampón y pH funcionaría en el aislamiento de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> mencionados anteriormente. Se encontró que la separación usando tampón de carga (sulfato de amonio 0,75 M, fosfato de sodio 50 mM, pH = 7) y la elución con un tampón de elución (alcohol isopropílico al 20 % en fosfato de sodio 50 mM, pH = 7) proporcionó un rendimiento sistemáticamente mejor. Se combinaron las fracciones que contenían [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>, se extrajeron mediante UF/DF en un tampón de fusión de anticuerpos, que comprendía histidina (5 mM a 25 mM), glicina (5 mM a 25 mM) y sacarosa (del 0,5 al 5 %) y pH entre 6 y 8. El tampón que contenía histidina 10 mM, glicina 10 mM, sacarosa al 2 %, pH = aproximadamente 6,5, proporcionó un rendimiento sistemáticamente mejor. El anticuerpo no conjugado separado de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> usando las condiciones de tampón anteriores se puede someter a ciclado x3 para conseguir una tasa de extracción del aproximadamente el 70 %.

### Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden composiciones y/o compuestos de la divulgación. Los agentes que comprenden composiciones de la divulgación se pueden formular y administrar sistémicamente. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18<sup>a</sup> Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Para la inyección, las composiciones de la divulgación se pueden formular en soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas, o soluciones, suspensiones, emulsiones, dispersiones no acuosas, o polvos o liofilizados estériles adecuados para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de diluyentes, disolventes y vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites. La fluidez puede mantenerse o mejorarse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la divulgación se pueden formular en soluciones acuosas que contengan tampones fisiológicamente compatibles tales como citrato, acetato, histidina o fosfato. Cuando sea necesario, dichas formulaciones también pueden contener diversos agentes de ajuste de la tonicidad, agentes solubilizantes y/o agentes estabilizantes (por ejemplo, sales tales como cloruro de sodio, azúcares tales como sacarosa, manitol y trehalosa, proteínas tales como albúmina, aminoácidos tales como glicina y histidina, tensioactivos tales como polisorbatos (Tweens), o cosolventes tales como etanol, polietilenglicol y propilenglicol). Las composiciones de la divulgación también pueden comprender adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión, agentes dispersantes y agentes conservantes. Las composiciones de la divulgación también pueden comprender agentes de suspensión, tales como agar-agar, metahidróxido de aluminio, bentonita, alcoholes isoestearílicos etoxilados, celulosa microcristalina, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, y tragacanto, o mezclas de los mismos.

Las composiciones de la divulgación también pueden comprender diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de composiciones inyectables de la divulgación puede verse afectada por el uso de agentes capaces de retrasar la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones de la divulgación pueden contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), agentes antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido L-metionina-ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio), tampones (tales como acetato de sodio, lactato, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes formadores de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), DPTA), agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas), proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas), agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sal (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbatos tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes potenciadores de

la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino – preferentemente, cloruro de sodio o potasio - o manitol sorbitol), vehículos de suministro, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos.

5 Los componentes de formulación pueden estar presentes a concentraciones que sean aceptables para el sitio de administración. Se pueden usar tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

10 En algunos aspectos, se pueden preparar composiciones farmacéuticas de la divulgación en las que los compuestos de la divulgación se formulan para la liberación controlada o sostenida del compuesto. Los ejemplos incluyen ácido hialurónico y similares, geles poliméricos, perlas, partículas, microesferas inyectables, liposomas, películas, microcápsulas, matrices de liberación sostenida y dispositivos de suministro de fármacos implantables.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se proporcionan en jeringas precargadas de una o varias cámaras.

15 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos un compuesto o una composición de la divulgación junto con al menos un ingrediente adicional adecuado para su uso en una composición farmacéutica. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos un compuesto o una composición de la divulgación junto con al menos un medio de suministro de dicha composición a un paciente. La divulgación también proporciona composiciones que comprenden [FGF21-primer engarce]-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]; en el que FGF21 es un homólogo de FGF21; y Ex4 es un homólogo de Exendina4; y Ab es un anticuerpo catalítico de aldolasa o parte de unión al antígeno del mismo; y el primer engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a proteínas en FGF21 y al sitio de combinación del anticuerpo, y el segundo engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión a péptidos de Exendina4 y al sitio de combinación del anticuerpo, y en el que el primer y el segundo engarce son iguales o diferentes para su uso en una o más terapias descritas en el presente documento. También se proporciona el uso de composiciones de la divulgación en el tratamiento de una o más afecciones descritas en el presente documento. También se proporciona el uso de composiciones de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una o más enfermedades o trastornos como los descritos en el presente documento.

#### Procedimientos de uso

30 Para su uso terapéutico en seres humanos, un anticuerpo humano, humanizado o quimérico humano, o parte de unión al antígeno del mismo es una forma de anticuerpo preferida de la parte de anticuerpo del compuesto o de la composición de la invención.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de la diabetes o una afección relacionada con la diabetes que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación a un sujeto que padece diabetes o una afección relacionada con la diabetes.

35 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de aumento de la secreción de insulina en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de reducción de los niveles de glucemia en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

40 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de la obesidad en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

45 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de control o reducción de los niveles de peso en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de la dislipidemia en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

50 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de la hipertensión en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de la hepatosteatoxis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de la enfermedad cardiovascular en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

5 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de reducción de los niveles de glucagón en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de reducción de los niveles de triglicéridos en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

10 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de aumento de los niveles de ácidos grasos libres no esterificados en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

15 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de reducción de los niveles de colesterol de baja densidad en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de reducción de los niveles de proteína C reactiva en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

20 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de reducción de los niveles de fructosamina en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de control del control glucémico en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

25 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de aumento de los niveles de adiposina en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

30 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de aumento de los niveles de HDL en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación o de un derivado farmacéutico de la misma.

35 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de afecciones relacionadas con la diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatosteatosis o enfermedad cardiovascular; o de control o reducción de los niveles de peso; o de control del control glucémico; o de aumento de la secreción de insulina, o los niveles de ácidos grasos libres no esterificados, HDL o adiposina; o de reducción de los niveles de glucosa, glucagón, triglicéridos, fructosamina, colesterol de baja densidad o proteína C reactiva en sangre; que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica de la divulgación a un sujeto.

40 En algunos aspectos, la divulgación proporciona el uso de una composición o una composición farmacéutica de la invención en la preparación de un medicamento para tratar afecciones relacionadas con la diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatosteatosis o enfermedad cardiovascular; o de control o reducción de los niveles de peso; o de control del control glucémico; o de aumento de la secreción de insulina, o los niveles de ácidos grasos libres no esterificados, HDL o adiposina; o de reducción de los niveles de glucosa, glucagón, triglicéridos, fructosamina, colesterol de baja densidad o proteína C reactiva en sangre.

45 La expresión "dosis terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de compuesto, composición o composición farmacéutica de la invención que genera la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano buscado por un investigador, doctor u otro profesional del sector clínico, que incluye el alivio de los síntomas de una enfermedad o de un trastorno que se esté tratando.

#### **Procedimientos de administración y dosis**

50 Las vías de administración de la composición de la divulgación pueden incluir la administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, SC o intramedulares, así como la administración intratecal, intraventricular directa, IV e intraperitoneal. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa. Las composiciones de la invención se pueden administrar a través de cualquiera de las vías parenterales ya sea por inyección directa de la formulación o por infusión de una mezcla de la formulación de la composición de la divulgación con una matriz de infusión tal como solución salina normal, D5W, solución de Ringer con lactato u otros medios de infusión de uso

común.

5 En el tratamiento de los mamíferos, incluyendo los seres humanos, que tienen diabetes o una afección relacionada con la diabetes (o en algunos aspectos, una o más de las siguientes afecciones: diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatosteatoosis, enfermedad cardiovascular, hiperglucemia, bajos niveles de insulina o cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento o una afección asociada con un síntoma mencionado en el presente documento), se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una composición de la divulgación se puede administrar como una infusión IV diaria de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal. Por consiguiente, algunas realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal. 10 Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 0,75 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 1,0 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 2,5 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 15,0 mg/kg de peso corporal. Las dosis de una composición de la divulgación o un derivado farmacéuticamente aceptable deben administrarse en intervalos de aproximadamente una vez al día a 2 veces a la semana, o como alternativa, de una vez a la semana a una vez al mes. En algunas realizaciones, se administra una dosis para alcanzar concentraciones máximas en plasma de una composición de la divulgación de acuerdo con la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma de aproximadamente 0,002 mg/ml a 30 mg/ml. Esto puede 20 conseguirse mediante la inyección estéril de una solución de los ingredientes administrados en una formulación apropiada (se puede usar cualquier solución de formulación adecuada conocidas por los expertos en la materia de la química). Los niveles en sangre deseables pueden mantenerse mediante una infusión continua de la composición de la divulgación según lo determinado por los niveles en plasma medidos mediante una metodología analítica validada.

25 Un procedimiento de administración de una composición de la invención a un individuo comprende administrar un conjugado de FGF21-engarce al individuo y permitir que se forme un compuesto covalente con un sitio de combinación de un anticuerpo apropiado *in vivo*. La parte de anticuerpo de una composición de la divulgación que se forma *in vivo* se puede administrar al individuo antes, al mismo tiempo o después de la administración del conjugado FGF21-engarce. Como alternativa, o además, un anticuerpo puede estar presente en la circulación del individuo tras 30 la inmunización con un inmunógeno apropiado. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos catalíticos mediante inmunización con un compuesto intermedio reactivo del sustrato conjugado con un vehículo proteico. En particular, los anticuerpos catalíticos de aldolasa se pueden generar mediante la administración con hemocianina de lapa californiana unida a una fracción dicetona.

35 Por lo tanto, la composición se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosis apropiada es realizado rutinariamente por los expertos en la materia, y pertenece al ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por ellos. Pueden determinarse dosis apropiadas mediante el uso de datos apropiados dosis-respuesta.

40 La vía de administración de la composición farmacéutica coincide con procedimientos conocidos, por ejemplo, por vía oral, mediante inyección por vía SC, IV, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación sostenida; o por dispositivos de implantación. Cuando se desea, las composiciones se pueden administrar mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

45 Como alternativa o además, la composición puede administrarse por vía local mediante la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que la molécula deseada ha sido absorbida o encapsulada. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser a través de difusión, bolo de liberación retardada o administración continua.

### Terapias de combinación

50 En otro aspecto, se puede usar una composición de la divulgación en combinación con otros agentes terapéuticos usados para tratar la diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes, o para aumentar la secreción de la insulina o reducir los niveles de glucemia, o para tratar cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento. En una realización, una composición de la divulgación se puede administrar en combinación con insulina, tal como, por ejemplo, insulina humana sintética, incluyendo insulina de acción rápida, de acción corta, de acción intermedia o 55 de larga duración. En otras realizaciones, una composición de la divulgación se puede administrar en combinación con compuestos que pertenecen a las familias de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, sulfonilurea, meglitinida, biguanida o tiazolidindiona (TZD). Las composiciones de la divulgación también pueden administrarse en combinación con proteínas o péptidos modificadores del metabolismo tales como glucoquinasa (GK), proteína reguladora de la glucoquinasa (GKRP), proteínas desacoplantes 2 y 3 (UCP2 y UCP3), glucagón, péptido 1 y 2 de tipo glucagón 60 (Glp1 y Glp2), una exendina (tal como Exendina4), polipéptido inhibidor gástrico (GIP), receptor activado por

proliferador de peroxisoma Glp2  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), receptor de leptina (OB-Rb), inhibidores de DPP-IV, sulfonilureas u otros péptidos incretina. El experto en la materia conocerá una amplia variedad de agentes que se usan actualmente en el tratamiento de la diabetes o de afecciones relacionadas con la diabetes.

5 Para evaluar la posible eficacia terapéutica de una composición de la divulgación o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con otros agentes terapéuticos usados para tratar la diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes, para aumentar la secreción de la insulina o reducir los niveles de glucemia, se pueden ensayar estas combinaciones usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, se puede medir la capacidad de una combinación de una composición de la divulgación y otro agente terapéutico para aumentar la secreción de insulina usando un ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa *in vitro*. En dicho ensayo, las células  $\beta$  pancreáticas se tratan con diversas concentraciones de glucosa durante un período de tiempo determinado, y se miden los niveles de insulina usando procedimientos conocidos en la materia, tales como, por ejemplo, un radioinmunoensayo. El efecto de las composiciones de la divulgación y otros agentes terapéuticos sobre la secreción de insulina también se puede medir *in vivo*, administrando los agentes directamente a un sujeto y midiendo los niveles de insulina en muestras de fluidos corporales en diversos puntos temporales. Los procedimientos de administración de agentes terapéuticos conocidos a un sujeto para su uso en terapias de combinación serán bien conocidos por los proveedores de asistencia médica clínica.

15 Las dosis eficaces de la composición de la divulgación que se administrarán se pueden determinar mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia que aborda parámetros tales como semivida biológica, biodisponibilidad y toxicidad. Las cantidades eficaces de agentes terapéuticos que se van a usar en combinación con la composición de la divulgación o sus derivados farmacéuticamente aceptables se basan en las dosis recomendadas conocidas por los expertos en la materia para estos agentes. Estos niveles recomendados o conocidos se reducirán preferentemente en un 10 % a 50 % de la dosis citada tras el ensayo de la eficacia de estas dosis en combinación con una composición de la divulgación o un derivado farmacéuticamente aceptable. Cabe señalar que el médico tratante sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a dosis más bajas debido a la toxicidad, a disfunciones de la médula ósea, hepáticas o renales o a la interacción farmacológica adversa. El médico tratante también sabría ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica es inadecuada (excluyendo la toxicidad).

20 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad del compuesto suficiente para producir una mejoría de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La concentración eficaz *in vitro* de una composición de la invención se puede determinar midiendo la CE<sub>50</sub>. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos agentes *in vivo* pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y los efectos terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que presentan grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de una selección de dosis para su uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, se puede estimar la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma en circulación que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logre una inhibición semimáxima de la producción de TA a partir de células infectadas en comparación con el control no tratado determinado en cultivo celular). Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en el plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

30 En aquellas realizaciones en las que las composiciones de la divulgación se administran en combinación con otros agentes terapéuticos, el efecto combinado de los agentes se puede calcular mediante el procedimiento de análisis de múltiples fármacos de Chou y Talalay (T. C. Chou y P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55 (1984)) usando la ecuación:

$$CI \equiv \frac{D_1}{(Dx)_1} + \frac{D_2}{(Dx)_2} + \frac{\alpha D_1 D_2}{(Dx)_1 (Dx)_2}$$

35 en la que *CI* es el índice de combinación,  $(Dx)_1$  es la dosis del fármaco 1 necesaria para producir un efecto del x por ciento solo,  $D_1$  es la dosis de fármaco 1 necesaria para producir el mismo efecto del x por ciento en combinación con  $D_2$ . Los valores de  $(Dx)_2$  y  $(D)_2$  se derivan de manera similar del fármaco 2. El valor de  $\alpha$  se determina de la gráfica de la curva de dosis-efecto usando la ecuación del efecto mediano:

$$\frac{fa}{fu} = \left( \frac{D}{Dm} \right)^m$$

5 en la que  $f_a$  es la fracción afectada por la dosis  $D$ ,  $f_u$  es la fracción no infectada,  $D_m$  es la dosis requerida para el 50 % del efecto y  $m$  es la pendiente de la curva de dosis-efecto. Para fármacos que se excluyen entre sí (es decir, modos de acción similares), ambos fármacos solos y sus líneas paralelas en el gráfico del efecto mediano. Los fármacos que no se excluyen entre sí (es decir, modo de acción independiente) darán líneas paralelas en el gráfico del efecto medio, pero en mezcla darán una curva ascendente cóncava. Si los agentes se excluyen entre sí,  $\alpha$  es 0, y si no se excluyen entre sí,  $\alpha$  es 1. Los valores obtenidos asumiendo la no exclusividad mutua siempre serán ligeramente superiores a los fármacos que se excluyen entre sí. Los valores de  $CI < 1$  indican sinergia, los valores  $> 1$  indican antagonismo y los valores iguales a 1 indican efectos aditivos. Los efectos de fármacos combinados también se pueden calcular usando el paquete de software CalcuSyn de Biosoft (Cambridge, RU).

10 Los compuestos de acuerdo con la divulgación pueden estar solvatados, en especial, hidratados. La hidratación puede producirse durante la fabricación de los compuestos o de las composiciones que comprenden los compuestos, o la hidratación puede ocurrir a lo largo del tiempo debido a la naturaleza higroscópica de los compuestos. Los compuestos de la divulgación pueden estar liofilizados.

15 La divulgación también proporciona estereoisómeros, tautómeros, solvatos, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de la divulgación. La divulgación también proporciona compuestos de acuerdo con cualquiera de las secuencias desveladas en el presente documento.

**Definiciones**

20 "Aproximadamente", cuando se usa en relación con una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95 % para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor.

Aib es ácido 2-aminoisobutírico, y tiene la estructura:



25 "Homólogo de Exendina4" significa una molécula con identidad del al menos 80 %, y preferentemente del al menos 85 %, más preferentemente del al menos 90 % y lo más preferentemente del al menos 95 % con la Exendina4 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 35), y que se une al receptor del péptido de tipo glucagón 1 (GLP1R) con una afinidad igual o superior a la de la Exendina4 de tipo silvestre, o en al menos 2 log por debajo. Los homólogos de Exendina4 incluyen variantes (que comprenden eliminaciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos naturales) y derivados (que comprenden adiciones y sustituciones de aminoácidos no naturales y/o modificación química adicional). En algunos aspectos, el homólogo de Exendina4 se puede seleccionar de una de las secuencias de Ex4 proporcionadas en el presente documento.

35 La expresión "homólogo de Exendina4" significa una molécula con identidad del al menos 80 %, y preferentemente del al menos 85 %, más preferentemente del al menos 90 % y lo más preferentemente del al menos 95 % con FGF21 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2), y que se une a cada uno de los receptores de FGFR1c and  $\beta$ -Klotho con una afinidad igual o superior a la de FGF21 de tipo silvestre, o en al menos 2 log por debajo. Los homólogos de FGF21 incluyen variantes (que comprenden eliminaciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos naturales) y derivados (que comprenden adiciones y sustituciones de aminoácidos no naturales y modificación química adicional). También se incluyen polimorfismos conocidos (tales como P/L<sup>146</sup>). En algunos aspectos, el homólogo de FGF21 se puede seleccionar de una de las secuencias de FGF21 proporcionadas en el presente documento.

**SECUENCIAS**

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	Género de FGF21 x1 = H o ausente, x146 = L o P.	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAXPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
2	FGF21Δ H H1 ausente, L146.	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
3	Género mutante Cys de FGF21 1 x1= H o ausente, x79 = D o C, x125 = H o C, x129 = A o C, x146= P o L	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPxG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPxRDPxP RGPAPFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
4	Género mutante Cys de FGF21 2 x1= H o ausente, x125 = C o H, x129 = A o C, x146 = L o P	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPxRDPxP RGPAPFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
5	Género H125C de FGF21 X1= H o ausente,H125C,x146 = L o P	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPCRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
6	FGF21ΔH-H125C-L146 H1 ausente H125C P146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPCRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAPPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
7	FGF21ΔH-H125C H1 ausente H125C L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPCRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
8	Género A129C de FGF21 x1= H o ausente,A129C, x146 = L o P	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPCP RGPAPFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
9	FGF21ΔH-A129C-L146H1 ausente, A129C, P146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPCP RGPAPFLPLP GLPPAPPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
10	FGF21Δ H-A129C H1 ausente, A129C, L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPCP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
11	Género D79C de FGF21 x1= H o ausente,D79C, x146 = P o L	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPCG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
12	FGF21ΔH-D79CH1 ausente, D79C, L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPCG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
13	FGF21ΔH-D79C-L146H1 ausente, D79C, P146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPCG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAPPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
14	FGF21ΔH-L86CH1 ausente, L86C, L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSCHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
15	FGF21ΔH-T40CH1 ausente, T40C, L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGC VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
16	FGF21Δ H-H1C H1C, L146	CPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
17	Género mutante Lys de FGF21 x1 = ausente o H, x56, x59, x69, x122= K o R, R69, x146=L o P	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLxALxP GVIQILGVxT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG N <sub>x</sub> SPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPA <sub>x</sub> PEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
18	FGF21Δ H-K56-K59R-K69R-K122R- L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLKALRP GVIQILGVRT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NRSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
19	FGF21ΔH-K59 K56R-K69R-K122R-L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLRALKP GVIQILGVRT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NRSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
20	FGF21ΔH-K69 K56R-K59R-K122R-L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLRALRP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NRSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
21	FGF21ΔH-K122 K56R-K59R-K69R-L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLRALRP GVIQILGVRT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
22	FGF21ΔH-Knull-P2 K56R-K59R-K69R-K122R-L146	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLRALRP GVIQILGVRT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NRSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
23	FGF21Δ H-Knull-H1K H1K-K56R-K59R- K69R-K122R-L146	KPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLRALRP GVIQILGVRT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NRSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS
24	FGF21ΔH-Knull-S181K K56R-K59R- K69R-K122R- L146-S181K	-PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGGAADQSPE SLLQLRALRP GVIQILGVRT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NRSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYAK
25	Cadena ligera de h38C2	ELQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNR FSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFCSQGTHLP YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
26	Cadena pesada de h38C2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTGIYYCKT YFYSFSYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLTGTQYI CNVNHKPSNT KVDKRVPEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDV SHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
27	VL h38C2	ELQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNR FSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFCSQGTHLP YTFGGGTKVE IK
28	VH h38C2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTGIYYCKT YFYSFSYWGQ GTLVTVSS
29	VL m38C2	DVVMTQTPLS LPVRLGDQAS ISCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDLGV YFCSQGTHLP YTFGGGTKLE IK
30	VH m38C2	EVKLVESGGG LVQPGGTMKL SCEISGLTFR NYWMSWVRQS PEKGLEWVAE IRLRSDNYAT HYAESVKGKF TISRDDSKSR LYLQMNSLRT EDTGIYYCKY YFYSFSYWGQ GTLVTVSA
31	(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub>	GGGGSGGGG SGGGGS
32	FGF21 líder	MNSNETGFEGH SGLWVSVLAG LLLGACQA

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
33	Secuencia de 209 restos de FGF21, isoforma L174 (L146)	MNSNETGFEH SGLWVSVLAG LLLGACQAH IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPEL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPD GAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS
34	Glp-1 (1227)	HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFAIWLVKGR
35	Exendina4	HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
36	Homólogo de Ex4 x2 = Aib	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
37	Homólogo de Ex4 x40 (PLR) = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina,	HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS <sub>x</sub>
38	Homólogo de Ex4 x2 es Aib x40 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina, o está ausente	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS <sub>x</sub>
39	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x38 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPP <sub>x</sub> S
40	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x36 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGA <sub>x</sub> PPS
41	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x34 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSS <sub>x</sub> APPPS
42	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x32 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG P <sub>x</sub> SGAPPPS
43	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x28 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLK <sub>x</sub> GG PSSGAPPPS
44	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x27 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWL <sub>x</sub> NGG PSSGAPPPS
45	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x26 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEW <sub>x</sub> KNGG PSSGAPPPS
46	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x24 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LF <sub>i</sub> <u>x</u> WLKNGG PSSGAPPPS
47	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x23 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LF <sub>x</sub> <u>E</u> WLKNGG PSSGAPPPS

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
48	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x21 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR <u>x</u> FIEWLKNGG PSSGAPPPS
49	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x20 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAV <u>x</u> LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
50	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x19 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEE <u>A</u> xR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
51	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x17 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEE <u>x</u> AVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
52	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x16 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQME <u>x</u> EAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
53	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x14 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQ <u>x</u> EEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
54	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x13 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SK <u>x</u> MEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
55	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x12 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL S <u>x</u> QMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
56	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x11 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina,	HxEGTFTSDL <u>x</u> KQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
57	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x31 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG <u>x</u>
58	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x21 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR <u>x</u> FIEWLKNGG PSS
59	Homólogo de Ex4 x1 es d-His, x2 es Aib PLR@x14 = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S, homoserina	<u>xx</u> EGTFTSDL SKQ <u>x</u> EEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
60	Homólogo de Ex4 x2 es Aib x40 cuando está presente es cualquier aminoácido y está unido a través del extremo carboxi-terminal o una cadena lateral a un engarce, y cuando x40 está ausente, uno de x12, x14, x19, x20, x21 es un PLR seleccionado del grupo K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, homocisteína S y homoserina, y cuando no es un PLR, x12 = K, x14 = M, x19 = V, x20 = R, x21 = L	HxEGTFTSDL SxQxEEEEAx xFIEWLKNGG PSSGAPPPSx
61	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@12 = K	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
62	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@x12 = KSH; [u = 2].	HxEGTFTSDL SxQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
63	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@14 = K; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQKEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
64	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@14 = KSH; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQxEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
65	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@19 = K; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAKR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
66	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@19 = KSH; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAxR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
67	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@20 = K; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVK LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
68	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@20 = KSH; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVx LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
69	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@21 = K; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR K FIEWLKNGG PSSGAPPPS
70	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@21 = KSH; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR x FIEWLKNGG PSSGAPPPS
71	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@40 = K; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSK
72	Homólogo de Ex4 x2 es Aib PLR@40 = KSH; [u = 2].	HxEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSx
73	Género P171C de FGF21 x1 = H o ausente, x146 = L o P	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAxPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG CSQGRSPSYA S
74	FGF21Δ H-P171C X1 = H o ausente, L146, P171C	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPALPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG CSQGRSPSYA S

(Continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
75	FGF21Δ H-P171C X1 = H o ausente, P146, P171C,	xPIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDGT VGAADQSPE SLLQLKALKP GVIQILGVKT SRFLCQRPDG ALYGSLHFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG NKSPHRDPAP RGPAPFLPLP GLPPAPPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG CSQGRSPSYA S
76	HC de h38C2-IgG2:	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTGIYYCKT YFYSFSYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
77	Homólogo de Ex4 X1 es C(O)CH <sub>3</sub> x3 es Aib x15 = PLR@15=KSH; [u=2]. X41=NH <sub>2</sub>	<b>xHxEGTFTSD LSKQxEEEAV RLFIEWLKNG GPSSGAPPPSx</b>
78	Género de región constante de h38C2-IgG1C x46=V o A, x84=V o L	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ WKVDNXLQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKxYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
79	Región constante de h38C2-IgG1C Km(1)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ WKVDNVLQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
80	Región constante de h38C2-IgG1C Km(1,2)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKLYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
81	Región constante de h38C2-IgG1C Km(3)	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
82	Región constante de HC de H38C2 IgG1	AS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

La SEQ ID NO: 1 muestra la proteína expresada en el resto 181, en la que H<sup>1</sup> es opcional y el resto 146 puede ser L o P. Las posiciones de los restos ensayadas para la conjugación están subrayadas y en negrita. La numeración para SEQ ID NO: 1 se usa en todas partes.

- 5 También se muestran la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada (SEQ ID NO: 25 y 26, respectivamente) de una realización de una IgG1 38c2 humanizada. Las regiones variables (VC y VH) están subrayadas y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se presentan en negrita. La lisina 99, cuya cadena lateral se combina covalentemente con los engarces descritos en el presente documento, está adyacente a CDR3 de HC.

**Breve descripción de las figuras**

- Figura 1. Alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de m38c2, h38c2 y líneas germinales humanas. Las regiones marco conservadas (FR) y las CDR se definen de acuerdo con Kabat y col. Los asteriscos marcan las diferencias entre m38c2 y h38c2 o entre h38c2 y las líneas germinales humanas.
- 5 Figura 2A, 2B y 2C. Estudios farmacocinéticos de una sola dosis en ratones con Ab-FGF21ΔH-A129C conjugado con engarce-1 (L-1) en comparación con L-2, L-3 o L-4. Se administraron a ratones macho adultos Swiss-Webster bien IV o SC 3 mg/kg. En todos los casos, el conjugado con L-1 se comportó mejor con respecto a la semivida (~33 h SC e IV para conjugado con L-1, 13-23 h SC y 22-37 h IV para los conjugados con L-2, L-3 y L-4) y/o biodisponibilidad SC (~100 % para conjugado con L-1, 48-53 % para conjugados con L-2, L-3 o L-4).
- 10 Figura 3A. Estudio farmacocinético de una sola dosis en ratas con Ab-FGF21ΔH-A129C conjugado con L-1 en comparación con L-2. Se administraron a ratas macho adultas Sprague Dawley bien IV o SC 3 mg/kg. Para ambas vías de administración, el conjugado con L-1 se comportó mejor que el conjugado con L-2 con respecto a la semivida (~39 h SC y ~60 h IV para conjugado con L-1, ~33 h SC y ~52 h IV para conjugado con L-2) y biodisponibilidad SC (~52 % para conjugado con L-1, 36 % para conjugado con L-2). Figura 3B. Comparación de la farmacocinética de Ab-L1-FGF21ΔH-D79C, Ab-L7-FGF21ΔH-D79C y Ab-L8-FGF21ΔH-D79C.
- 15 Figuras 4A y 4B. Área bajo la curva (AUC) de glucosa durante el ensayo de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) en ratones ob/ob administrando una sola dosis SC (AUC de glucosa media (% del control de vehículo) entre corchetes): Vehículo [100], FGF21ΔH (1 mg/kg [74]), FGF21ΔH (0,6 mg/kg [103]) (no se muestra en la Figura 4B por motivos de claridad), Ab-FGF21ΔH-H125C (3 mg/kg [66] y 1 mg/kg [87]) (conjugado con L1), Ab-FGF21ΔH-K59 (3 mg/kg [105]) (conjugado con L5), Ab-FGF21ΔH-Knull-H1K (3 mg/kg [100]) (conjugado con L5), control de delgados [56]. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  frente a PBS mediante ANOVA de una vía.
- 20 Figura 5A y 5B. Cambio en el peso corporal acumulado (A) y peso del hígado (B) durante el OGTT en ratones ob/ob que han recibido una sola dosis SC (peso corporal medio (g) entre corchetes, peso medio del hígado (g) entre llaves): Vehículo [2,6] {2,4}, FGF21ΔH (1 mg/kg [2,5] {2,2}), FGF21ΔH (0,6 mg/kg [3,2] {2,4}), Ab-FGF21ΔH-A129C (3 mg/kg [1,7] {2,0}) (conjugado con L1), Ab-FGF21ΔH-K59 (3 mg/kg [2,7] {2,4}) (conjugado con L5), Ab-FGF21ΔH-Knull-H1K (3 mg/kg [2,6] {2,4}) (conjugado con L5), control de delgados [0,6] {1,0}. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  frente a PBS mediante ANOVA de dos vías (A) y ANOVA de una vía (B).
- 25 Figura 6A. Cambio en el peso corporal acumulado en ratones ob/ob que han recibido una sola dosis (peso corporal medio (g) entre corchetes): Vehículo [1,7], FGF21ΔH [1,9], FGF21ΔH-D79C (2 mg/kg [2,1]), Ab-FGF21ΔH-D79C (10 mg/kg [1,4]), Ab-FGF21ΔH-H125C (10 mg/kg [0,8]) y Ab-FGF21ΔH-A129C (10 mg/kg [0,9]), vehículo de delgados [0,6]. d0: día 0. Todos los conjugados de Ab usaron L1. \*\* $p < 0,01$  frente a PBS mediante ANOVA de dos vías.
- 30 Figura 6B. AUC de glucosa durante el OGTT en ratones ob/ob que han recibido una sola dosis (% de AUC de glucosa medio entre corchetes): vehículo [100], FGF21ΔH [63], Ab-FGF21ΔH-D79C (2 mg/kg [86]), FGF21ΔH-D79C (10 mg/ml [54]), Ab-FGF21ΔH-H125C (10 mg/ml [51]) y Ab-FGF21ΔH-A129C (10 mg/kg [54]), control de delgados [48]. Todos los conjugados de Ab usaron L1. \*\* $p < 0,01$  frente a vehículo mediante ANOVA de una vía.
- 35 Figura 6C. AUC de glucosa durante el OGTT en ratones ob/ob que han recibido FGF21ΔH y Ab-FGF21ΔH-D79C, (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-D79C se conjugó con el engarce-1. \*\* $p < 0,01$  frente al vehículo.
- 40 Figura 6D. AUC de glucosa durante el OGTT en ratones ob/ob que han recibido FGF21ΔH y Ab-FGF21ΔH-D79C (10 mg/kg) el día 6. Ab-FGF21ΔH-D79C se conjugó con el L1. \*\* $p < 0,01$  frente ob/ob-PBS.
- 45 Figura 6E. AUC de glucosa durante el OGTT realizado el día 6 en ratones ob/ob que han recibido una sola dosis de Ab-FGF21ΔH-A129C el día 0, 1, 2 o 3 (3 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con el L1. \*\* $p < 0,05$  frente a PBS mediante ANOVA de una vía.
- 50 Figura 6F. Una sola dosis de Ab-FGF21ΔH-A129C aumenta la expresión de Ucp1 en tejido adiposo blanco en ratones ob/ob (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1.
- 55 Figura 6G. Una sola dosis de Ab-FGF21ΔH-A129C reduce los triglicéridos hepáticos en ratones ob/ob (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con el L1. \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente a vehículo mediante ANOVA de una vía.
- 60 Figura 6H. Cambio en el peso corporal acumulado en ratones ob/ob que han recibido una sola dosis de Ab-FGF21ΔH-A129C el día 0, 1, 2 o 3 (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1.
- 65 Figura 7A. La dosis repetida de Ab-FGF21ΔH-A129C (10 mg/kg el día 0 y 7) mejora la tolerancia a la glucosa en ratones DIO. El OGTT se realice el día 10. Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía.
- Figura 7B. Cambio en el peso corporal acumulado en ratones DIO que han recibido dos dosis de Ab-FGF21ΔH-A129C el día 0 y 7 (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1. \* $p < 0,05$ , frente al vehículo mediante ANOVA de dos vías.
- Figura 7C. La dosis repetida de Ab-FGF21ΔH-A129C aumenta la expresión de Ucp1 en tejido adiposo blanco en ratones DIO (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1. \*\* $p < 0,01$ , frente al vehículo mediante ANOVA de una vía.
- Figura 7D. Ab-FGF21ΔH-A129C reduce los triglicéridos en suero en ratones DIO (10 mg/kg). Figura 7E. Ab-FGF21ΔH-A129C reduce los ácidos grasos no esterificados en suero en ratones DIO (10 mg/kg). Figura 7F. Ab-FGF21ΔH-A129C peso corporal. Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo (A, B) y frente a PBC (C) mediante ANOVA de una vía.
- Figure 7G, 7H, 7I. Efecto de Ab-FGF21ΔH-A129C en la expresión de genes hepáticos en ratones ob/ob. (7G) SCD1: esteroil-CoA desaturasa 1, (7H) MOGAT2: monoacilglicerol aciltransferasa 2 (7i) FoxA2: factor de

transcripción de la familia forkhead A2. Ab-FGF21ΔH-A129C se conjugó con L1.  $**p < 0,01$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía.

Figura 8. Glucemia durante el OGTT 3 días después de la repetición de la inyección SC de compuestos en ratones db/db. Ab[FGF21]<sub>2</sub>= h38C2(IgG2)-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub>. Ab[Ex4]<sub>2</sub>= h38C2(IgG1)-[SEQ ID NO: 64-L1]<sub>2</sub>. ABC-1= [SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>-[h38C2-IgG1]-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>.

**Ejemplos**

La versatilidad de la invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que ilustran realizaciones típicas de la invención y no son limitantes de las reivindicaciones ni de la memoria descriptiva de ningún modo.

**Ejemplo 1. Identificación del sitio de unión óptimo en FGF-21**

Se realizó un estudio para identificar el sitio óptimo para la conjugación de FGF21 a través de un engarce a un sitio de combinación de anticuerpo catalítico. Se consideraron dos estrategias de conjugación: conjugación a través de una cadena lateral de lisina superficial y conjugación a través de una cadena lateral de cisteína superficial. En general, las proteínas globulares no tienen restos de cisteína sin emparejamiento en su superficie y, por tanto, la incorporación de una sola cisteína en la superficie de la proteína se puede usar para el diseño en un solo sitio para una conjugación específica. Sin embargo, la mutación de restos superficiales con cisteína suele poder causar problemas tales como la dimerización intermolecular, apareamiento erróneo de enlaces disulfuro nativos e interferencia con la unión al receptor. Por estas razones, la conjugación de proteínas es más comúnmente afectada a través de los restos de lisina.

**Modelización de homología del receptor de FGF21 y su mecanismo de activación**

FGF21 se une tanto a FGFR1c como a FGFR4, pero el complejo de receptor solo se puede activar a través de FGFR1c. Aunque FGFR1b y FGFR1c comparten el 87 % de identidad (FGFR1 b es idéntico a FGFR1 c excepto para la región de corte y empalme alternativo IIIb/c), FGF21 solo reconoce específicamente FGFR1 c. En el presente documento, la modelización de homología de la estructura compleja de FGF21-FGFR1 c se realizó mediante el uso de la estructura cristalina de FGFR2-FGFR1 c como molde. Se usó el software MOE para la modelización de homología y los análisis estructurales. La activación del receptor requiere otro receptor de la superficie celular, βKlotho. βKlotho tiene dos dominios que son muy similares (~35 % idénticos) a la β-glucosidasa citosólica humana. Se modelizó la estructura de βKlotho humana usando β-glucosidasa citosólica humana, y se alineó la estructura en la estructura modelizada de FGF21-FGFR1c alineado. Esta estructura compleja modelizada proporcionó pautas racionales para los sitios óptimos de conjugación de lisina y la incorporación óptima de restos de cisteína en FGF21, que no debería interrumpir las superficies de contacto de unión entre FGF21 y FGFR1c y entre FGF21 y βKlotho.

Para la selección de sitios de conjugación se usaron los siguientes criterios: (1) los restos deben exponerse al solvente en la estructura tanto como sea posible; (2) los restos deben estar lejos del enlace de disulfuro; (3) los restos deben estar lejos de las superficies de unión del receptor y β-Klotho.

La exposición al disolvente se puede evaluar basándose en el área superficial accesible (ASA). El cálculo de ASA a partir de la estructura modelizada de FGF21 se realizó con el software CCP4 ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". (1994) *Acta Cryst.* D50, 760-763) y un programa interno. En pocas palabras, el programa del CCP4 calcula un valor en angstroms al cuadrado por resto en su archivo de registro. Para calcular la fracción de ASA (fASA), se usó un programa interno para normalizar ASA por resto. La Tabla 1 muestra los restos de ASA así como de fASA. No se incluyen los restos cuya cadena lateral se prevé que oscurezca la superficie. La columna 1 es el nombre del aminoácido, 2 es el número del resto, 3 es ASA (en angstrom al cuadrado), 4 es la fracción expuesta. El valor de fASA define la accesibilidad del disolvente al resto de aminoácido en un polipéptido dado. Un valor de fASA cercano a cero indica que se predice que el resto es inaccesible al disolvente, lo que sugiere que es más improbable que sea accesible a los engarces para la conjugación. Se usó un valor de fASA mínimo absoluto de 0,3, con valores de área superficial > 1,00, que sugieren sitios de conjugación de candidatos particularmente probables.

Basándose en el análisis de ASA, K122 (área superficial de 164,4) y K59 (área superficial de 117,2) se consideraron los sitios candidatos más prometedores para la conjugación. K69 (área superficial 91) y K56 (área superficial 73) también se conjugaron con fines comparativos.

**Tabla 1. Comparación de los restos superficiales de FGF21**

Aminoácido	Número de resto	Área superficial	Fracción expuesta	Aminoácido	Número de resto	Área superficial	Fracción expuesta
GLY	14	105,2	1,25387	PHE	88	123	0,55083
GLN	15	158,5	0,83774	ASP	89	50,7	0,32626
VAL	16	81,5	0,50216	PRO	90	107,5	0,7424
ARG	17	91,6	0,36743	GLU	91	121,5	0,64904

(Continuación)

Aminoácido	Número de resto	Área superficial	Fracción expuesta	Aminoácido	Número de resto	Área superficial	Fracción expuesta
ARG	19	78,6	0,31528	ARG	96	92,6	0,37144
ALA	26	93,9	0,8067	LEU	98	114	0,57576
GLN	27	126,5	0,66861	LEU	99	113,2	0,57172
GLN	28	169,4	0,89535	GLU	101	182,1	0,97276
THR	29	64,2	0,43349	ASP	102	94,6	0,60875
GLU	30	103,9	0,55502	GLY	103	56,1	0,66865
GLU	37	117,1	0,62553	GLN	108	72,6	0,38372
ASP	38	90,5	0,58237	GLU	110	132,4	0,70727
THR	40	49,8	0,33626	ALA	111	62,7	0,53866
GLY	43	38,1	0,45411	GLY	113	56,8	0,677
ALA	45	93,6	0,80412	LYS	122	164,4	0,79229
ASP	46	95	0,61133	PRO	124	67,4	0,46547
PRO	49	82,4	0,56906	HIS	125	168,4	0,84836
GLN	54	66,8	0,35307	ARG	126	131,4	0,52708
LYS	56	73	0,35181	PRO	128	91,3	0,63053
ALA	57	46,6	0,40034	ALA	129	78,8	0,67698
LEU	58	82,7	0,41768	ARG	131	225,5	0,90453
LYS	59	117,2	0,56482	GLY	132	65,8	0,78427
PRO	60	153,8	1,06215	PRO	133	84,9	0,58633
GLY	61	27,9	0,33254	ARG	135	106,2	0,42599
VAL	68	58,8	0,36229	GLY	141	30,4	0,36234
LYS	69	91	0,43855	LEU	142	69,1	0,34899
SER	71	69	0,54893	PRO	143	71,4	0,49309
ARG	77	129,4	0,51905	ALA	145	86,4	0,74227
PRO	78	98,9	0,68301	LEU	146	123,3	0,62273
ASP	79	109,8	0,70656	PRO	147	131,1	0,90539
TYR	83	84,4	0,35418	GLU	148	67,3	0,35951
LEU	86	119,4	0,60303	PRO	149	170	1,17403
HIS	87	104,8	0,52796				

**Ejemplo 2. Generación de proteínas y mutantes de FGF21**

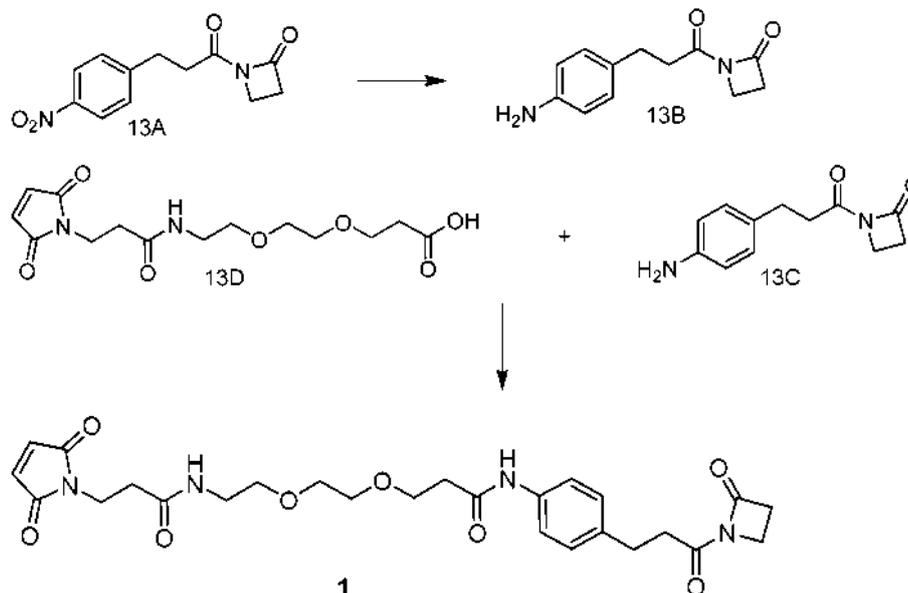
5 El ADNc de FGF21 se adquirió de la ATCC. Los vectores de expresión de mamíferos y bacterianos se construyeron usando pcDNA3.1 (Invitrogen®) y pET21 b (EMD), respectivamente. Para las variantes mutacionales de FGF21, se introdujeron mutaciones en los vectores de expresión usando un kit de mutagénesis dirigida QuikChange® (Stratagene®). La presencia de las mutaciones deseadas se verificó mediante secuenciación de ADN.

10 Para la expresión de mamíferos, se transfectaron células HEK293F (Invitrogen®) con el vector de expresión de mamífero de FGF21 usando reactivo de 293fectina (Invitrogen®) y se cultivaron en medio exento de suero. Se sometieron a diálisis los medios acondicionados filtrados en condiciones estériles contra el tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y se cargaron en una columna HiTrap Q (GE Healthcare®) preequilibrada con tampón A. Se eluyó la proteína FGF21 con un gradiente lineal desde el tampón A hasta el tampón B (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, y NaCl

100 mM). Se concentró la fracción combinada y se cargó sobre Sephadex 300 con solución salina de tampón fosfato (PBS, pH 7,4). La solución proteica resultante se concentró y se almacenó por debajo de -80 °C. La pureza se confirmó mediante SDS-PAGE y RP-HPLC.

5 Para la producción de FGF21 ΔH a partir de *E. coli*, se transformó el vector de expresión bacteriano en la cepa huésped BL21-(DE3)-RIL (Stratagene®). Se cultivaron las células transformadas en 1 litro de medio LB a 37 °C y se inició la expresión mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM. Tras 4 h, se cosecharon las células y se congelaron a -20 °C. Se suspendió la pasta celular congelada en tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5), y se pasó a través del microfluidizador 4 veces. Tras 30 minutos de centrifugación a 17.000 x g, 4 °C, se volvió a suspender el sedimento que contenía el cuerpo de inclusión (IB) en Tris 50 mM, pH 7,5. Se centrifugó la suspensión de IB lavada (30 min, 17.000 x g, 4 °C). El sedimento de IB se almacenó a -80 °C. Se disolvió el sedimento de IB congelado con urea 7 M, DTT 5 mM y bis-tris propano 50 mM, pH 10,5 a 1 a 10 mg/ml de FGF21 y se agitó durante 1 h para disolver y reducir la proteína. A continuación, se diluyó el IB solubilizado 10 veces en Bis-Tris propano 50 mM, pH 8,0. La concentración final de proteína fue de 0,1 a 1 mg/ml. Se agitó la solución durante ~2 días y se sometió a diálisis contra 4 litros de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. La solución de proteína se centrifugó a 14.000 x g durante 30 min. Se cargó el sobrenadante a HiTrap Q HP (GE Healthcare®) y se equilibró con tampón A (véase más arriba). Se lavaron las proteínas bacterianas no unidas con tampón A, y se eluyó la proteína FGF21 con un gradiente lineal de tampón B. A continuación, se cargó la fracción FGF21 en una columna HP quelante HiTrap (GE Healthcare®) preequilibrada con tampón PBS. Se eluyó la proteína FGF21 con un gradiente lineal de PBS a tampón PBS más imidazol 100 mM (el pH se ajustó a 7,4). Se recogieron las fracciones y se concentraron (hasta 50 mg/ml) y se aplicó la solución de proteína a una columna de exclusión de tamaño (Hiload 26/60, superdex 300) equilibrada con PBS (Gibco®, pH 7,4). Se esterilizó la proteína purificada con un filtro de 0,22 μm y se almacenó a -80 °C. El rendimiento típico de FGF21ΔH a partir de medio de cultivo de 8 l resultó ser de 600 ~ 700 mg. La pureza típica fue > 95 %. El nivel de endotoxina típico fue ~1 UE/mg. Se produjeron los mutantes de cisteína y lisina a arginina de FGF21 y se purificaron de una manera similar a FGF21ΔH. Un rendimiento típico de proteína purificada fue de 350 ~ 400 mg. La cisteína libre se confirmó usando el reactivo de Ellman.

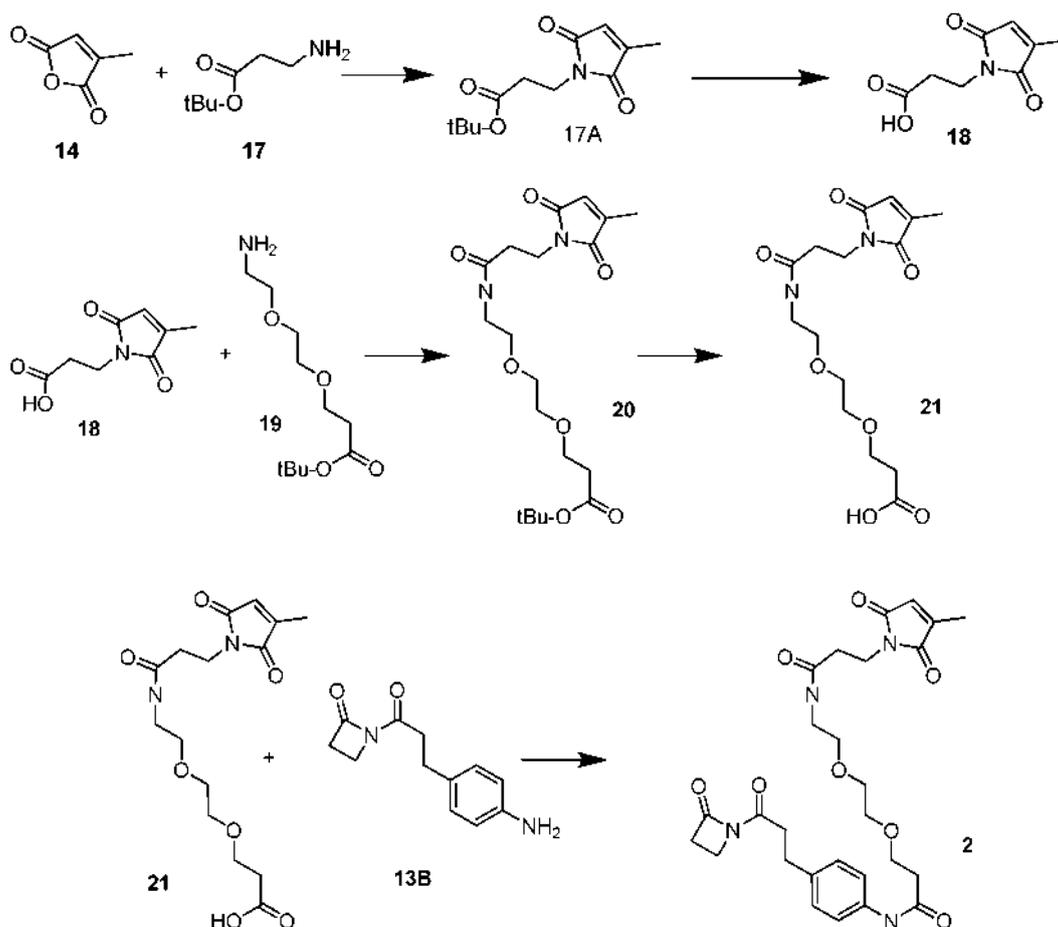
### Ejemplo 3. Síntesis del Engarce 1



Síntesis del Engarce 1: se añadió paladio sobre carbono (por ejemplo, aproximadamente 1,0 g, aproximadamente 0,47 mmol) en una parte, seguido de ácido clorhídrico (por ejemplo, aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 30,2 mmol) gota a gota a una suspensión de **13A** (por ejemplo, aproximadamente 5 g, aproximadamente 20,1 mmol) en metanol (por ejemplo aproximadamente 200 ml) a aproximadamente 35 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Se bombeó lentamente hidrógeno a la solución a aproximadamente 35 °C y se agitó la solución durante aproximadamente 2 horas a esa temperatura. Se filtró el sólido a través de un lecho de celite y se recogió. Se concentró el filtrado a presión reducida y se secó el sólido al vacío, dando **13B** en forma de sal de clorhidrato. Se mezcló el compuesto **13B** con diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 200 ml) y una solución saturada de bicarbonato de sodio (por ejemplo, aproximadamente 250 ml), y se separó la capa de diclorometano. Se lavó la capa de diclorometano con cloruro de sodio saturado (por ejemplo, aproximadamente 250 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Se filtró capa orgánica, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, acetato de etilo al aproximadamente 60 % en hexanos), dando un rendimiento del aproximadamente 68 % (por ejemplo, aproximadamente 2,94 g) de **13C**. Se agitó una solución de **13C** (por ejemplo, aproximadamente 4,65 g, aproximadamente 21,3 mmol), **13D** (por ejemplo, aproximadamente 7,00 g, aproximadamente 21,3 mmol) de

- 5 clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (por ejemplo, aproximadamente 3,3 g, aproximadamente 21,3 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (por ejemplo, aproximadamente 2,75 g, aproximadamente 21,3 mmol) en diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 200 ml) a aproximadamente 0°C bajo nitrógeno durante 5 minutos y a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. Se lavó la capa orgánica con solución diluida de bicarbonato de sodio y solución saturada de cloruro de sodio, se concentró al vacío y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, acetonitrilo), proporcionando el Engarce 1 (por ejemplo, aproximadamente 8,25 g con un rendimiento del aproximadamente 73 %).

#### Ejemplo 4. Síntesis del Engarce 2



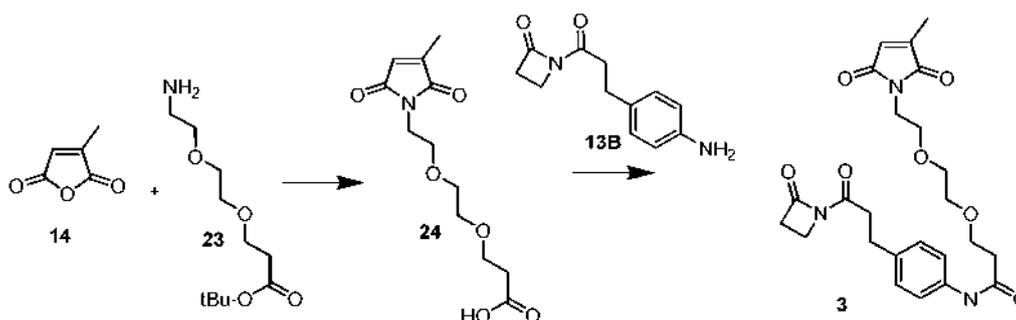
- 10
- 15 Se agitó una solución de anhídrido citracónico, **14** (por ejemplo, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 6,7 mmol),  $\beta$ -alanina, **17** (por ejemplo, aproximadamente 1,5 g, aproximadamente 16,7 mmol) en DMF (por ejemplo, aproximadamente 10 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 h. A continuación, se enfrió la solución de reacción hasta aproximadamente 0 °C y se añadió una solución de DMF (por ejemplo, aproximadamente 10 ml) que contenía diisopropilcarbodiimida (por ejemplo, aproximadamente 2,6 ml, aproximadamente 16,7 mmol) y HOBT (por ejemplo, aproximadamente 1,9 g, aproximadamente 16,7 mmol). Se añadió diisopropiletilamina (por ejemplo, aproximadamente 5 eq., aproximadamente 83,5 mmol) y se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante otras aproximadamente 16 horas. Se vertió la reacción en agua, se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con acetato de etilo (por ejemplo aproximadamente 3 x aproximadamente 30 ml). Se lavó la capa orgánica con agua (por ejemplo, aproximadamente 2 x aproximadamente 30 ml) y salmuera (por ejemplo, aproximadamente 30 ml), y después se secó sobre sulfato de sodio. Se eliminó el disolvente al vacío y se purificó la mezcla en bruto por cromatografía en columna. Se combinaron las fracciones deseadas y se concentraron a presión reducida, dando **17A**.
- 20
- 25 Se agitó el Compuesto **17A** (por ejemplo, aproximadamente 0,5 g, aproximadamente 2,09 mmol) en ácido trifluoroacético al aproximadamente 15 % en diclorometano a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas y se concentró a sequedad bajo presión reducida. Se añadió el ácido libre **18** a *N*-hidroxisuccinimida (por ejemplo, aproximadamente 0,25 g, aproximadamente 2,09 mmol) en tetrahidrofurano (por ejemplo, aproximadamente 20 ml), seguido de diisopropilcarbodiimida (por ejemplo, aproximadamente 0,33 ml,

aproximadamente 2,09 mmol), y se agitó durante aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente. Se separó la diisopropilurea por filtración. El filtrado se evaporó a sequedad. Se añadió éter de petróleo (por ejemplo, aproximadamente 30 ml) al resto, se trituró, se agitó, y se decantó la capa de éter de petróleo. Se repitió este procedimiento una vez más con éter de petróleo, y el producto **18** se secó al vacío.

5 Se añadió amina-peg2-t-butiléster, **19** (por ejemplo, aproximadamente 0,5 g, 2,09 mmol) a una solución en THF del **18** activado seguido de DIPEA en exceso (por ejemplo, aproximadamente 3 equivalentes). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora y se purificó por HPLC-MS, recogiendo una masa de 343 y 399. Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y se liofilizaron para recoger **20**. Se disolvió el resto en ácido trifluoroacético al aproximadamente 15 % en diclorometano y unas cuantas gotas de agua, y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Se concentró la reacción hasta aproximadamente 1 ml y se trató con agua, haciendo precipitar el producto. El material en bruto se purificó usando EM-HPLC, produciendo **21** (M + 343).

15 Se agitó una solución de ácido **21** (por ejemplo, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 0,18 mmol), HBTU (por ejemplo, aproximadamente 137 mg, aproximadamente 0,36 mmol) y clorhidrato de anilina **13B** (por ejemplo, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 0,18 mmol), diisopropiletilamina (por ejemplo, aproximadamente 0,14 ml, aproximadamente 0,90 mmol) en DMF (por ejemplo, aproximadamente 2 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos y se purificó en EM-HPLC. Se combinó la fracción deseada y se concentró para recoger **L2** (por ejemplo, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 0,03 mmol).

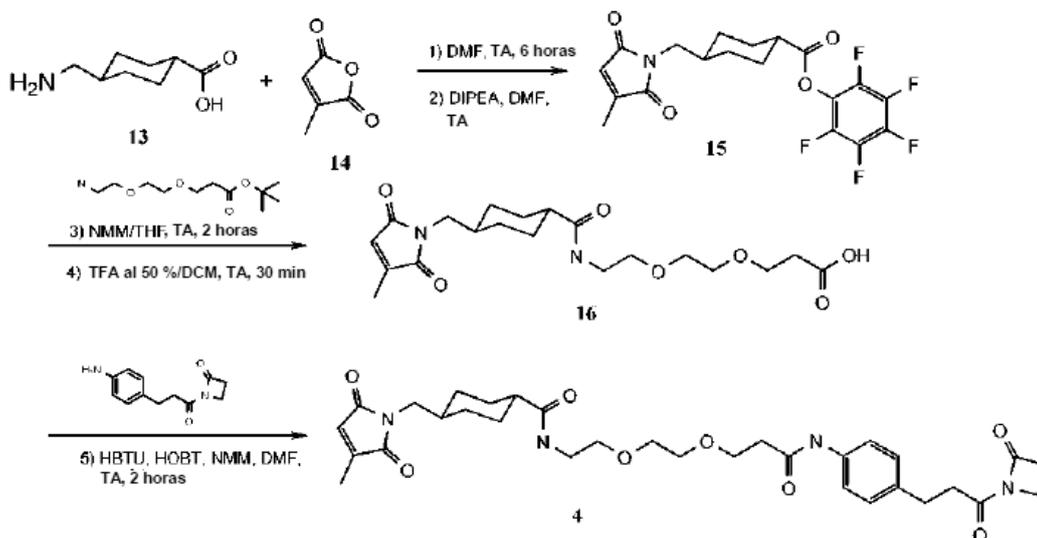
### Ejemplo 5. Síntesis del Engarce 3



20 Se agitó una solución de anhídrido citracónico, **14** (por ejemplo, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 16,4 mmol), amine-peg2-t-butyl-ester **23** (por ejemplo, aproximadamente 1,0 g, aproximadamente 4,2 mmol) en DMF (por ejemplo, aproximadamente 10 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h. Se añadieron diisopropilcarbodiimida (por ejemplo, aproximadamente 0,8 ml, aproximadamente 5,2 mmol) y HOBT (por ejemplo, aproximadamente 0,7 g, aproximadamente 6,1 mmol), y se calentó la reacción hasta aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 2 horas. Se dejó enfriar la reacción hasta temperatura ambiente durante la noche se filtró la urea. Se vertió el filtrado en agua y se extrajo con DCM. Se lavó la capa orgánica con salmuera y se concentró hasta formar aceite. Se disolvió el producto en bruto en HCl 6 N al aproximadamente 50 % en acetonitrilo para desproteger el ácido. Se disolvió el producto en DMF, se filtró y se purificó usando HPLC-MS para recoger **24** (por ejemplo, aproximadamente 208 mg, aproximadamente 0,7 mmol).

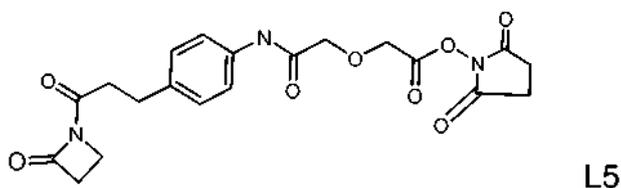
35 A una solución de maleimida, **24** (por ejemplo, aproximadamente 0,16 g, aproximadamente 0,6 mmol) y clorhidrato de anilina **13B** (por ejemplo, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 0,6 mmol) en DMF, se añadió HBTU y DIEA en exceso (por ejemplo aproximadamente más de 3 equivalentes de cada uno). Se purificó el material en bruto a través de aproximadamente 2 inyecciones en una EM-HPLC. Se combinaron las fracciones deseadas que contenían el material más puro y se liofilizaron para recoger **L3** (por ejemplo, aproximadamente 17,3 mg, aproximadamente 36,7 mmol).

## Ejemplo 6. Síntesis del Engarce 4



- Se agitó una solución de anhídrido citracónico (**14**, por ejemplo, aproximadamente 510 mg, aproximadamente 4,55 mmol) y ácido *trans*-4-aminometilciclohexano-carboxílico (**13**, por ejemplo, aproximadamente 716 mg, aproximadamente 4,55 mmol) en dimetilformamida (por ejemplo, aproximadamente DMF, aproximadamente 5 ml) bajo nitrógeno (N<sub>2</sub>) a temperatura ambiente durante aproximadamente 6 horas. Se enfrió la solución de reacción hasta aproximadamente 0 °C, y se añadieron DIPEA (por ejemplo, aproximadamente 1,98 ml, aproximadamente 11,4 mmol) seguido de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (por ejemplo, aproximadamente 1,96 ml, aproximadamente 11,4 mmol) en DMF (por ejemplo, aproximadamente 3 ml). Se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante otras 16 horas aproximadamente bajo N<sub>2</sub>. Se filtró el sólido y se vertió la sustancia filtrada en aproximadamente 30 ml de agua, se extrajo con diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 2 x aproximadamente 30 ml), y se secó la capa de diclorometano sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se eliminó el disolvente al vacío y se purificó la mezcla en bruto por cromatografía en columna, produciendo aproximadamente 550 mg del éster de pentafluorofenilo intermedio (**15**, por ejemplo, aproximadamente 29 % de rendimiento).
- Se añadió *N*-metilmorfolina (por ejemplo, aproximadamente 290 µl, aproximadamente 2,64 mmol) a la solución del éster pentafluorofenílico intermedio (**15**, por ejemplo, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 1,32 mmol) y *tert*-butiléster de ácido 3-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-propiónico (por ejemplo, aproximadamente 295 mg, aproximadamente 1,32 mmol) en tetrahydrofurano (THF, por ejemplo aproximadamente 5 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Se eliminó el disolvente al vacío, y el residuo se disolvió en DMF y se purificó mediante HPLC de purificación de masa dirigida. Se trató el *tert*-butiléster intermedio obtenido con ácido trifluoroacético al aproximadamente 50 % en diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 4 ml) durante aproximadamente 30 minutos. Se eliminó el disolvente al vacío, y el residuo se purificó mediante HPLC de purificación de masa dirigida, proporcionando aproximadamente 300 mg del ácido intermedio **16** en forma de un sólido blanco (por ejemplo, rendimiento del aproximadamente 55 %; EM: 411,2 (M+H<sup>+</sup>)).
- Se agitó una solución del ácido intermedio **16** (por ejemplo, aproximadamente 33 mg, aproximadamente 0,08 mmol), 1-[3-(4-amino-fenil)-propionil]-azetidín-2-ona (**13B** por ejemplo, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 0,08 mmol), HOBT (por ejemplo, aproximadamente 61 mg, aproximadamente 0,16 mmol) y *N*-metilmorfolina (por ejemplo, aproximadamente 44 µl, aproximadamente 0,4 mmol) en DMF (por ejemplo, aproximadamente 1 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Se purificó la mezcla en bruto mediante HPLC de purificación de masa dirigida, proporcionando **L4** en forma de un aceite incoloro (por ejemplo, aproximadamente 22 mg, rendimiento del 45 %; EM: 611,4 (MH<sup>+</sup>)).

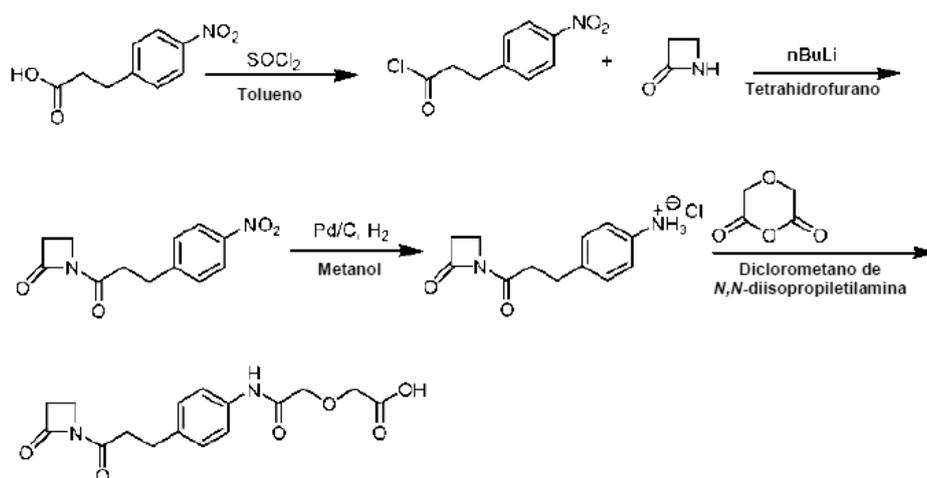
## Ejemplo 7. Síntesis del Engarce 5



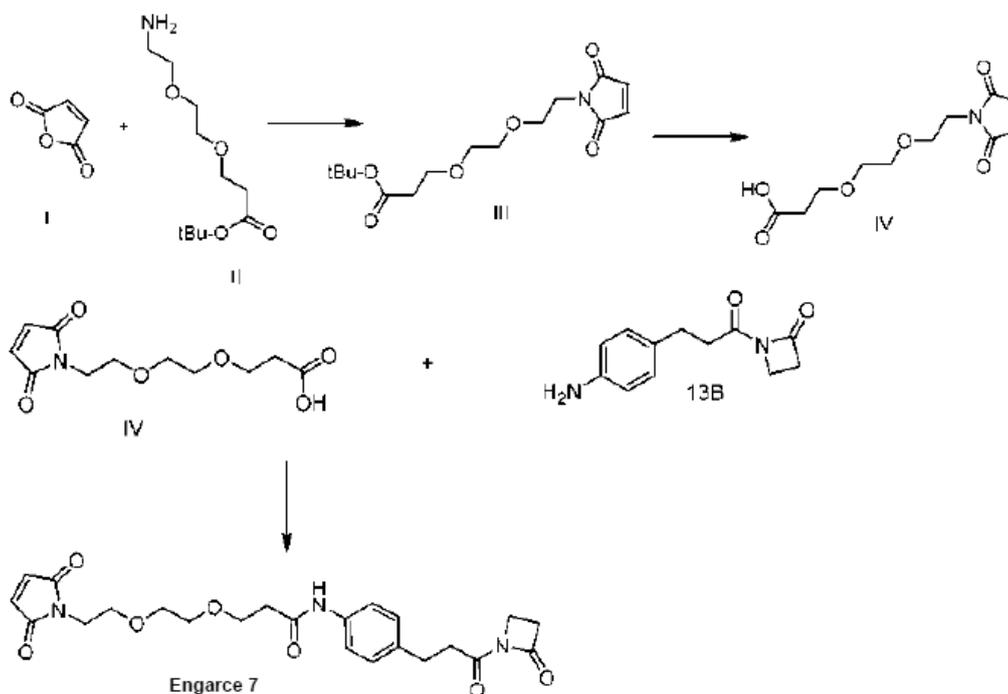
5 Se añadió diisopropilcarbodiimida (por ejemplo, aproximadamente 3,11 ml, aproximadamente 19,86 mmol, aproximadamente 2,95 eq) a una solución de Engarce 6 (por ejemplo, aproximadamente 6,63 g, aproximadamente 20,69 mmol, aproximadamente 3,07 eq) y *N*-hidroxisuccinimida (por ejemplo, aproximadamente 2,29 g, aproximadamente 19,86 mmol, aproximadamente 2,95 eq) en tetrahidrofurano seco (por ejemplo aproximadamente 500 ml) a aproximadamente 0 °C. Se agitó la mezcla a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 1 hora y después se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el disolvente al vacío y se lavó el residuo con éter de petróleo (por ejemplo aproximadamente 2 x aproximadamente 200 ml) y se secó el polvo al vacío durante aproximadamente 2 horas, y se usó en las etapas subsiguientes.

**Ejemplo 8. Síntesis del Engarce 6**

10



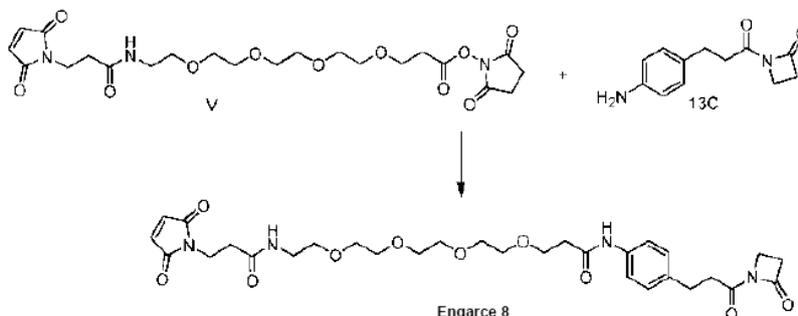
**Ejemplo 9. Síntesis del Engarce 7**



15 Se agitó una solución de I (por ejemplo, aproximadamente 438 mg, aproximadamente 4,47 mmol) y II (por ejemplo aproximadamente 1,04 g, aproximadamente 4,47 mmol) en dimetilformamida (por ejemplo, aproximadamente 25 ml) en una atmósfera de nitrógeno durante aproximadamente 2,5 horas. Se enfrió la reacción hasta aproximadamente 0 °C usando un baño de hielo. Se añadieron 1-hidropirrolidin-2,5-diona (por ejemplo, aproximadamente 647 mg,

aproximadamente 5,62 mmol) y clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (por ejemplo, aproximadamente 1,71 g, aproximadamente 8,92 mmol), y se agitaron a aproximadamente temperatura ambiente durante la noche. Se diluyó la capa orgánica con diclorometano, se lavó con agua, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo al aproximadamente 75 % en hexanos hasta metanol al aproximadamente 5 % en diclorometano, proporcionando **III** (por ejemplo, aproximadamente 767 mg). Se agitó una solución de **III** (por ejemplo, aproximadamente 573 mg, aproximadamente 1,83 mmol) en diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 15 ml) y ácido trifluoroacético (por ejemplo, aproximadamente 1,16 ml) durante aproximadamente 9,5 horas aproximadamente a temperatura ambiente. Se concentró el material a presión reducida y se secó sobre una bomba de vacío durante la noche, proporcionando **IV**. Se disolvió **IV** en bruto en diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 15 ml) y dimetilformamida (aproximadamente 2 gotas), y se agitó con cloruro de oxalilo (por ejemplo, aproximadamente 465 mg, aproximadamente 3,66 mmol) durante aproximadamente 2 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se secó el aceite al vacío durante 1 hora. Se disolvió el aceite en diclorometano (por ejemplo, aproximadamente 15 ml) y se agitó con **13B** (por ejemplo aproximadamente 464 mg, aproximadamente 1,83 mmol) y diisopropiletilamina (por ejemplo, aproximadamente 2,9 ml, aproximadamente 16,5 mmol) en nitrógeno durante aproximadamente 30 minutos. Se lavó la capa orgánica con solución saturada de bicarbonato de sodio, solución saturada de cloruro de sodio, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo al aproximadamente 85 % en hexanos hasta acetato de etilo al aproximadamente 100 %), proporcionando el Engarce 7 (por ejemplo, aproximadamente 323 mg, aproximadamente 39 %).

#### 20 Ejemplo 10. Síntesis del Engarce 8



Se agitó una solución de **V** (por ejemplo, aproximadamente 980 mg, aproximadamente 1,91 mmol), **13C** (por ejemplo aproximadamente 484 mg, aproximadamente 1,91 mmol), diisopropiletilamina (por ejemplo, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 11,5 mmol) en diclorometano durante aproximadamente 6 horas aproximadamente a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente otro 1 eq de **13C** (por ejemplo, aproximadamente 484 mg, aproximadamente 1,91 mmol) y aproximadamente 3 eq de diisopropiletilamina (por ejemplo, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 5,73 mmol), y se agitó aproximadamente a temperatura ambiente durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con solución saturada de bicarbonato de sodio, solución saturada de cloruro de sodio, se secó (sulfato de sodio), se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo al aproximadamente 100% hasta metanol al aproximadamente 5 % en acetato de etilo hasta metanol al aproximadamente 10 % en acetato de etilo), proporcionando el Engarce 8 (por ejemplo, aproximadamente 285 mg, aproximadamente 24 %).

#### Ejemplo 11. Conjugación de proteína y engarce

Se hicieron reaccionar proteínas mutantes de FGF21 con el engarce relevante a una proporción molar 1:10 a temperatura ambiente durante 2 horas. Todas las proteínas FGF21 unidas a un engarce se purificaron después usando columna PD-10, y también intercambiado en Tris-HCl 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0.

#### Ejemplo 12. Conjugación de complejo de proteína-engarce con anticuerpo

Todas las proteínas FGF21 unidas a un engarce se fusionaron con IgG1 h38C2 (SEQ ID NO: 25 y 26) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0) a una proporción molar de 6:1 a temperatura ambiente durante la noche. Los complejos de proteína-engarce-anticuerpo se purificaron mediante SEC. La eficacia de la conjugación se confirmó mediante análisis de EMCL.

#### Ejemplo 13. Ensayo de producción de proteínas

Todas las proteínas FGF21 se expresaron en *E. coli*. Se encontraron proteínas FGF21 expresadas en bacterias en cuerpos de inclusión. Tras someter las células a lisis y retirar el sobrenadante, se disolvieron los sedimentos en urea 7 M, Bis-Tris propano 50 mM, pH 10,5 a 4 °C. Se diluyeron los cuerpos de inclusión solubilizados en Bis-Tris propano 50 mM, glutatión oxidado 10 mM, pH 9,0 y se agitó durante 2 horas, seguido de diálisis contra Tris-HCl

20 mM, pH 7,5 a 4 °C durante una noche. Las fracciones solubles se purificaron mediante columna HiTrap Q. Las proteínas se caracterizaron por análisis de SDS-PAGE. Los niveles de expresión de los mutantes de lisina fueron de 10-50 mg/l.

#### Ejemplo 14. Ensayo Taqman de Glut1

5 Se usaron adipocitos 3T3-L1 diferenciados para medir la expresión de ARNm de Glut1 mediante el procedimiento qPCR. Se trataron los adipocitos 3T3-L1 diferenciados los días 10-14 privados de suero durante la noche con compuestos durante 6 h. Se extrajo el ARN total de estas células, y se midió la expresión de ARNm de Glut1 y GAPDH usando un kit de RT-PCR de Quantitect Probe, y se realizó una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real en una máquina Taqman (Applied Biosystems®). Se determinó la bioactividad de los compuestos mediante un cambio en los niveles de ARNm de Glut1 normalizados por los niveles de ARNm de GAPDH de cada muestra. Se obtuvieron los valores de  $CE_{50}$  como mediciones de la potencia de los compuestos a partir de las curvas de respuesta a la dosis en el ensayo.

#### Ejemplo 15. Ensayo de captación de glucosa

15 Se trataron adipocitos 3T3-L1 diferenciados con compuestos en ausencia de suero durante 24 h. A continuación, se incubaron las células con  $^{14}C$ -2-desoxiglucosa durante 1 hora, y se cuantificó la captación de glucosa en las células en el instrumento Wallac 1450 MicroBeta (Trilux). La captación de glucosa se expresó en recuentos por minuto (CPM). Se obtuvieron los valores de  $CE_{50}$  como mediciones de la potencia de los compuestos a partir de las curvas de respuesta a la dosis en el ensayo.

#### Ejemplo 16. Farmacocinética de ratones

20 Se examinaron las PK de los conjugados de anticuerpo FGF21 en ratones después de la administración IV o SC. Se inyectaron conjugados de anticuerpo en ratones machos adultos jóvenes Swiss-Webster (20-25 g), y se obtuvieron muestras de sangre en puntos de tiempo de 5 minutos a 120 horas tras la dosificación. Se determinaron las concentraciones de conjugados de anticuerpo en suero usando un ELISA que capturó la parte de FGF21 de los conjugados de anticuerpo a través de un anticuerpo monoclonal anti-hFGF21 unido a una placa de 96 pocillos. Se detectaron conjugados de anticuerpo FGF21 unidos a la placa a través de un anticuerpo monoclonal anti-hFc y se determinaron las concentraciones usando una curva patrón de la solución de dosificación de PK diluida en tampón de ensayo que contenía suero. Se calculó la biodisponibilidad SC como la proporción del área bajo la curva (AUC) del perfil de concentración en suero SC dividido entre la AUC del perfil de concentración en suero IV.

#### Ejemplo 17. Eficacia en ratones

30 Se evaluó la eficacia de los conjugados de anticuerpo FGF21 en dos modelos murinos obesos resistentes a la insulina-ratones ob/ob y ratones obesos inducidos por dieta alta en grasas. Para ambos modelos, los ratones macho (6-8 semanas de vida para ob/ob, 12-14 semanas de vida para DIO con dieta rica en grasas iniciada a las 6 semanas de vida) se alojaron 2-4/jaula, y se administraron conjugados de anticuerpo FGF21 por inyección SC. El peso corporal se midió diariamente por la mañana. La tolerancia a la glucosa se evaluó mediante ensayo de tolerancia oral a la glucosa. En resumen, se mantuvieron los ratones en ayunas durante 4-5 horas la mañana del día del ensayo. Se obtuvo una muestra de sangre basal y se determinaron los niveles de glucemia usando un glucómetro portátil. Tras la muestra basal, se administró glucosa por sonda oral y se extrajeron muestras de sangre de 15 a 120 minutos después. Se calculó la tolerancia a la glucosa como el AUC desde el punto basal hasta el punto de tiempo de 120 minutos.

#### 40 Ejemplo 18. Actividad de Ab K56-L5-FGF21ΔH-K56

Se generó FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R (SEQ ID NO: 18) y se purificó como se ha descrito anteriormente. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R resultó ser potente en el ensayo Taqman de Glut1 ( $CE_{50}$  = 0,9 nM; n = 2). La captación de glucosa resultó ser de 5,5 nM. Se combinó FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R con L5 en K56 y se conjugó con h38C2 como se describe para formar Ab-L5-FGF21ΔH-K56. Ab-L5-FGF21ΔH-K56 conservó la potencia en el ensayo Taqman de Glut1 ( $CE_{50}$  = 1,9 nM; n = 1), y mostró una semivida IV de 17 horas y una semivida SC de 13 h. La biodisponibilidad fue del 66 %.

#### Ejemplo 19. Actividad de Ab K59-L5-FGF21ΔH-K59

50 Se generó FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R (SEQ ID NO: 19) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH- K56R-K59-K69R-K122R resultó ser potente en el ensayo Taqman de Glut1 ( $EC_{50}$  = 0,6 nM; n = 1). La captación de glucosa fue de 0,9 nM. Se combinó FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R con L5 en K59 y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-K59. Ab-L5-FGF21ΔH-K59 conservó la potencia en el ensayo Taqman de Glut1 ( $CE_{50}$  = 6,5 nM; n = 2), y mostró una semivida IV de 13 horas.

**Ejemplo 20. Actividad de Ab K69-L5-FGF21ΔH-K69**

Se generó FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R (SEQ ID NO: 20) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R resultó ser potente tanto en el ensayo Taqman de Glut1 ( $CE_{50}$  = 1,3 nM; n = 1) como en el ensayo de captación de glucosa ( $CE_{50}$  = 5,2 nM). Se combinó FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R con L5 en K69 y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-K69.

**Ejemplo 21. Actividad de Ab K122-L5-FGF21ΔH-K122**

Se generó FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 (SEQ ID NO: 21) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 resultó ser potente tanto en el ensayo Taqman de Glut1 ( $CE_{50}$  = 2,6 nM; n = 2) como en el ensayo de captación de glucosa ( $CE_{50}$  = 1,7 nM). Se combinó FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 con L5 en K122 y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-K122. Ab-L5-FGF21ΔH-K122 conservó la potencia *in vitro* ( $CE_{50}$  = 1,6 nM en el ensayo Taqman de Glut1; n = 2), y mostró una semivida IV de 16 horas y una semivida SC de 14 h. La biodisponibilidad fue del 40 %.

**Ejemplo 22. Actividad de K-null-Ab P2-L5-FGF21ΔH-Knull-P2**

Se generó FGF21ΔH-Knull-P2 (SEQ ID NO: 22) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-Knull-P2 fue potente en el ensayo Taqman de Glut 1 ( $CE_{50}$  = 1,2 nM; n = 2). Se combinó FGF21ΔH-Knull-P2 en el extremo N' de P2 con L5, y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2 mostró una reducida potencia *in vitro* ( $CE_{50}$  = 16,6 nM en el ensayo Taqman de Glut 1; n = 1) y una semivida IV de 17 horas.

**Ejemplo 23. Actividad de Knull-H1K Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K**

Se generó FGF21ΔH-Knull-H1K (SEQ ID NO: 23) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-Knull-H1K fue potente en el ensayo Taqman de Glut 1 ( $CE_{50}$  = 6,4 nM; n = 2). Se combinó FGF21ΔH-Knull-H1K con L5 en H1K, y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K. FGF21ΔH-Knull-H1K conservó la potencia *in vitro* ( $CE_{50}$  = 4,3 nM en el ensayo Taqman de Glut1; n = 2), y mostró una semivida IV de 16 horas, una semivida SC de 11 horas y una biodisponibilidad SC del 51 %.

**Ejemplo 24. Actividad de K-null-Ab S181K-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K**

Se generó FGF21ΔH-Knull-S181 (SEQ ID NO: 24) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-Knull-S181K fue potente en el ensayo Taqman de Glut 1 ( $CE_{50}$  = 7,5 nM; n = 2). Se combinó FGF21ΔH-Knull-S181K con L5 en S181, y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181 K. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K mostró una pérdida de potencia *in vitro* ( $CE_{50}$  → 500 nM en el ensayo Taqman de Glut1; n = 2).

**Ejemplo 25. Resumen de los resultados de actividad de los mutantes de lisina**

Todas las proteínas mutantes de lisina fueron activas en el ensayo Taqman de Glut1. Cuando se conjugaron, la mayoría de los conjugados (K56, K59, K122, Knull-H1K) conservaron la actividad en el ensayo de Taqman, con valores de  $CE_{50}$  similares a los de la proteína FGF21 nativa. El conjugado Knull-P2 mostró cierta reducción en la potencia inicial, y el conjugado Knull-S181K mostró pérdida de actividad en el ensayo Taqman.

**Ejemplo 26. Identificación de los sitios de unión óptimos en FGF21 usando conjugación de cisteína-maleimida**

Uno de los desafíos cuando se introduce una mutación de sustitución de cisteína como resto de unión es que el resto de cisteína puede encontrarse en contacto con otros restos y/o formar un enlace salino o puente de hidrógeno. Aunque puede ser difícil predecir las distancias a nivel de átomo usando estructuras modelizadas, se seleccionó una serie de restos basándose en el potencial de estar distalmente situados de los sitios de unión de FGFR1c y βKlotho: His1, Thr40, Asp79, Leu86, His125 y Ala129.

Los seis restos son distintos entre sí en términos de elementos estructurales (giro y bucle), área superficial accesible (ASA) y forma del ambiente (convexa y cóncava), y todos se modelizaron en el lado opuesto de la proteína a las interacciones de FGFR1c (Tabla 2). En particular, His1, Asp79, Leu86 y His125 se identificaron como sitios de conjugación potencialmente atractivos debido a los altos valores de ASA asociados con estos sitios.

**Tabla 2.** Comparación de los restos candidatos en cuanto a la sustitución de cisteína

Restos	Estructura	Forma	% de ASA	ASA	Sitio de βKlotho
His1	desordenada	ND	ND		
Thr40	cadena β	cóncava	34	49,8	menos lejos
Asp79	Giro β	convexa	71	109,8	lejos

(Continuación)

Restos	Estructura	Forma	% de ASA	ASA	Sitio de $\beta$ Klotho
Leu86	cadena $\beta$	convexa	60	119,4	Menos lejos
His125	desordenada	convexa	85	169,4	lejos
Ala129	desordenada	cóncava	68	78,8	lejos

**Ejemplo 27 H1C FGF21 $\Delta$ H-H1C**

5 Se generó FGF21 $\Delta$ H-H1C (SEQ ID NO: 16) y se expresó. Sin embargo, los mutantes de FGF21 $\Delta$ H-H1C carecían de la grupo cisteína en N', y por lo tanto, se interrumpió la investigación de este mutante.

**Ejemplo 28 T40C FGF21 $\Delta$ H-T40C**

10 La generación de FGF21 $\Delta$ H-T40C (SEQ ID NO: 15) presentó desafíos importantes. La mutación con cisteína de treonina en la posición 40 provocó múltiples especies de FGF21 $\Delta$ H-T40C en RP-HPLC después de replegarse. Se hicieron otros intentos por mejorar el procedimiento de replegamiento cambiando la concentración de proteína y el pH, con y sin adición de glutatión. El procedimiento de replegamiento se monitorizó mediante RP-HPLC. La adición de glutatión produjo un replegamiento eficaz de T40C; sin embargo, se encontró que el glutatión estaba unido a FGF21, muy probablemente a través de la cisteína introducida en la posición 40. El aducto de glutatión mostró la misma actividad biológica que el FGF21AH de tipo silvestre, lo que indica que la posición 40 no está implicada en la activación del receptor por FGF21.

**Ejemplo 29. Actividad de Ab D79C-L1-FGF21 $\Delta$ H-D79C**

15 Se generó FGF21 $\Delta$ H-D79C (SEQ ID NO: 12) y se purificó como se ha descrito. FGF21 $\Delta$ H-D79C fue potente en el ensayo Taqman de Glut 1 (CE50 = 2,1 nM; n = 4). FGF21 $\Delta$ H-D79C se combinó con L1 en D79C y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L1-FGF21 $\Delta$ H-D79C. Ab-L1-FGF21 $\Delta$ H-D79C conservó la potencia *in vitro* (CE50 = 3,7 nM en el ensayo Taqman de Glut1; n = 3), y mostró una semivida IV de entre 17 y 19 horas (n = 2), una semivida SC de 20 y 20 horas (n = 2) y biodisponibilidad SC de 55 % y 70 (n = 2).

**Ejemplo 30. Ensayo de estabilidad de FGF21 $\Delta$ H-D79C**

25 Se produjo proteína mutante FGF21 $\Delta$ H-D79C en *E. coli* y se purificó como se ha descrito anteriormente. Se expresó FGF21 $\Delta$ H-D79C a partir de 1 l de cultivo. Se obtuvo un cuerpo de inclusión de 150 mg y se obtuvieron 85 mg de proteína purificada, lo que representa un rendimiento del 60 %. Para ensayar la estabilidad de FGF21 $\Delta$ H-D79C, así como de FGF21 $\Delta$ H (SEQ ID NO: 2), se mantuvieron las muestras recién descongeladas a 4 °C durante siete días, y se examinaron para determinar su integridad mediante RP-HPLC, SEC\_HPLC, ensayo de Ellman y SDS-PAGE el día 0, 3 y 7. Se encontró que FGF21 $\Delta$ H-D79C es estable a pH 7,4 neutro: solo se observaron pequeñas cantidades de FGF21 $\Delta$ H-D79C oxidadas y dimerizadas incluso tras siete días de incubación a 4 °C, mientras que más de la mitad de FGF21 $\Delta$ H-D79C se oxidó a pH 6,0 más bajo tras tres días de incubación a 4 °C. PBS (pH 7,4) y Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM (pH 7,5) no generaron ninguna diferencia significativa de estabilidad de FGF21 $\Delta$ H-D79C.

30 No es evidente por qué la cisteína libre de FGF21 $\Delta$ H-D79C fue más estable a pH 7,4 que a pH 6,0. El punto isoelectrónico (pI) calculado de FGF21 WT fue de 5,43 (e.e., FGF21-H1-P146); el pI de FGF21 $\Delta$ H fue de 5,27; y el pI de FGF21 $\Delta$ H-D79C fue de 5,47. Es posible que la solubilidad de FGF21 $\Delta$ H-D79C pueda reducirse a pH 6,0. La estabilidad de FGF21 $\Delta$ H-D79C se examinó mediante múltiples ciclos de congelación/descongelación. Las proteínas se volvieron a congelar (-80 °C) y descongelar (4 °C) 9 veces. Ninguna de las muestras mostró ninguna diferencia entre 1 ciclo y 9 ciclos en RP-HPLC, SEC y ensayo de Ellman. En conclusión, FGF21 $\Delta$ H-D79C pareció ser significativamente menos estable a 4 °C que a -80 °C

**Ejemplo 31. L86C FGF21 $\Delta$ H-L86C**

40 Se generó FGF21 $\Delta$ H-L86C (SEQ ID NO: 14) y se purificó como se ha descrito. Aunque la mayoría de los restos hidrófobos están enterrados en núcleos de proteína, algunos restos se exponen al disolvente, lo que puede causar la insolubilidad de la proteína. Leu86 es un resto hidrófobo, y aparece disolvente expuesto en la estructura modelizada de FGF21. Se postuló que la mutación L86C puede proporcionar beneficios de solubilidad.

45 La mutación L86C dio como resultado un replegamiento ineficaz y un bajo rendimiento proteico. La adición de glutatión dio lugar a un replegamiento eficaz de L86C; sin embargo, se encontró que más de un glutatión estaba unido a una molécula de FGF21, lo más probablemente a través del C86, introducido así como restos de cisteína nativos. El aducto de glutatión mostró aproximadamente 10 veces la reducción de la actividad biológica, y por lo tanto, la investigación de FGF21 $\Delta$ H-L86C se interrumpió.

**Ejemplo 32. Actividad de Ab H125C-L1-FGF21ΔH-H125C**

Se generó FGF21ΔH-H125C (SEQ ID NO: 7) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-H125C fue potente en el ensayo Taqman de Glut 1 ( $CE_{50} = 1,2$  nM;  $n = 3$ ). FGF21ΔH-H125C se combinó con L1 y se conjugó con h38C2 en H125C para formar Ab-L1-FGF21ΔH-H125C. Cuando se conjugó, Ab-L1-FGF21ΔH-H125C conservó la potencia *in vitro* ( $CE_{50} = 3,2$  nM en el ensayo Taqman de Glut1;  $n = 4$ ), y mostró una semivida IV de entre 37 horas, una semivida SC de 32 horas y biodisponibilidad SC del 67 %.

**Ejemplo 33. Actividad de Ab A129C-L1-FGF21ΔH-A129C**

Se generó FGF21ΔH-A129C (SEQ ID NO: 10) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-A129C fue potente en el ensayo Taqman de Glut 1 ( $CE_{50} = 1,4$  nM;  $n = 6$ ). FGF21ΔH-A129C se combinó con L1 en A129C y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. Ab-L1-FGF21ΔH-A129C conservó la potencia *in vitro* ( $CE_{50} = 2,7$  nM en el ensayo Taqman de Glut1;  $n = 7$ ), y mostró una semivida IV de 33 horas, una semivida SC de 37 horas y biodisponibilidad SC del 69 % (en ratones). Ab-L1-FGF21ΔH-A129C mostró una semivida IV en ratas de 60 horas, una semivida SC en ratas de 39 horas y biodisponibilidad SC en ratas del 52 %. En monos, la semivida IV fue de 65 horas, la semivida SC fue de 48 horas y la biodisponibilidad SC fue del 68 %.

**Ejemplo 34. Mejora de la pureza de endotoxinas**

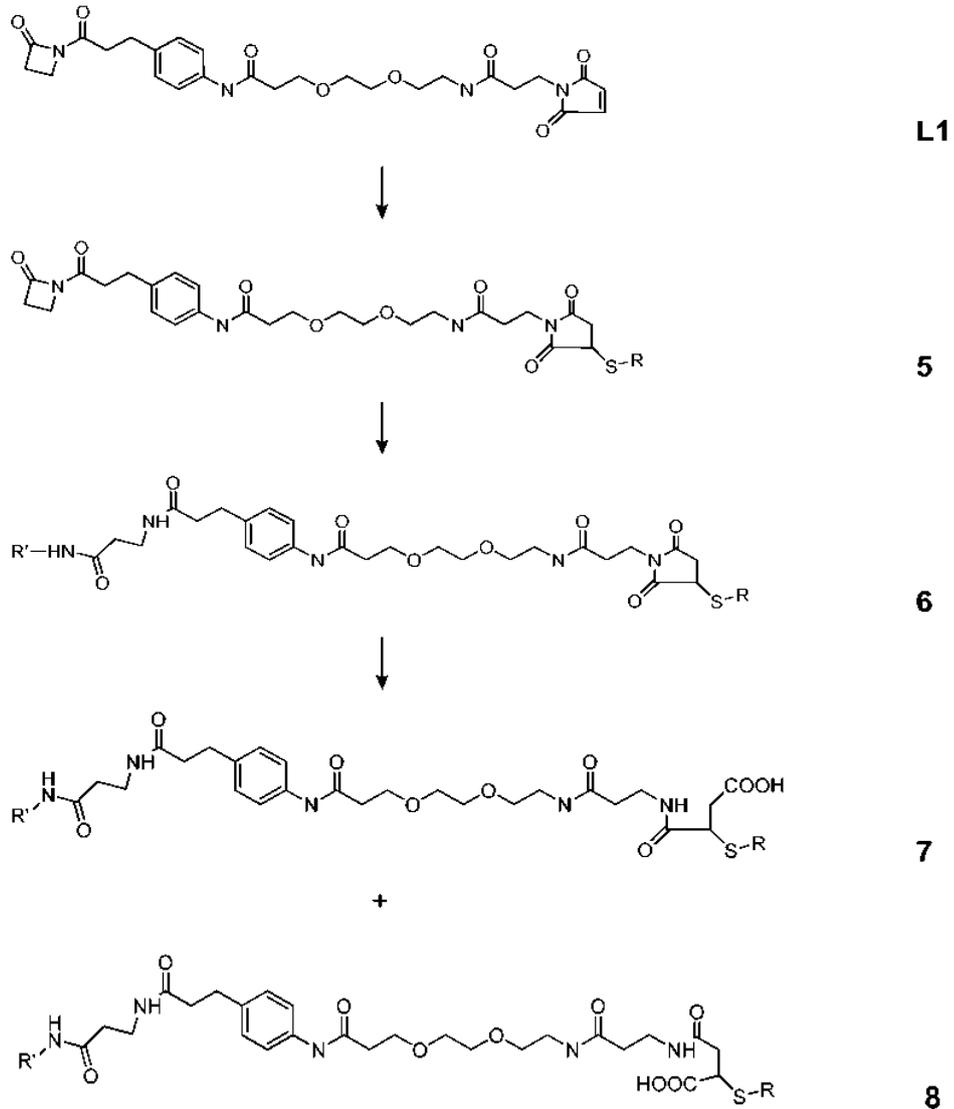
Se produjeron proteína FGF21ΔH-H125C y FGF21ΔH-A129C mediante el cultivo de fermentación de *E. coli*. Para reducir los niveles de endotoxina, se utilizó una etapa Q adicional después de la primera Q, que redujo los niveles de endotoxina de 10 UE/ml → 0,1 UE/ml. El protocolo de purificación se modificó de la siguiente manera. Se obtuvieron aproximadamente 10 g de IB a partir de 1 l de medio de cultivo y se disolvieron con 40 ml de urea 7 M, DTT 5 mM, BTP 50 mM (Bis-tris propano) pH 10,5 (1~2 horas). La reducción de la proteína FGF21 se monitorizó mediante RP-HPLC. Se replegó la proteína solubilizada por dilución en 400 ml de BTP 50 mM, pH 8,0 (24 ~ 36 h). La oxidación del enlace de disulfuro nativo de FGF21 se monitorizó por RP-HPLC. Una vez que el replegamiento casi se hubo completado, se sometió la solución a diálisis dos veces contra 4 l de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Se precipitaron las proteínas no solubilizadas por centrifugación a 20.000 x g durante 60 minutos, 4 °C. Se cargó el sobrenadante en una Hitrap Q FF y se eluyó la proteína FGF21 con gradiente de NaCl 0~200 mM (20 VC, Tris-HCl 20 mM, TCEP 0,01 mM, pH 7,5). Se cargaron las fracciones recogidas en una Hitrap Ni-NTA FF con un gradiente de imidazol 0~100 mM (10 VC, TCEP 0,01 mM, PBS, pH 7,4) para eliminar eficazmente el ADN residual. Se sometieron las fracciones deseadas a diálisis dos veces contra 4 l de Tris-HCl 20 mM, TCEP 0,01 mM, pH 7,5 y se cargaron en una columna Hitrap Q HP con un gradiente de NaCl 0~100 mM (20 VC, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) para la elución. Las fracciones de proteína purificadas se recogieron, se esterizaron con un filtro de 0,22 mm y se almacenaron a -80 °C.

El rendimiento típico de 1 l de medio de cultivo fue de aproximadamente 350 a aproximadamente 400 mg. El rendimiento típico de proteína purificada fue de aproximadamente 220 a aproximadamente 280 mg. Esta técnica de purificación produjo proteína con una pureza > 95 %, y un nivel típico de endotoxina de aproximadamente 1 UE/mg. El uso de un fermentador en lugar de matraces de agitación mejoró el rendimiento de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 veces.

**Ejemplo 35. Selección del engarce**

Se sabe que el anillo de maleimida de L1 que se muestra a continuación puede ser susceptible a la apertura y posterior degradación del producto a lo largo del tiempo (Woodnutt, G.; IBC Conference "Beyond Antibodies/Protein Engineering Design", San Diego, 21-23 de septiembre de 2009).

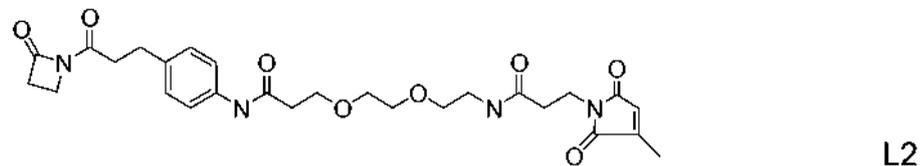
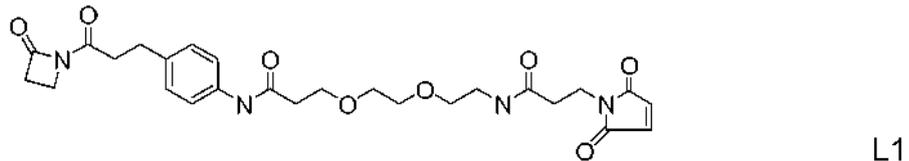
El engarce de maleimida tal como L1 puede reaccionar con tiol para formar un aducto de tiol con una parte de maleimida como se muestra en el Esquema 1. Esta reacción de adición de tiol a maleimida se denomina reacción de Michael. Posteriormente, un grupo que contiene amina (tal como el anticuerpo h38C2) puede reaccionar con AZD (β-lactama) como se muestra en el Esquema 1 para producir 6. El aducto de tiol-succinimida resultando es estable. Sin embargo, el anillo de succinimida puede sufrir una escisión hidrolítica lenta a lo largo del tiempo para dar lugar a 7 y/u 8. Por lo tanto, es deseable tener un anillo de maleimida con una estabilidad mejorada hacia la división hidrolítica, preservando al mismo tiempo su capacidad de experimentar la reacción de Michael.

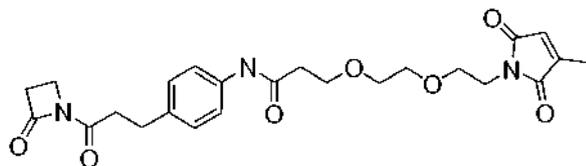


**Esquema 1**

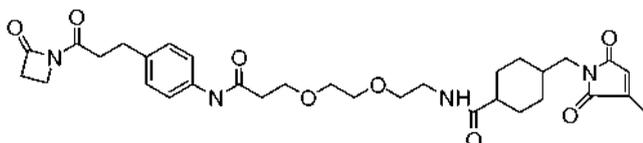
**Ejemplo 36. Modificación de maleimida**

- 5 Por consiguiente, se examinó la estabilidad del anillo de maleimida en L1, con la expectativa de que se podrían generar engarces más estables modificando el anillo de maleimida. Para ralentizar la posible escisión hidrolítica del anillo maleimida con agua, se tomaron tres metodologías diferentes (L2-L4) para modificar el anillo y mejorar la estabilidad.





L3



L4

5 En primer lugar, se previó que un pequeño grupo alquilo unido al anillo podría retardar la escisión hidrolítica del anillo de succinimida. Se preparó el Engarce **2**, que tiene un grupo metilo en el anillo de succinimida. Para que el anillo sufra escisión hidrolítica, se añade una molécula de agua al grupo carbonilo y se forma un compuesto intermedio tetraédrico como estado de transición. La presencia del grupo metilo limitaría de forma estérica y electrónica la formación del compuesto intermedio tetraédrico y reduciría considerablemente la velocidad de hidrólisis.

10 La segunda modificación se centró en el grupo propionamida-carbonilo en las proximidades del grupo carbonilo del anillo de maleimida. Los grupos carbonilo, en general, atraen el agua. Tener un grupo carbonilo muy cerca del anillo de maleimida ayuda a atraer agua y facilita el ataque al grupo carbonilo del anillo de maleimida. Eliminando el grupo propionamida-carbonilo, se ralentiza la reacción de apertura del anillo hidrolítico. Esta modificación se observó en **L3**.

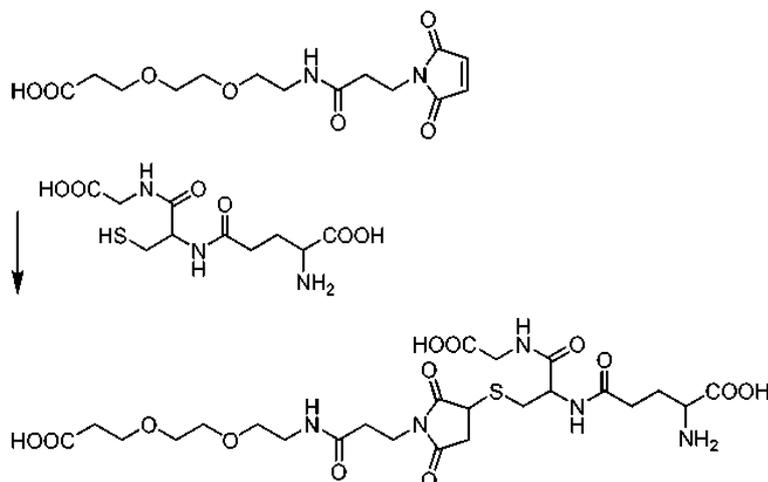
15 La tercera modificación fue la introducción de un grupo ciclohexilmetileno en lugar del grupo propionamida como se observa en **L4**. La naturaleza hidrófoba voluminosa del anillo ciclohexilo interferiría tanto electrónicamente como estéricamente hacia la formación de un compuesto intermedio tetraédrico mediante la adición de agua al grupo carbonilo del anillo que se requiere para la escisión hidrolítica abierta en el anillo. Se anticipó que esto ralentizaría la escisión hidrolítica.

#### Estudios de estabilidad

20 Para los estudios de estabilidad, se eliminó la parte 1-(3-(4-aminofenil)propanoil)azetidín-2-ona de los engarces L1-L4. Se prepararon cuatro compuestos de ensayo (**30-33**) donde la maleimida se conjugó con glutatión, un péptido de tres aminoácidos.

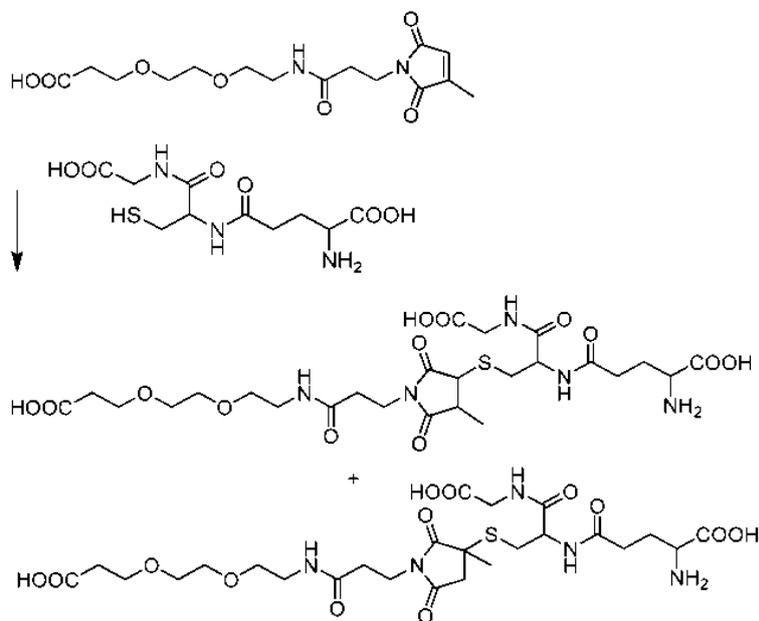
#### Ejemplo 37. Síntesis del Compuesto 30

25 Se agitó una solución de ácido 3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-etoxi)etoxi)propanoico (164 mg, 0,5 mmol) y glutatión reducido (154 mg, 0,5 mmol) en dimetilsulfóxido (5 ml) a temperatura ambiente durante 17 horas. Se añadió acetato de etilo (25 ml) a la mezcla de reacción y se filtró el sólido. Se lavó el sólido con 25 ml más de acetato de etilo, y se secó, dando 252 mg del compuesto **30**.

**30**

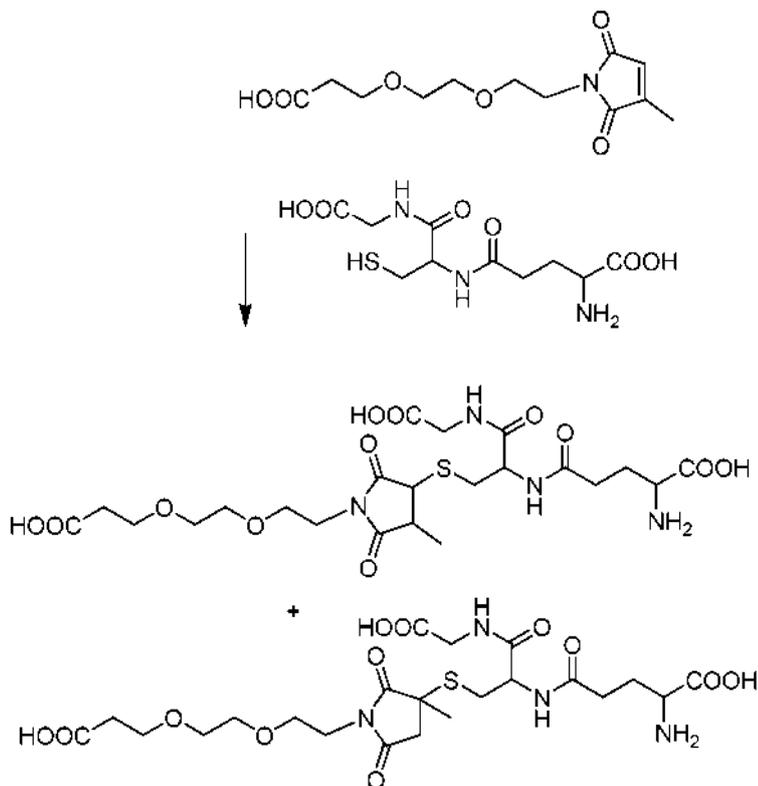
#### Ejemplo 38. Síntesis del Compuesto 31

Se agitó una solución de ácido 3-(2-(2-(3-(3-metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etoxi)etoxi)propanoico (42 mg, 0,12 mmol) y glutatión reducido (37 mg, 0,12 mmol) en dimetilsulfóxido (1,2 ml) a temperatura ambiente durante 22 horas. Se añadió acetato de etilo al 50 % en éter (10 ml) a la mezcla de reacción y se filtró el sólido. Se lavó el sólido con 25 ml más de acetato de etilo, y se secó, dando 67 mg del compuesto **31**.



#### Ejemplo 39. Síntesis del Compuesto 32

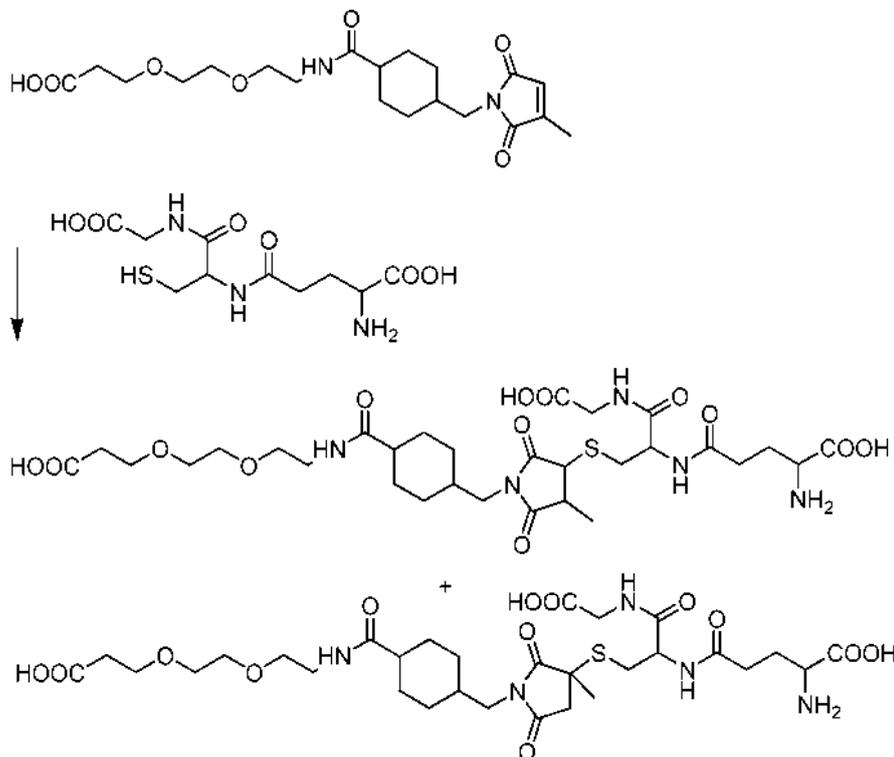
Se agitó una solución de ácido 3-(2-(2-(3-(3-metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)propanoico (0,2 mg, 0,12 mmol) y glutatión reducido (61 mg, 0,2 mmol) en dimetilsulfóxido (2 ml) a temperatura ambiente durante 25 horas. Se añadió acetato de etilo al 65 % en éter (30 ml) a la mezcla de reacción y se filtró el sólido. Se lavó el sólido con 25 ml más de acetato de etilo, y se secó, dando 92 mg del compuesto **32**.



**Ejemplo 40. Síntesis del Compuesto 33**

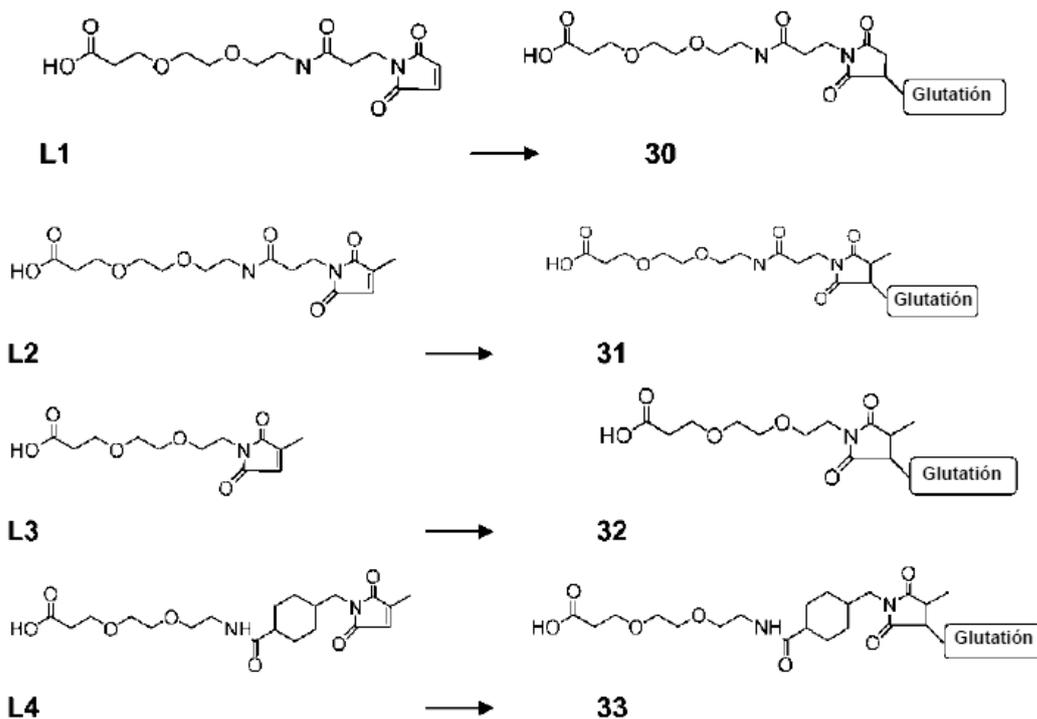
Se agitó una solución de ácido 3-(2-(2-(4-((3-metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-yl)metil)ciclohexanocarboxamido)etoxi)etoxi)propanoico (50 mg, 0,12 mmol) y glutatión reducido (37 mg, 0,12 mmol) en dimetilsulfóxido (1,2 ml) a temperatura ambiente durante 22 horas. Se añadió acetato de etilo al 50 % en éter (10 ml) a la mezcla de reacción y se filtró el sólido. Se lavó el sólido con 25 ml más de acetato de etilo, y se secó, dando 75 mg del compuesto **33**.

5



**33**

**Ejemplo 41. Estudio de estabilidad de los Compuestos 30-33**



Se monitorizaron los Compuestos **30**, **31**, **32** y **33** en EMCL para la formación de los productos abiertos por el anillo, así como la escisión de glutatión. Se examinaron estos nuevos homólogos para determinar su estabilidad en tampón a pH = 6,5 a 40 °C, y en tampón a pH = 7,5 a 40 °C, y en tampón a pH = 7,5 a 4 °C, todo un período de dos semanas (Tablas 3A-C).

- 5 Se disolvieron los compuestos 30, 31, 32 y 33 en un tampón a temperatura ambiente. Se incubaron las muestras a 40 °C y se analizó la solución tampón en los intervalos establecidos. En intervalos definidos, se inyectaron 10 µl de la solución tampón en cromatografía líquida de alta resolución Agilent y espectrómetro de masas para análisis. Se monitorizaron los eluyentes de la columna usando espectrómetro UV a 210 y 254 nm y también usando espectrómetro de masas. Se monitorizaron los subproductos de hidrólisis usando espectrómetro de masas, y se calculó el porcentaje de hidrólisis basándose en la corriente iónica total de una determinada masa.

10 Era evidente a partir de los datos de EMCL que muestran el % de hidrólisis en las Tablas 3A-3C que los anillos de maleimida modificados de L2, L3 y L4 (31-33) eran 5-10 veces más estables a pH = 6,5 a 40 °C en comparación con el anillo de maleimida de L1 (30), 4-15 veces más estable en tampón a pH = 7,5 a 40 °C, y hasta 20 veces más estable en tampón a pH = 7,5 a 4 °C. Los resultados de las conjugaciones de glutatión (incluyendo los datos de las Tablas 3A, 3B y 3C) se presentaron en la Conferencia de "Beyond Antibodies/Protein Engineering Design", San Diego, 21-23 de septiembre de 2009.

**Tabla 3A** Estudios de estabilidad a 40 °C, pH = 6,5 (tampón de His 10 mM, Gly 130 mM, Suc 130 mM).

	Comp. n.º	% a 0 h	% a 1 h	% a 5 h	% a 24 h	% a 48 h	% a 72 h	% a 96 h	% a 120 h	% a 168 h	% a 192 h
L1	30	0,0	0,4	0,6	4,9	11,6	14,8	18,3	17,0	25,0	25,9
L2	31	0,1	0,1	0,3	0,8	1,8	2,6	3,0	3,1	5,0	5,1
L3	32	0,0	0,1	0,3	0,9	1,7	2,4	2,8	4,2	4,6	4,9
L4	33	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,6	0,3	1,1	1,1

**Tabla 3B.** Estudios de estabilidad a 40 °C, pH = 7,5 (His 100 mM, Gly 200 mM, Suc 200 mM)

	Comp. n.º	% a 0 h	% a 1 h	% a 5 h	% a 24 h	% a 48 h	% a 72 h	% a 96 h	% a 120 h	% a 144 h	% a 168 h	% a 264 h	% a 336 h
L1	30	0,1	0,3	2,0	10,0	15,0	29,0						
L2	31	0,1	0,2	0,6	3,2	4,6	7,1	8,2	9,4	12,6	12,2	13,1	15,0
L3	32	0,1	0,1	0,1	1,0	1,1	2,2	2,8	3,3	3,3	3,9	4,4	5,0
L4	33	0,1	0,2	0,3	0,6	1,8	2,8	3,0	4,3	4,1	4,7	6,5	8,8

**Tabla 3C.** Estudios de estabilidad a 4 °C, pH = 7,5 (His 100 mM, Gly 200 mM, Suc 200 mM)

	Comp. n.º	% a 0 h	% a 1 h	% a 5 h	% a 24 h	% a 48 h	% a 72 h	% a 96 h	% a 120 h	% a 144 h	% a 168 h	% a 264 h	% a 336 h
L1	30	0,1	0,1	0,1	0,7	2,0	2,2	4,4	5,5	6,9	7,5	8,7	12,2
L2	31	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,3	0,6	0,7
L3	32	0,1	0,1	0,0	0,2	0,3	0,3	0,4	0,6	0,6	0,7	1,1	1,3
L4	33	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,5	0,6

20 **Ejemplo 42. Estabilidad de los engarces L1-L4 conjugados con FGF21**

El siguiente experimento se realizó para investigar la estabilidad química durante 2 semanas de los cuatro engarces mediante conjugación con FGF21: se conjugó cada engarce con FGF21, se dispuso a +4 °C de condiciones de almacenamiento, y se retiraron alícuotas y se inactivaron por congelación en puntos de tiempo específicos, y se monitorizó la estabilidad de los engarces mediante análisis de EMCL.

- 25 Se disolvieron los cuatro engarces en DMSO a partir de la materia prima liofilizada. Se redujo parcialmente la proteína FGF21ΔH-A129C con TCEP 0,1 mM durante 30 min antes de la adición de la materia prima de engarce a una proporción de engarce:proteína de 1:1; la concentración de proteína FGF21ΔH-A129C en la reacción de conjugación fue de 5 mg/ml. Se hizo reaccionar L1 con proteína durante 30 minutos; y L2, L3 y L4 se hicieron reaccionar durante 2 horas. La reacción de conjugación se inactivó mediante la eliminación del exceso de engarces

a través de una resina de exclusión de tamaño. Se dispuso la proteína FGF21ΔH-A129C conjugada se a + 4 °C para el almacenamiento de estabilidad. Se retiraron alícuotas a t = 0 (antes del almacenamiento de estabilidad) y a t = 1, 3, 8 y 14 días. Se realizó el análisis de la estabilidad del engarce mediante análisis de EMCL para determinar la cantidad relativa de proteína no conjugada, de conjugación de proteína + engarce y de eventos de hidrólisis simple y doble de la proteína conjugada + engarce.

La hidrólisis del engarce es la variable analítica crítica en este experimento. La hidrólisis se monitorizó observando la subsiguiente adición de H<sub>2</sub>O al complejo de FGF21-engarce. Una sola adición de H<sub>2</sub>O, +(1) H<sub>2</sub>O, indica probablemente la hidrólisis del grupo AZD activo que está presente en los 4 engarces. La adición de una segunda molécula de H<sub>2</sub>O, +(2) H<sub>2</sub>O, es un indicador potente de hidrólisis (por ejemplo, inestabilidad química) en el engarce. L1 es particularmente susceptible debido a la presencia de un grupo funcional maleimida.

Los resultados experimentales de la Tabla 4 que se presenta a continuación demuestran que L1 sufre el mayor incremento en + (2) H<sub>2</sub>O. A t = 0, cada uno de L1-L4 tenía un valor medido de +(2) H<sub>2</sub>O entre 6-8 % de la proteína total medida. Durante las 2 semanas, se monitorizaron estas muestras, el +(2) H<sub>2</sub>O observado en L1 había aumentado hasta el 18 % mientras que el valor para cada uno de los restantes engarces L2-L4 era constante al 6-8 %. Estos datos sugieren que L1 es relativamente inestable en comparación con L2-L4.

**Tabla 4.** Análisis de hidrólisis de L1-L4 conjugado con FGF21

Engarce	Tiempo (horas)	0 engarces	1 engarce	+(1) H <sub>2</sub> O	+(2) H <sub>2</sub> O
L1	0	13	49	30	8
L1	24	14	41	34	11
L1	72	14	40	35	11
L1	168	10	33	40	18
L1	336	12	28	41	18
L2	0	22	45	27	6
L2	24	23	43	26	8
L2	72	24	37	32	8
L2	168	24	40	29	7
L2	336	26	38	28	8
L3	0	19	45	30	6
L3	24	18	47	27	8
L3	72	19	43	30	8
L3	168	19	43	29	8
L3	336	20	43	29	8
L4	0	20	46	28	6
L4	24	20	46	27	7
L4	72	21	42	30	7
L4	168	21	41	32	6
L4	336	22	41	31	6

**Ejemplo 43. Ab-FGF21ΔH-A129C conjugado con L1-L4**

L2-L4 había demostrado previamente ser más estable que L1 con conjugaciones de glutatión en diversas condiciones (véanse las Tablas 3A-C) y FGF21 (Tabla 4). Se fusionaron los enlaces de maleimida modificados L2-L4 a FGF21ΔH-A129C (eficacias de conjugación mostradas en la Tabla 5), y mostraron actividad en el ensayo Taqman de Glut1 (Tabla 5): los valores de CE<sub>50</sub> se normalizaron contra el valor relativo para FGF21ΔH).

**Tabla 5.** Eficacias de conjugación de L1-L4.

Engarce	[Compuesto]	Conjugación de FGF21-Engarce	Conjugación de FGF21-Engarce-Ab	CE <sub>50</sub> de la actividad Taqman de Glut1 (nM) con respecto a FGF21ΔH
L1	30	95%	95%	1,68
L2	31	67%	95%	1,00
L3	32	87%	89%	0,35
L4	33	90%	94%	2,71

Sin embargo, a pesar de lo anterior, cada uno de Ab-L2-FGF21ΔH-A129C, Ab-L3-FGF21ΔH-A129C, Ab-L4-FGF21ΔH-A129C fueron menos estables *in vivo* que Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. Esto se evidenció como niveles sostenidos inferiores en la circulación después de la dosificación IV, y niveles máximos inferiores y sostenidos en la circulación después de la dosificación SC (Figuras 2A-C, Tabla 6). Sorprendentemente, estos resultados fueron contrarios a los resultados de los estudios de estabilidad realizados con los engarces fusionados a un péptido pequeño en sistemas tampón.

**Tabla 6.** Parámetros PK de ratón de conjugados de FGF21 con L1, L2, L3 y L4 tras la administración IV y SC a 3 mg/kg

Comp.	T <sub>1/2</sub> (h)		AUC (h*ug/ml)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21Δ H-A129C	33	33	491	511	~100
Ab-L2-FGF21Δ H-A129C	37	23	314	165	53
Ab-L3-FGF21Δ H-A129C	32	13	254	129	51
Ab-L4-FGF21Δ H-A129C	22	14	219	106	48

Estos resultados se confirmaron en un estudio adicional en suero de ratón. FGF21ΔH-A129C se conjugó A h38C2 usando cada uno de L1, L2, L3 y L4. Cada muestra se diluyó en suero de ratón a 0,3 mg/ml y se incubó a 37 °C antes de la congelación, seguido del análisis posterior mediante 2DLC/EM. En comparación con un patrón de referencia, se detectó Ab-L1-FGF21ΔH-A129C al 149 % después de 5 minutos, 66 % después de 34 horas, 81 % después de 72 horas y fue indetectable durante 120 horas. Por el contrario, Ab-L2-FGF21ΔH-A129C, Ab-L3-FGF21ΔH-A129C, Ab-L4-FGF21ΔH-A129C resultaron indetectables en todas las muestras.

**Ejemplo 44. Estudio en ratas de Ab-FGF21ΔH-A129C conjugado con L1 y L2**

Se determinaron la farmacocinética (PK) de una sola dosis de dos versiones de Ab-FGF21ΔH-A129C que se diferenciaban en el engarce usado para conjugar la proteína FGF21 al armazón del anticuerpo en ratas Sprague Dawley macho. Las ratas recibieron por vía IV o SC (3 mg/kg) Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (engarce de maleimida) o Ab-L2-FGF21ΔH-A129C (engarce de metilmaleimida) y se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 5 minutos a 14 días después de la dosis. Los niveles de Ab-FGF21ΔH-A129C en suero se determinaron mediante ELISA, en el que el conjugado de FGF21 se capturó a través de un anticuerpo monoclonal específico para FGF21 y se detectó mediante Fc anti-humano. Los datos de PK resultantes demostraron que el conjugado de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C tenía características PK superiores (T<sub>1/2</sub>: IV = 60 horas, SC = 38 h, biodisponibilidad SC = 52 %) en comparación con el conjugado de Ab-L2-FGF21ΔH-A129C (T<sub>1/2</sub>: IV = 52 h, SC = 33 h, biodisponibilidad SC = 36 %), (Figura 3A y Tabla 7). Estos resultados no se previeron dados los resultados de los estudios de estabilidad realizados en sistemas tampón con estos engarces fusionados a un péptido pequeño.

**Tabla 7.** Parámetros PK de rata de conjugados de FGF21 con L1 y L2 tras la administración IV y SC a 3 mg/kg (para la Fig. 3A)

Comp.	T <sub>1/2</sub> (h)		AUC (h*ug/ml)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21Δ H-A129C	60	38	1382	717	52
Ab-L2-FGF21Δ H-A129C	52	33	419	152	36

**Ejemplo 45 Efecto de Ab-FGF21ΔH-A129C con L1 y L2 sobre ARN de Glut1**

Se sembraron adipocitos T3-L1 el día 8 en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Falcon®, n.º de cat. 353047), y se incubaron en medio DMEM completo (FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, P/S al 1 %) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Se

alimentaron las células (día 12) con medio DMEM exento de suero con BSA al 0,2 % durante la noche y se trataron con Ab-L1-FGF21ΔH-A129C y Ab-L2-FGF21ΔH-A129C en DMEM exento de suero que contenía BSA al 0,2 % a 37 °C durante 6 h. Se aspiró el medio y después se extrajo el ARN de las células usando el mini kit RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió el ARN a A260nm usando el espectrofotómetro Spectramax® Plus.

5

**Tabla 8** PCR en tiempo real cuantitativa de Taqman

Compuesto	CE <sub>50</sub> de la expresión de ARN de Glut1 (nM)
FGF21ΔH	3,39
FGF21Δ H-A129C	16,03
Ab-L1-FGF21Δ H-A129C	1,72
Ab-L2-FGF21Δ H-A129C	9,33

La estimulación de los adipocitos 3T3-L1 mediante FGF21ΔH, FGF21ΔH-A129C, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C y Ab-L2-FGF21ΔH-A129C produjo la inducción de *Glut1* dependiente de la dosis. Ab-L1-FGF21ΔH-A129C pareció ser más potente que Ab-L2-FGF21ΔH-A129C (Tabla 8).

10 **Ejemplo 46. Estudio de la longitud de los engarces**

Se ensayaron Ab-L1-FGF21ΔH-D79C, Ab-L7-FGF21ΔH-D79C y Ab-L8-FGF21ΔH-D79C entre sí para evaluar la tolerancia de la longitud del engarce. Todos mostraban PK similar (Figura 3B y Tabla 9) y potencia comparable (datos no mostrados) en los ensayos basados en células.

**Tabla 9.** Parámetros PK de ratón de conjugados de FGF21 con engarces L1, L7 y L8 tras la administración IV a 3 mg/kg (para la Fig. 3B)

15

Comp.	T <sub>1/2</sub> IV (h)	AUC IV (h*ug/ml)
Ab-L1-FGF21Δ H-D79C	19	176
Ab-L7-FGF21Δ H-D79C	27	183
Ab-L8-FGF21Δ H-D79C	15	248

**Ejemplo 47. Resumen de las posiciones de los restos y selección de engarces**

Se ensayaron H1C, T40C, D79C, L86C, H125C y A129C como posibles sitios de conjugación usando una estrategia de conjugación de tiol-maleimida. De estos, H1C, T40C y L86C mostraron problemas con la expresión y el repliegamiento. Se exploraron además D79C, H125C y A129C, ya que todos mostraron niveles aceptables de producción de proteínas y demostraron que la proteína mutante no conjugada seguía siendo potente. Ab-FGF21ΔH-D79C, Ab-FGF21ΔH-H125C y Ab-FGF21ΔH-A129C mostraron una bioactividad similar aFGF21ΔH, lo que sugiere que la conjugación del anticuerpo en estos lugares no interfiere en la unión al receptor. D79C, H125C y A129C tienen estabilidad y bioactividad similares a FGF21ΔH.

20

Todos los conjugados de anticuerpo mutante de lisina ensayados mostraron PK de ratón inferior a los conjugados de anticuerpo H125C y A129C, con semividas IV de 13-17 h (Tabla 10).

25

**Tabla 10.** Resumen de sitios de conjugación en FGF21. \*3 días después de una sola dosis SC de 3 mg/kg, excepto 10 mg/kg para D79C y 1 mg/kg una vez al día para FGF21dH \*\*proteína; ND: no determinado.

	Rendimiento de fermentación de la proteína (mg/l)	CE <sub>50</sub> de captación de glucosa (nM)	CE <sub>50</sub> de proteína no conjugada de Taqman de Glut1 (nM)	CE <sub>50</sub> de conjugado de Taqman de Glut1 (nM)	T <sub>1/2</sub> IV (h)	T <sub>1/2</sub> SC (h)	% de biodisponibilidad SC	GTT* (% de AUC del control)
FGF21ΔH**		12 (12)	2,3(7)	ND	0,4	0,5	96	67
K56	10-50	5,5	0,9 (2)	1,9 (1)	17	13	66	100
K59	10-50	0,9	0,6 (1)	6,5 (2)	13	ND	ND	100
K69	10-50	5,2	1,3 (1)	ND	ND	ND	ND	ND
K122	10-50	1,7	2,6(2)	1,6(2)	16	14	40	100

(continuación)

Knull-P2	10-50	ND	1,2(2)	16,6 (1)	17	ND	ND	100
Knull-H1K	10-50	ND	6,4 (2)	4,3 (2)	16	11	51	99
Knull-S181 K	10-50	ND	7,5(2)	>500 (2)	ND	ND	ND	ND
D79C		9,9	2,1 (4)	3,7 (3)	17, 19	20, 17	55, 70	54
L86C		62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H125C		0,65	1,2(3)	3,2 (4)	37	32	67	48,66
A129C		5,7	1,4 (6)	2,7(7)	28,33	37,33	69, 100	64,67,72

Aunque Ala129 no estaba muy expuesto al disolvente, y es menor que D79 o H125, FGF21ΔH-A129C fue sorprendentemente uno de los mutantes más estables y la mejor posición ensayada para la conjugación de anticuerpos. Esto fue inesperado, ya que la mutación no es conservativa. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, existen varias razones posibles para la idoneidad única de la conjugación en A129C. En primer lugar, Ala129, así como His125, se encuentran ambos en la región de bucle que es flexible en la estructura modelizada de FGF21. Estas regiones normalmente son sitios de unión a heparina para otros miembros FGF que se unen a heparina. Dado que FGF19, FGF21 y FGF23 no interactúan con heparina, mantener la fidelidad de secuencia de esta región puede no ser fundamental para su función biológica. La flexibilidad de la posición puede ser beneficiosa para la conjugación de anticuerpos para evitar la interferencia de la unión al receptor. En segundo lugar, Ala129 está rodeado por restos cargados positivamente, es decir, His125, Arg126, Arg131 y Arg135. Este parche cargado positivamente puede evitar la dimerización SS de FGF21ΔH- A129C debido a la fuerte repulsión cargada. En tercer lugar, estos restos cargados pueden favorecer la estabilización del engarce L1 de maleimida, que en su ausencia, puede generar un carboxilato después de la apertura del anillo de maleimida. Por lo tanto, cuando se conjuga FGF21 usando una estrategia de unión de maleimida, la unión en la posición del resto específico de A129 parece ser particularmente ventajosa.

Ab-L1-FGF21ΔH-A129C y Ab-L1-FGF21ΔH-H125C muestran ambos semividas IV y semividas SC altas de al menos 30 horas en modelos murinos, así como buena biodisponibilidad. Ambos conjugados demuestran una potencia inferior a 4 nM en el ensayo Taqman de Glut1. En general, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C muestra una semivida y una potencia ligeramente mejores en comparación con Ab-L1-FGF21ΔH-H125C. El uso de L1 en Ab-L1-FGF21ΔH-A129C también mostró sorprendentes ventajas *in vivo* sobre lo que sugirieron los ensayos *in vitro*, y resultó ser, en general, el engarce más ventajoso en comparación con los ensayados.

La combinación específica de los componentes de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C, (anticuerpo, engarce, posición del resto de engarce, resto de engarce, proteína) parece proporcionar los valores óptimos de semivida, biodisponibilidad, potencia, actividad, facilidad de producción y resistencia a la hidrólisis en comparación con múltiples alternativas.

#### 25 Ejemplo 48. Eficacia de los compuestos

Se ensayó la tolerancia a la glucosa en ratones ob/ob tratados con compuestos Ab-FGF21ΔH-K56 y Ab-FGF21ΔH-Knull-H1 K. Ambos compuestos se compararon mal con Ab-FGF21ΔH-H125C (Figura 4A y 4B) y Ab-FGF21ΔH-A129C (Figura 5A y 5B). Por el contrario, se demostró que Ab-FGF21ΔH-D79C y Ab-FGF21ΔH-H125C mejoran la tolerancia a la glucosa y reducen la ganancia de peso corporal (Figuras 4A, 4B, 6A, 6B, 6C, 6D y Tabla 11).

30 **Tabla 11.** AUC de glucosa durante el OGTT realizado el día 6 tras la inyección SC de Ab-FGF21ΔH-D79C a 10 mg/kg en el punto de tiempo indicado en ratones ob/ob (véanse las Figuras 6C y 6D) \*\*  $p < 0,01$  frente al vehículo (AUC de glucosa) mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett.

Tratamiento	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)
Vehículo	100
FGF21Δ H 1 mg/kg una vez al día	61**
Ab-FGF21ΔH-D79C, día 0 y 3	53**
Ab-FGF21ΔH-D79C, día 3	53**
Ab-FGF21ΔH-D79C, día 5	87
Ab-FGF21ΔH-D79C, día 6	67**
Control de delgados (vehículo)	41**

Ab-FGF21ΔH-A129C resultó mejorar la tolerancia a la glucosa y reducir la ganancia de peso corporal, debido al aumento del gasto energético evidenciado por el aumento de la expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo blanco (WAT), e invierte la esteatosis hepática en ratones ob/ob (Figuras 6E, 6F, 6G, 6H y Tabla 12). Para la expresión de *Ucp1*, se homogenizaron muestras de WAT viscerales congeladas recogidas de los estudios de eficacia *in vivo*. Se extrajo el ARN total de los tejidos homogenizados, y se midió la expresión de ARNm de *Glut1* y *GAPDH* usando un kit de RT-PCR de Quantitect Probe, y se realizó una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real en una máquina Taqman (Applied Biosystems). Se determinó el efecto del tratamiento mediante un cambio en los niveles de ARNm de *Glut1* normalizados por los niveles de ARNm de *GAPDH* de cada muestra. Ab-FGF21ΔH-A129C causó pérdida de peso corporal debido al aumento del gasto energético, como sugiere el aumento de la expresión de *Ucp1* en WAT, la disminución de los triglicéridos en suero y de los niveles de ácidos grasos en ratones DIO y la disminución del peso hepático (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E y Tabla 13). También se observó una reducción en el peso del hígado en ratones ob/ob (Figura 7F y Tabla 14). Ensayos adicionales en ratones ob/ob demostraron una reducción de los niveles de ARN de la estearil-coenzima A desaturasa-1 (*SCD1*) y monoacilglicerol O-aciltransferasa (*MOGAT2*), y un aumento en los niveles de ARN de la caja forkhead A2 (*FoxA2*) (Figuras 7G, 7H y 7i y Tabla 15).

15 **Tabla 12.** Resultados tras una sola inyección SC de Ab-FGF21ΔH-A129C el día 6 en ratones ob/ob; véanse las Figuras 6E, 6F, 6G, 6H \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento	AUC de glucosa durante el OGTT, 3 mg/kg (% de control de vehículo)	Expresión de ARNm de UCP1 en WAT 10 mg/kg. (ETM)	Contenido de triglicéridos en hígado, 10 mg/kg (ETM)	Cambio en el peso corporal (g) el día 6 con respecto al día 1, 10 mg/kg (ETM)
Vehículo	100	1,0(0,1)	35,7 (4,2)	6,2 (0,2)
FGF21ΔH 1 mg/kg una vez al día	67***	2,6 (0,4)	37,0(2,3)	4,7 (0,3)
Ab-FGF21ΔH-A129C, día 0	80*	2,4 (0,3)	22,2 (2,1)*	4,2 (0,4)**
Ab-FGF21ΔH-A129C,día 1	68***	2,6 (0,7)	22,1 (5,6)*	3,8 (0,3)***
Ab-FGF21ΔH-A129C,día 2	68***	2,1 (0,6)	22,2 (2,4)*	3,8 (0,4)***
Ab-FGF21ΔH-A129C,día 3	57***	2,5 (0,5)	27,7 (4,3)	4,0 (0,4)**
Control de delgados (vehículo)	57***	--	9,3 (1,4)***	1,1 (0,6)***

20 **Tabla 13.** Resultados del 10 tras una repetición de la inyección SC DE Ab-FGF21ΔH-A129C A 10 mg/kg él día 0 y 7 en ratones DIO (véanse las Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E). \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento	AUC de glucosa durante el OGTT (% de control de vehículo)	Cambio en el peso corporal (g) el día 10 con respecto al día 1, (ETM)	Expresión de ARNm de UCP1 en WAT (ETM)	Valores medios de lípidos en suero	
				TG (mg/dl) (ETM)	NEFA (mM) (ETM)
Vehículo	100	-0,2 (0,9)	1,2 (0,3)	133 (7,0)	0,61 (0,06)
FGF21ΔH 1 mg/kg una vez al día	75***	-1,6 (0,8)	1,6(0,2)	92 (9,6)**	0,40 (0,04)
Ab-FGF21Δ H-A129C, d 0 y 7	83*	-2,4 (0,7)	4,8 (1,1)**	69 (6,4)***	0,36 (0,04)*
Control alimentado con pienso (vehículo)	78**	+ 1,2 (0,4)	0,5 (0,1)	104 (9,2)*	0,52 (0,10)

**Tabla 14.** Peso del hígado el día 6 tras una sola inyección SC de Ab-FGF21ΔH-A129C a 10 mg/kg en el punto temporal indicado en ratones ob/ob (para la Fig. 7F). \*\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento	Peso del hígado (g) (ETM)
Vehículo	2,3 (0,1)
FGF21Δ H 1 mg/kg una vez al día	1,8 (0,1)**
Ab-FGF21Δ H-A129C, día 0	1,4 (0,1)***
Ab-FGF21Δ H-A129C, día 1	1,4 (0,1)***
Ab-FGF21Δ H-A129C, día 2	1,4 (0,1)***
Ab-FGF21Δ H-A129C, día 3	1,5 (0,1)***
Control de delgados (vehículo)	0,8 (0,0)***

5 **Tabla 15.** Cambios medios de la expresión de ARNm usando qPCR de muestras de tejido hepático recogidas el día 6 tras una sola inyección SC de Ab-FGF21ΔH-A129C a 10 mg/kg en el punto temporal indicado en ratones ob/ob (para la Fig. 7G, 7H, 7I). \*\* $p < 0,01$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento	SCD1 (ETM)	MOGAT2 (ETM)	FoxA2 (ETM)
Vehículo	1,01 (0,06)	1,05 (0,17)	1,00 (0,04)
FGF21Δ H 1 mg/kg una vez al día	0,95 (0,06)	0,37 (0,05)**	1,23 (0,08)
Ab-FGF21Δ H-A129C, día 0	0,83 (0,08)	0,38 (0,10)**	1,14(0,06)
Ab-FGF21Δ H-A129C, día 3	0,61 (0,08)**	0,31 (0,08)**	1,81 (0,20)**

**Ejemplo 49: Ensayo de GSIS sobre compuestos de Exendina 4**

10 Se ensayó la capacidad de ciertos homólogos de Exendina4 para estimular la secreción de insulina de células β pancreáticas *in vitro* usando un ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS). En resumen, se conjugó el homólogo de Exendina4 relevante a ambos sitios de combinación de h38C2, y se aplicó esta molécula conjugada, junto con glucosa, a diversas concentraciones a cultivos de células β pancreáticas. Se detectó la secreción de insulina midiendo los niveles de insulina a lo largo del tiempo. Se calculó la CE<sub>50</sub> para cada compuesto. Los resultados de este ensayo se exponen en la siguiente Tabla 16.

15 **Ejemplo 50: Ensayo de tolerancia a la glucosa (GTT), cambio de peso corporal e ingesta de alimentos en compuestos de Exendina4**

20 Se evaluó la eficacia *in vivo* de homólogos de Exendina4 ilustrativos usando un paradigma de ensayo de tolerancia a la glucosa de una sola dosis o dosis repetidas. Se dosificaron a los ratones ob/ob machos adultos jóvenes (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 0,3 mg/kg de compuestos de ensayo de la divulgación por vía subcutánea (SC) en la región escapular media, usando una breve retención manual, con volúmenes de inyección de 0,2-0,3 ml. Los ratones de control delgados de la misma camada (n = 8/grupo, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) recibieron de forma similar vehículo. Se monitorizaron la ingesta de alimentos y el cambio acumulado de peso corporal diariamente por la mañana (08: 00-09:00 h, encendiendo las luces a las 06:00 h y apagándolas a las 18:00 h). Los resultados se muestran como valores medios durante los días 0-9, así como el valor en el día 9. Cada compuesto se ensayó con 25 8-10 animales.

30 Los ratones se sometieron a ensayos de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) siguiendo un protocolo convencional. En resumen, se mantuvieron los ratones en ayunas durante 4-5 horas al comienzo de la fase de luces encendidas en la colonia. Al final de este período (a primera hora de la tarde), los ratones se sacrificaron inmediatamente antes y en intervalos regulares de 15 a 120 minutos después de una exposición oral a glucosa (1,5 g/kg). Se volvió a poner comida en las jaulas tras la recogida del punto de tiempo de 120 minutos. Los niveles de glucosa se determinaron usando medidores de la glucemia de autoensayo, y se calculó el área bajo la curva (AUC) para la glucosa en función del tiempo después de la exposición oral a la glucosa usando una ecuación trapezoidal lineal. Los resultados se calcularon como el % del control de vehículo, y se muestran para los ensayos de 48 y 72 horas (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de péptidos Exendina 4

SEQ ID NO:	Sito de engarce	CE <sub>50</sub> del péptido	CE <sub>50</sub> del conjugado de péptido-Ab	T <sub>1/2</sub> SC	Bio-disponibilidad SC	% de ingesta de alimento del vehículo	% de ingesta de alimento del vehículo a los 9 días	% de peso corporal del vehículo	% de peso corporal del vehículo a los 9 días	% de GTT a las 48 horas del control de vehículo	% de GTT a las 72 horas del control de vehículo
38	C-20	0,03, 0,078,	2,63	26,8	85	78	86	61	84		88
39	K38			24,9	39	82	100	52	69		106
43	K28			33,9	46						
44	K27			39,1	72						
45	K26	0,01		66,0	100	105	88	121	122	74,86	
46	K24	0,14,		36,0	57	78	91	45	54		108
47	K23	0,03		84,9	82	92	90	102	102	97	
48	K21	0,010,	2,12	52,0	72	72	88	55	58	66	
49	K20	0,047		53,4	78	75	92	60	76	69	94
50	K19	Sin ajuste		88,6	100	69	76	67	70		65
51	KU17	0,22,		51,7	48	81	94	45	59		121
52	K16	0,01		57,6	88						
53	KU14	0,027, 0,040		90,5	100	72	93	62	73	72	76
54	K13	0,031		55,9	80						
55	K12	0,091	1,76	49,5	94	84	91	67	91	75	
56	K11	0,08		60,9	100						

La unión en la posición 23 (SEQ ID NO: 47) no redujo el peso corporal ni la alimentación y no mejoró la tolerancia a la glucosa a las 48 horas. La unión en las posiciones 17, 24, 38 y en el extremo C (SEQ ID NO: 51, 46, 39 y 38) redujo el peso corporal y la alimentación, pero no mejoró la tolerancia a la glucosa a las 72 horas. La unión en la posición 26 (SEQ ID NO: 45) no redujo el peso corporal ni la alimentación, pero mejoró la tolerancia a la glucosa a las 48 horas. Se observan ventajas claras para la unión en las posiciones 12, 14, 19, 20 y 21. Se consideró que la unión en la posición 14 proporcionaba la mayor ventaja global. Todos los ejemplos usaron restos K o K(SH) como el resto de unión.

#### Ejemplo 51. Evaluación de parámetros para generar conjugados de anticuerpos bifuncionales asimétricos

Se examinaron diferentes relaciones de fusión entre [segundo engarce-Ex4] y Ab en tampón de formulación (histidina 10 mM, glicina 10 mM, sacarosa al 2 %, pH = 7) a temperatura ambiente. A medida que la cantidad de [segundo engarce-Ex4] aumentó, la formación de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> también aumentó, y se mantuvo aproximadamente el 45 % (Tabla 17). Los aumentos adicionales en [segundo engarce-Ex4] produjeron una mayor cantidad de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>.

**Tabla 17.** Eficacias de conjugación de [L1-SEQ ID NO: 64] a h38C2

[Segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub> : Anticuerpo	% de anticuerpo sin conjugar	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>2</sub>
0,25 : 1	61	26	13
0,5 : 1	50	35	15
0,75 : 1	40	41	19
1 : 1	32	45	23
1,25 : 1	23	45	33
1,5 : 1	19	45	36
1,75 : 1	17	45	39
2:1	11	39	49

Se examinó la conjugación de [segundo engarce-Ex4] y [Ab] (20 mg/ml, proporción 0,6:1) para formar Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> usando diferentes sistemas codisolventes. Se añadieron estos diferentes codisolventes (mostrados en la Tabla 18) para ver si se podía mejorar la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. El aumento de las concentraciones de codisolventes tales como etanol, alcohol isopropílico (IPA), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) del 5 % al 10 % al 15 % no afectó a la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>, pero afectó a la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>, y la recuperación de anticuerpo no conjugado. Parece que a medida que aumentaba la cantidad de codisolvente orgánico, una mayor cantidad de anticuerpo permanecía sin conjugarse. De forma similar, a medida que aumentaba la concentración de codisolvente, había una reducción en la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>. Los codisolventes tales como etanol, DMF y DMSO inhiben la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>, mientras que el propilenglicol no tuvo ningún efecto sobre la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> o Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>. El análisis se realizó usando HPLC.

**Tabla 18.** Eficiencia de conjugación de [L1-SEQ ID NO: 64] a h38C2.

Codisolvente orgánico	% de anticuerpo sin conjugar	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>2</sub>
Sin codisolvente	26	48	24
Etanol al 5 %	27	49	23
Etanol al 10 %	30	49	20
Etanol al 15 %	30	48	20
IPA al 5 %	29	49	21
IPA al 10 %	26	49	24
IPA al 15 %	25	49	25
DMF al 5 %	28	49	21
DMF al 10 %	32	49	18
DMF al 15 %	38	46	14

(Continuación)

Codisolvente orgánico	% de anticuerpo sin conjugar	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>2</sub>
DMSO al 10 %	24	49	25
DMSO al 20 %	31	49	19
DMSO al 30 %	36	47	16
Propilenglicol al 10 %	25	49	25
Propilenglicol al 20 %	27	49	23
Propilenglicol al 30 %	26	49	24

Se examinaron los efectos de la urea (0,5, 1,0 y 2 M) y del EDTA (5, 10 y 15 mM) sobre la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. Ni la urea ni el EDAT tienen ningún efecto notable en la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> o Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>.

- 5 También se examinó el efecto del clorhidrato de guanidina sobre la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> de [segundo engarce-Ex4] y [Ab] (20 mg/ml) a diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina (0, 0,2, 0,4 y 0,5 M) y las proporciones de [segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>:Ab (0,85:1 y 1:1). En ambas proporciones, el aumento de las concentraciones de clorhidrato de guanidina redujo la formación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>2</sub>, pero no ofreció una mejora significativa en el rendimiento de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>.
- 10 Se investigó el efecto de la concentración de NaCl (0, 100, 250, 500 mM) sobre la reacción de conjugación entre [segundo engarce-Ex4] y el anticuerpo (20 mg/m) a las proporciones de 0,5:1, 0,75:1 y 1:1, usando tampón de formulación (histidina 10 mM, glicina 10 mM y sacarosa al 2 %, pH = 7). No se observó ninguna diferencia significativa en la generación de Ab-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> a través de las concentraciones de NaCl ensayadas.

- 15 Se estudió el efecto del pH en la reacción de conjugación entre [segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> y el anticuerpo (20 mg/ml) usando tampón de formulación (histidina 10 mM, glicina 10 mM y sacarosa al 2 %). Los resultados se muestran en la Tabla 19. La formación de [segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> fue la más alta a pH = 6,5 y 7.

**Tabla 19.** Eficiencia de conjugación de [L1-SEQ ID NO: 64] a h38C2

[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub> : Anticuerpo	pH	% de anticuerpo sin conjugar	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>	% de Ab-[segundo engarce-Ex4] <sub>2</sub>
1:1	5	44	43	12
1:1	5,5	38	45	16
1:1	6	26	45	29
1:1	6,5	40	47	22
1:1	7	29	47	23

- 20 Se estudió una investigación sistemática de la proporción entre el [primer engarce-FGF21]:[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> para evaluar la formación de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. La Tabla 20 muestra la concentración de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> y [primer engarce-FGF21] y la formación de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>. Las proporciones se establecieron usando HPLC dotada de columnas de HIC. La concentración de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> fue variada, ya que la cantidad añadida de [primer engarce-FGF21] varió. Basándose en estos resultados, parece que se logró la máxima eficacia de la formación de [FGF21-primer engarce]<sub>1</sub>-[Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> cuando la concentración de [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub> fue de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 mg, y la cantidad de [primer engarce-FGF21] fue de un exceso de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6 veces en comparación con [Ab]-[segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>.

**Tabla 20.** Eficiencia de conjugación de h38C2-[L1-SEQ ID NO: 64] a [FGF21ΔH-A129C-L1]

Conc. de [Ab]-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub> , (mg/ml)	Proporción de [primer engarce-FGF21]: [Ab]-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>	% de [FGF21-primer engarce] <sub>1</sub> -[Ab]- [segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>
5,85	2 : 1	54
4,85	3:1	65
3,20	6:1	65
2,42	6 : 1	68

(Continuación)

Conc. de [Ab]-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub> , (mg/ml)	Proporción de [primer engarce-FGF21]: [Ab]-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>	% de [FGF21-primer engarce] <sub>1</sub> -[Ab]-[segundo engarce-Ex4] <sub>1</sub>
1,63	6 : 1	66
0,99	6 : 1	63
0,55	6 : 1	51
0,30	6 : 1	39

5 Se estudió la concentración de TCEP requerida para romper el enlace inter-disulfuro entre el dímero FGF21ΔH-A129C sin afectar el enlace intra-disulfuro dentro de FGF21ΔH-A129C. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Se trató una muestra que contenía FGF21ΔH-A129C en Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH = 7 (aproximadamente 2 mg/ml) con diversas concentraciones de TCEP durante 30 minutos. Las muestras se analizaron por EMCL. Basándose en los datos, 0,3 mM de TCEP es la concentración óptima para romper el enlace inter-disulfuro entre la proteína FGF21ΔH-A129C sin afectar el enlace intra-disulfuro.

**Tabla 21.** Análisis de la formación de FGF21ΔH-A129C dimérica

TCEP (mM)	% de FGF21Δ H-A129C monomérica	% de FGF21ΔH-A129C monomérica de intra-disulfuro reducido	% de FGF21Δ H-A129C dimérica
0,00	34,5	0,0	61,5
0,04	75,8	0,0	24,2
0,06	90,2	0,0	9,8
0,08	94,8	0,0	5,2
0,10	95,9	0,0	4,1
0,12	96,4	0,0	3,6
0,15	96,4	0,0	3,6
0,20	96,4	0,0	3,6
0,30	95,5	0,0	3,5
0,50	92,9	3,6	3,5
0,75	91,3	3,3	5,4
1,00	87,8	3,3	8,9

10 Se siguió la reducción del enlace inter-disulfuro usando HPLC durante 140 minutos usando tres concentraciones diferentes de TCEP. Todos los enlaces inter-disulfuro se escindieron usando TCEP en el transcurso de 30 a 40 minutos. Estos experimentos sugieren que el enlace inter-disulfuro puede escindirse usando TCEP 0,3 mM en 30 minutos (Tabla 22).

**Tabla 22.** Efecto de diferentes relaciones molares de TCEP

Relación molar de TCEP	Tiempo (min)		% de FGF21		% de impureza de FGF21 reducida		% de FGF21 dimérica	
	6,8	7,3	6,8	7,3	6,8	7,3	6,8	7,3
mg/ml de FGF21								
Relación molar de 0,1 de TCEP:rFGF21 0,03 mg/ml de TCEP	0	0	28,9	33,4	0,0	0,0	69,8	65,4
	0	0	27,1	31,1	0,0	0,0	71,5	67,7
	4	6,5	36,1	43,4	0,0	0,0	63,9	56,6
	27	29,5	63,5	70,3	0,0	0,3	36,5	29,4
	50	52,5	68,0	76,5	0,0	0,3	32,0	23,2
	73	75,5	70,2	79,8	0,0	0,4	29,8	19,8
	96	98,5	72,2	82,9	0,0	0,3	27,8	16,8

(Continuación)

Relación molar de TCEP	Tiempo (min)		% de FGF21		% de impureza de FGF21 reducida		% de FGF21 dimérica	
	119	121,5	72,9	82,6	0,0	0,3	27,1	17,1
	142	144,5	73,8	81,8	0,0	0,0	26,2	18,2
Relación molar de 0,3 de TCEP:rFGF21 0,09 mg/ml de TCEP	0	0	28,9	33,4	0,0	0,0	69,8	65,4
	0	0	27,1	31,1	0,0	0,0	71,5	67,7
	4	8	45,9	59,3	0,0	0,0	54,1	40,7
	27	31	94,2	93,7	1,0	1,0	4,8	5,3
	50	54	96,5	94,4	1,4	1,3	2,2	4,3
	73	77	96,6	95,1	1,4	1,4	2,0	3,5
	96	100	96,6	94,7	1,6	1,6	1,7	3,7
	119	123	96,3	94,3	1,9	2,0	1,8	3,7
	142	146	96,0	94,9	2,1	2,3	1,8	2,8
Relación molar de 0,5 de TCEP:rFGF21 0,14 mg/ml de TCEP	0	0	28,9	33,4	0,0	0,0	69,8	65,4
	0	0	27,1	31,1	0,0	0,0	71,5	67,7
	4	11	55,7	69,5	0,0	0,0	44,3	30,5
	27	34	96,4	95,2	1,4	1,3	2,3	3,5
	50	57	96,4	95,2	1,8	1,7	1,8	3,1
	73	80	96,1	94,2	2,1	2,0	1,8	3,8
	96	103	95,5	94,9	2,4	2,2	2,1	2,9
	119	126	95,4	94,2	3,0	3,0	1,6	2,8
	142	149	94,9	93,6	3,5	3,6	1,6	2,8

**Ejemplo 52. Generación de conjugados bifuncionales asimétricos (Estrategia 1)**

**Reacción de H38C2 + Exendina 4:** se trataron 2,76 g de h38C2 (SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26) (en histidina 10 mM, glicina 10 mM, sacarosa al 2 %, pH 6,5, 136 ml) con 62,3 mg de péptido Ex4 (SEQ ID NO: 64 con K(SH) como resto de enlace a péptido) conjugado al engarce L1 en 1,29 ml (concentración de 10 mM) de agua desionizada, y se dejó a temperatura ambiente durante una noche. Se analizó una pequeña cantidad de material usando cromatografía líquida de alto rendimiento dotada de columna de HIC-butilo y espectroscopia de masas para monitorizar la formación de Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>.

**Extracción de especies de 1FA de Ab-Exendina 4:** se diluyó una mezcla de reacción en bruto que contenía una mezcla de anticuerpo, Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> y Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>2</sub> (2,7 g en 136 ml de tampón hecho de histidina 10 mM, glicina 10 mM, sacarosa al 2 %, pH = 6,5) con 409 ml de tampón (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH = 7,0) y se cargó sobre una columna rellena con 681 ml de resina CM sefarosa. Se eluyó el producto fraccionadamente usando un gradiente de disolvente B (fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0 + isopropanol al 20 %) en A (sulfato de amonio 0,75 M y fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0). Se combinaron las fracciones que contenían Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>. Se desinfectó un dispositivo de ultrafiltración-diafiltración (1.100 ml) dotado de una membrana de 50 KD con hidróxido de sodio 1 N y se equilibró con un tampón que contenía 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol 20 mM, cloruro de sodio 50 mM a pH = 7,0. La fracción combinada anterior que contenía Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> se intercambió con tampón usando tris(hidroximetil)aminometano 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH = 7,0, y se concentró hasta 62 ml y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm, dando 1,02 g de Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> en tris (hidroximetil)aminometano 20 mM + cloruro de sodio 50 mM a pH = 7,0.

La separación por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se basa en la interacción entre la fase estacionaria y las características hidrófobas de las moléculas. El anticuerpo h38C2 es menos hidrófobo que Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>, que es menos hidrófobo que Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>2</sub>. Durante la elución, el anticuerpo sin reaccionar se eluye antes, seguido de Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>. Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>2</sub> se eluye al final. Mediante el ajuste de la proporción del anticuerpo con respecto al péptido, el % de los tres compuestos diferentes mencionados anteriormente puede variar.

El anticuerpo sin reaccionar se ha aislado y sometido a UF/DF, y se ha tomado en histidina 10 mM, glicina 10 mM, sacarosa al 2 %, tampón pH = 6,5. Este anticuerpo aislado se fusionó de nuevo con péptido Ex4 (SEQ ID NO: 64 con K(SH) como resto de unión a péptidos) y se purificó. En algunos aspectos, esto se puede ciclar 3 veces para producir ~70 % de Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>.

5 FGF21 + engarce: Se trató FGF21ΔH-A129C (715 mg en 105 ml de tris(hidroximetil)-aminometano 20 mM + cloruro de sodio 50 mM a pH = 7,0) con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (solución 0,3 mM) durante 40 min. FGF21ΔH-A129C puede tener un problema con la formación de dímeros debido al tiol sin reaccionar en la posición 129, lo que puede ser particularmente desventajoso si la proteína sin reaccionar se va a almacenar entre la generación y la posterior fijación al engarce. Este problema se puede superar añadiendo TCEP a una concentración final de  
10 aproximadamente 0,1 mM.

Se añadió L1(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(2-(2-(3-oxo-3-(4-(3-oxo-3-(2-oxoazetidín-1-il)propil)fenilamino)propoxi)etoxi)ethyl)propanamida, (27,2 mg en 2,57 ml de dimetilsulfóxido) a la solución de FGF21ΔH-A129C (a una relación molar de aproximadamente 2:1 del engarce: proteína) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación intermitente. L1 se mantuvo, en general, a 10 mM (48,28 mg/ml) en  
15 DMSO al 100 %, aunque también son adecuados otros disolventes tales como dimetilformamida, metanol, etanol, agua, propilenglicol y mezclas de los mismos. L1 tiene potencial de someterse a hidrólisis tanto en metanol como en etanol. La solubilidad de L1 es mayor tanto en dimetilsulfóxido como en dimetilformamida. Dado que el dimetilsulfóxido se mezcla fácilmente con el sistema tampón usado en la conjugación de engarce-proteína, se prefiere el dimetilsulfóxido para preparar la solución de materia prima de L1.

20 Se desinfectó una membrana de UFDF con hidróxido de sodio 1 N durante 30 minutos y se equilibró con tris(hidroximetil)aminometano 20 mM + cloruro de sodio 50 mM a pH = 7,0. Se concentró la mezcla de incubación de FGF21ΔH-A129C anterior usando UFDF, dando 613 mg de [L1-FGF21ΔH-A129C] en 81 ml de tampón.

Se diluyó la solución de [L1-FGF21ΔH-A129C] con 42 ml de tris(hidroximetil)aminometano 20 mM + cloruro de sodio 50 mM a pH = 7,0 y se añadió a Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> (1,02 g, en 61 ml de tris(hidroximetil)aminometano 20 mM + cloruro de sodio 50 mM a pH = 7,0) y la mezcla de reacción se dejó durante la noche. A continuación, se diluyó esta mezcla de incubación (184 ml) con 366 ml de tampón A (sulfato de amonio 0,75 M + fosfato de sodio 50 mM a pH 7,0) y se purificó en columna de HIC-butilo usando tampón B (fosfato de sodio 50 mM + isopropanol al 20 %, pH = 7) en tampón A. Se ha encontrado que la columna de HIC-butilo tiene la ventaja de ser adecuada para el aumento a escala hasta cantidades adecuadas para la fabricación comercial. Se recogieron las fracciones que contenían las  
25 moléculas de [FGF21ΔH-A129C-L1]<sub>1</sub>-Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>, dando 970 ml.

Se desinfectó un casete de 50 cm<sup>2</sup> de UF/DF de 50 kD con hidróxido de sodio 1 N y se equilibró la membrana de UF/DF con un tampón que contenía 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol 20 mM, cloruro de sodio 50 mM al pH = 7,0. Se concentró la fracción combinada anterior usando membrana de UF/DF y Tris 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH = 7, dando 594 mg de FGF21ΔH-A129C-L1]<sub>1</sub>-Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> en 67 ml de tampón que se filtró a  
35 través de un filtro de 0,2 μm.

Después de la concentración, la muestra se filtró a través de una membrana de 0,2 μm, y se almacenó a 4 °C. Se analizó la muestra final para determinar la endotoxina, y se establecieron la pureza y la identidad estructural mediante HPLC de HIC-butilo y espectrómetro de masas. El análisis de la muestra usando HPLC dotada de columna de HIC-butilo mostró un rendimiento del aproximadamente 78 % para [FGF21ΔH-A129C-L1]<sub>1</sub>-Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>, y del aproximadamente 22% para Ab-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> sin reaccionar.  
40

### Ejemplo 53. Estrategia alternativa para desarrollar moléculas ABC

La presente divulgación proporciona una primera estrategia (estrategia 1) para el procedimiento de conjugación en el que Ab-[Ex4-segundo engarce]<sub>1</sub> se conjuga con [FGF21-primer engarce]. Aunque este procedimiento es ventajoso, requiere dos etapas de cromatografía de alta resolución para el anticuerpo biespecífico final ABC-1: una de HIC para  
45 Ab-[Ex4-segundo engarce]<sub>1</sub> y otra para la purificación del producto ABC-1. En algunos aspectos favorables, el procedimiento dio el producto final ABC-1 con una pureza del 74 % con un 14 % de Ab-[Ex4-segundo engarce]<sub>1</sub> sin reaccionar, compuesto intermedio del procedimiento y otras impurezas con un bajo rendimiento.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento alternativo para producir conjugados de anticuerpo bifuncionales asimétricos, de acuerdo con la estrategia 2. La estrategia 2 proporciona ventajas significativas frente a la estrategia 1: la mejora espectacular de la estequiometría de FGF21 (proporción molar de ~x1,25 en la estrategia 2 frente a x3 en la estrategia 1) y la reducción de la cantidad de FGF21 requerida, produciendo un ahorro importante de los costes.  
50

La Estrategia 2 también redujo las etapas de la cromatografía a solo una cromatografía de HIC para la purificación del compuesto intermedio del procedimiento Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. La eficacia de la conjugación de [L1-SEQ ID NO: 64] con el compuesto intermedio Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> para formar ABC-1 casi se había completado usando material de partida bien definido de [L1-SEQ ID NO: 64] en la Estrategia 2.  
55

5 Se desarrolló una etapa cromatográfica de fase inversa de Butil 650 S para generar Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> como compuesto intermedio del procedimiento. Se recogió selectivamente la única especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> conjugada con alto rendimiento > 90 % y alta pureza > 90 % en la etapa de elución, y se resolvió bien a partir de la otra especie reacción de conjugación incluyendo la [SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>, [SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> dimérico, Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> doblemente conjugado, agregados y especies libres de h38C2. El aumento a escala del procedimiento se demostró con éxito a una escala 19 l.

10 Se retiró rápido el [L1-SEQ ID NO: 64] en exceso de la segunda conjugación mediante flujo a través de cromatografía Capto-Q para purificar el anticuerpo biespecífico ABC-1. La estrategia 2 demostró un rendimiento sin precedentes del aproximadamente 40 % calculado a partir del h38C2 completamente reactivo en ABC-1, y una pureza excelente del aproximadamente 91 % de ABC-1 mediante SEC. La eficiencia total del procedimiento se aumentó espectacularmente reduciendo la utilización de caro material de FGF21 y reduciendo al mínimo las etapas cromatográficas.

#### **Ejemplo 54. Mejora de los parámetros de conjugación para ABC**

*Efecto de la relación molar de [FGF21-engarce]:Ab sobre el rendimiento de Ab-[FGF21-engarce]<sub>1</sub>*

15 Se llevó a cabo una evaluación preliminar de diferentes proporciones de [FGF21-primer engarce]:Ab para aumentar al máximo el rendimiento para el compuesto intermedio del procedimiento Ab-[SEQ ID NO: 10- L1]<sub>1</sub>. La relación molar óptima de [FGF21-primer engarce]:Ab fue de aproximadamente 1,25:1 con un intervalo aceptable de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 1:1 (véase la Tabla 23). Una proporción de aproximadamente 1,25:1 dio un rendimiento del aproximadamente 42 % para el compuesto intermedio deseado con un % mínimo de agregados.

20

**Tabla 23.** Efecto de la relación molar de [SEQ ID NO: 10-L1]:Anticuerpo sobre el rendimiento de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>

Relación de FGF21-linker:Ab	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab	% de [FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de [FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>
4,7:1	1,5	16,4	52,6	10,7	0,3	1,7	16,8
1,5:1	0,8	7,5	20,0	42,9	25,0	0,2	3,7
1,25:1	1,1	5,7	14,3	41,8	34,4	0,0	2,7
1:1	0,7	5,1	9,9	38,7	43,8	0,0	1,9
0,75:1	0,6	3,5	5,7	32,0	56,6	0,0	1,5

Selección de tampón, pH y temperatura de conjugación para Ab-FGF21-engarce]<sub>1</sub>

Se seleccionaron diferentes parámetros para mejorar la eficiencia de la conjugación, incluyendo los tampones MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) y fosfato, pH (pH 6 y 7) y temperaturas (temperatura ambiente frente a 4 °C). Los resultados (Tabla 24) indicaron que los % de agregados se mantuvieron estables en el pH, la temperatura y diferentes intervalos de concentración tanto para el tampón MES como fosfato. El tampón fosfato 100 mM a pH 6,0 a TA dio significativamente más Ab-[FGF21]<sub>1</sub> en comparación con otras condiciones. La conjugación a 4 °C mostró un perfil similar de producto, pero con rendimientos más bajos para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. Las condiciones operativas aceptables para la conjugación de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> se identificaron usando un tampón MES o fosfato, a una concentración de entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 150 mM, con un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, a entre aproximadamente 0°C y 37°C, y preferentemente a entre aproximadamente 4°C y aproximadamente la TA. Las condiciones óptimas de conjugación para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> comprendían tampón fosfato aproximadamente 100 mM con un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5 a TA.

**Tabla 24.** Resultados de la eficacia de conjugación a 0 °C y TA mediante SEC. Condiciones de la conjugación: volumen total: 0,5 ml; h38C2 = 4,9 mg/ml; relación molar de [SEQ ID NO: 10-L1]:h38C2 = 0,8:1; 4 °C; 26 h; TA durante una noche.

	% de agregados grandes		% de agregados L1]2		% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1]1		% de [FGF21ΔH-A129C-L1]1		% de [FGF21ΔH-A129C-L1]1	
	0 °C	TA	0 °C	TA	0 °C	TA	0 °C	TA	0 °C	TA
MES 100 mM, pH 7,0	0,6	0,5	3,7	4,1	6,6	6,5	34,2	35,5	53,4	52,0
MES 100 mM, pH 6,0	0,3	0,6	1,4	2,8	2,2	6,6	21,7	35,6	70,6	52,6
Fosfato 100 mM, pH7,0	0,5	0,6	3,1	3,8	5,1	5,7	32,2	33,7	56,5	54,1
Fosfato 100 mM, pH6,0	0,3	0,7	3,1	6,6	8,5	19,9	37,9	44,8	43,2	24,1
MES 25 mM, pH 7,0	0,8	0,7	4,4	4,6	8,0	7,9	36,6	36,7	48,9	48,7
MES 25 mM, pH 6,0	0,4	0,7	2,7	3,9	5,9	8,1	34,3	37,6	54,5	48,5
Fosfato 25 mM, pH 7,0	0,7	0,7	4,2	4,2	7,0	7,5	36,2	36,4	50,2	49,8
Fosfato 25 mM, pH 6,0	0,7	0,8	3,6	4,2	6,8	7,8	36,5	37,5	51,1	48,4

*Estudio del transcurso de tiempo para Ab-[FGF21-Engarce]<sub>1</sub>*: se generó un estudio de transcurso de tiempo para su uso en la modelización de la conjugación de [FGF21-primer engarce] con h38C2. Tras 18 horas a TA, la eficacia de conjugación para el compuesto intermedio h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> alcanzó el máximo como se muestra en la Tabla 25. Por consiguiente, la reacción de conjugación puede llevarse a cabo durante un tiempo seleccionado del grupo que consiste en al menos 30 minutos, al menos aproximadamente 60 minutos, al menos aproximadamente 90 minutos, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 18 horas y al menos aproximadamente 24 horas.

**Tabla 25.** Datos cinéticos para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> a TA mediante SEC: Condiciones de conjugación: volumen total: 0,5 ml; h38C2 = 4,0 mg/ml; relación molar:[FGF21-primer engarce]-:Anticuerpo= 0,8:1; TA; en MES 25 mM pH 6,0.

	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
30 min	2,0	2,0	0,0	12,5	83,1
60 min	0,4	3,3	1,7	19,4	77,0
90 min	0,4	4,2	2,8	24,0	71,4
120 min	0,3	4,8	3,4	27,4	67,5
180 min	0,4	6	4,2	31,0	62,6
1.080 min	0,4	8,6	5,1	33,6	57,3

*Configuración de las condiciones de conjugación para FGF21-engarce*: Se realizaron los aumentos a escala de laboratorio a diferentes escalas con una variedad de tampones y pH optimizados. La eficacia de conjugación para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> permaneció comparable en el intervalo del aproximadamente 40 % ~ aproximadamente 45 % (Tabla 26). Dado que la hidrólisis del grupo reactivo de SEQ ID NO: 10-L1 tiene lugar a lo largo del tiempo (Tabla 27), la diafiltración posterior a la activación de SEQ ID NO: 10-L1 se debe realizar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 °C. La cantidad de SEQ ID NO: 10-L1 después de la diafiltración posterior a la activación varió en diferentes experimentos, y la diferencia podría contribuir a la variación de la eficacia de conjugación para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. El fosfato aproximadamente 100 mM, pH de aproximadamente 6,3 dio los menores agregados y el mayor % de h38C2 restante con fines de reciclaje.

**Tabla 26.** Comparación de la eficacia de conjugación mediante SEC

	Escala (g)	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
Fosfato 25 mM, pH 6	50	8,4	28	43,4	20,2
Fosfato 50 mM, pH 6,5	150	6,3	19,5	43,1	31,1
Fosfato 100 mM, pH 6	50	5,6	19,9	45,3	29,3
MES 25 mM, pH 6	50	6,3	24,4	44,9	23,7
Fosfato 50 mM, pH 6,5	4	6,6	17,2	42,3	30,3
Fosfato 100 mM, pH 6,3	0,5	4,7	15,3	41,3	36,1

**Tabla 27.** Estudio a lo largo del tiempo de la hidrólisis del grupo reactivo de [SEQ ID NO: 10-L1] a 4 °C mediante cromatografía RP de FGF21 RP Condiciones de activación: volumen total: 1,0 ml; [SEQ ID NO: 10-L1] = 1,8 mg/ml; relación molar: TCEP: [SEQ ID NO: 10-L1] = 0,5:1, Tratamiento con TCEP de 60 min; luego relación molar: SEQ ID NO: 64: [SEQ ID NO: 10-L1] = 1,4:1; activación del engarce de 30 min; TA; en Tris 25 mM a pH 7,5 y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mM.

	% de FGF21	% de FGF21Δ H-A129C-L1 reactivo hidrolizado	% de FGF21ΔH-A129C-L1 reactivo	% de FGF21 dimérica	% de otros
0 horas	13,4	6,5	76,7	1,8	1,6
1 hora	13,2	8,8	73,6	2,8	1,6
2 horas	14,4	10,6	69,1	4,0	1,9
3 horas	13,3	13,6	67,1	4,1	1,9

(Continuación)

	% de FGF21	% de FGF21Δ H-A129C-L1 reactivo hidrolizado	% de FGF21ΔH-A129C-L1 reactivo	% de FGF21 dimérica	% de otros
4 horas	13,9	14,9	64,9	4,5	1,8
5 horas	14,3	16,9	61,9	5,0	1,9
6 horas	13,9	18,8	60,3	5,2	1,8
8 horas	14,5	22,3	55,8	5,7	1,7
10 horas	15,0	25,0	52,3	5,9	1,8

5 *Selección del tampón y del pH para la conjugación de [segundo engarce-Ex4] y Ab-[FGF21-engarce]<sub>1</sub>*. Se purificó la solución de reacción de conjugación de la primera etapa de conjugación que implicaba [SEQ ID NO: 10-L1] activado y h38C2 en la etapa de cromatografía de fase inversa de Butil 650 S para generar h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. A continuación, se sometió a diafiltración este material en tampón adecuado (bien lactato de sodio 30 mM a pH 4,8 o glutamato de sodio 20 mM a pH 4,5). La reacción de fusión selectiva espontánea entre el anillo de AZD de un engarce tal como L1 K<sup>99</sup> de SEQ ID NO: 26 normalmente tiene lugar a pH 6,5, pero no a pH 4,5. Se investigó el parámetro de pH óptimo para la conjugación de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> a [L1-SEQ ID NO: 64]. Se usó tampón MES 100 mM a pH 7,0 para ajustar el pH de solución de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. Los resultados (Tablas 28 y 10 29) indicaron el intervalo óptimo entre aproximadamente pH 6,0 y aproximadamente pH 6,5. Se logró una mayor eficacia de conjugación en el tampón de MES/lactato. Se obtuvo una excelente eficacia de fusión para ABC-1 ([SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>-h38C2 (IgG1)-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> usando la relación molar más alta de [segundo engarce-Ex4]:Ab-[FGF21-primer engarce] = aproximadamente 1,3:1.

15 **Tabla 28.** Resultados de la eficacia de la segunda conjugación de solución de MES/glutamato a diferente pH mediante HIC: Condiciones de conjugación: volumen total: 0,5 ml; h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> = 10,0 mg/ml; relación molar: [L1-SEQ ID NO: 64] / h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> = 1:1; TA, en solución de MES/glutamato.

pH	% de Ab	% de Ab-[Ex4-L1] <sub>1</sub>	Ab-[FGF21Δ H-A129C] <sub>1</sub>	ABC-1
6,5	0,9	3,4	10,3	82,5
6,0	1,0	3,3	10,9	81,9
5,9	1,0	3,2	12,3	80,2
5,65	1,1	3,1	13,7	79,2
5,4	1,2	3,0	15,4	77,7
5,1	1,6	2,9	23,7	68,3
4,75	2,2	2,9	33,8	54,2

**Tabla 29.** Resultados de la eficacia de la segunda conjugación de solución de MES/lactato a diferente pH mediante HIC: Condiciones de conjugación: volumen total: 0,2 ml; h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> = 6,0 mg/ml; relación molar: [L1-SEQ ID NO: 64] / h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> = 1.3:1; TA, en solución de MES/lactato.

pH	% de Ab	% de Ab-[Ex4-L1] <sub>1</sub> y h38C2-[FGF21ΔH- A129C] <sub>1</sub>	ABC-1 ([FGF21-A129C-L1] <sub>1</sub> -h38C2-(IgG1)-[L1-SEQ ID NO: 64] <sub>1</sub>
6,5	0,2	9,0	90,8
6,38	0,1	9,6	90,3
pH 6,13	0,1	9,1	90,8
pH 5,8	0,1	11,0	88,8
pH 5,5	0,1	10,6	89,3
pH 5,1	0,2	15,8	84,0
pH 4,8	0,9	60,9	38,3

20 *Estudio del transcurso del tiempo para [segundo engarce-Ex4]<sub>1</sub>-Ab-[FGF21-engarce]<sub>1</sub>*: se generó un estudio del transcurso del tiempo para su uso en la modelización de la conjugación de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> con [L1SEQ ID NO: 64]. Tras 18 horas a TA, la eficacia de conjugación para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> se aproximó al máximo

como se muestra en la Tabla 30.

**Tabla 30.** Datos cinéticos para ABC-1 a TA mediante HIC: Condiciones de conjugación: volumen total: 1,0 ml; h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> = 6,0 mg/ml; relación molar: [L1-SEQ ID NO: 64]: h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> = 1,3:1; TA; en solución de MES/Glutamato, pH 5.8.

	% de Ab	% de Ab +1 CVX2025	h38C2-[FGF21ΔH- A129C] <sub>1</sub>	ABC-1 ([FGF21-A129C-L1] <sub>1</sub> -h38C2-(IgG1)-[L1-SEQ ID NO: 64] <sub>1</sub> )
2 horas	2,0	2,2	29,6	58,4
4 horas	1,6	2,6	23,1	67,5
6 horas	1,3	2,6	18,0	73,9
8 horas	1,2	2,8	15,5	77,0
10,5 horas	0,8	3,5	11,4	81,8
18 horas	0,8	3,5	8,4	85,3

#### 5 Ejemplo 55. Conjugación de FGF21 al engarce

Se comprobó la proporción de monómero y dímero para FGF21 antes del experimento. El análisis de RHPLC de FGF21 mostró que la proporción de monómero:dímero era del 27 %:73 %. Se diluyeron primero 0,207 mM de SEQ ID NO: 10 (17,1 g en Tris 20 mM, NaCl 50 mM, 2,346 l, a pH 7,0 con tampón MES 100 mM a pH 7,0 (1.920 l) para obtener la concentración de 4 g/l medida por absorbancia a 280 nm. A continuación, se añadieron 7,631 ml de solución madre de TCEP (50 g/l). Se mezcló bien la mezcla durante 5 min y luego se redujo el mezclado en condiciones ambientales. La reacción duró 90 minutos. Tras la reducción con TCEP, se analizó la muestra mediante RF de FGF21 mostrando la proporción de monómero: dímero del 89 %:6,3 % como control en proceso.

Tras 90 minutos, se disolvió L1 (656,7 mg) en 8,76 ml de DMSO (la concentración final de L1 fue de 0,29 mM o de aproximadamente 0,15 mg/ml), y se añadió la solución a la solución de SEQ ID NO: 10. Se enjuagó el recipiente de L1 con tampón para garantizar que se añadiera todo el L1. La activación se inició después de que se hubiese añadido todo el L1 a la mezcla de [SEQ ID NO: 10]. Se mezcló bien la mezcla durante 5 min y luego se redujo el mezclado a TA. Se dejó esta mezcla a TA durante 30 minutos con vértice para completar la reacción entre SEQ ID NO: 10 y el engarce L1. La temperatura de activación podría reducirse si fuera necesario. Un análisis adicional mediante HPLC de fase inversa (RP) de FGF21 mostró la formación del 73 % de [SEQ ID NO: 10-L1].

Se hizo pasar la muestra anterior a través del UFDF para eliminar el exceso de engarce y TCEP. Se desinfectó la membrana con NaOH 1 N durante 30 minutos, se drenó y se equilibró con MES 100 mM, pH 7,0. Se usó tampón MES 100 mM, pH 7,0, para la diafiltración (diafiltración x7). La diafiltración se realizó a una concentración de sustancia retenida de 4 g/l. Se pueden evitar la formación de espuma y salpicaduras durante la UF/DF. La hidrólisis del grupo reactivo de [SEQ ID NO: 10-L1] se produjo durante el procedimiento de diafiltración. El tiempo de espera para la combinación de DF tras la activación se debe reducir al mínimo. La UF puede funcionar a 2-10 °C usando una membrana Sartorius Hydrosart de 10 K. Las especies combinadas de [SEQ ID NO: 10-L1] confirmadas por RP de FGF21 disminuyeron del 73 % al 64 % tras la UF/DF.

La concentración se estimó por UV a 280 nm usando el coeficiente de extinción DO de 0,47 igual a 1 mg tanto para SEQ ID NO: 10 (combinación filtrada en Q sefarosa) como [SEQ ID NO: 10-L1] (combinación de UF/DF después de la activación). Este mecanismo de reacción, y sus variaciones, también son adecuados para su uso en la estrategia 1, así como con otras variantes de FGF21 y engarces.

#### Ejemplo 56. Conjugación de [FGF21-engarce] a Ab

Se diluyeron 95,0 g de h38C2 (SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26: 17,05 g/l, 5,6 l en histidina 10 mM, glicina 10 mM, pH 6,5) con tampón fosfato 100 mM (14,4 l, pH 6,2). A continuación, se añadieron 17,72 g de [SEQ ID NO: 10-L1] en tampón MES 100 mM a pH 7,0 (4,4 g/l, 3,8 l, 1,35 mol [SEQ ID NO: 10-L1]:1 mol de h38C2 a la mezcla de h38C2. La mezcla de reacción final puede ser de aproximadamente 4 g/l de h38C2 a TA. La reacción comenzó una vez que se hubo añadido el componente [SEQ ID NO: 10-L1]. Se mezcló bien la reacción durante aproximadamente 5 min y luego se redujo el mezclado a TA. Se dejó esta mezcla a TA durante una noche, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 horas con agitación suave. Se tomó una pequeña cantidad de material para el análisis mediante cromatografía de SEC para confirmar la formación del conjugado de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> en la mezcla. El análisis de SEC mostró el rendimiento de la etapa de conjugación de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> como el 40 % como se muestra en la Tabla 33. El rendimiento de la etapa de conjugación se calculó como la pureza de la valencia de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> mediante SEC (%).

**Ejemplo 57. Enriquecimiento del compuesto intermedio del procedimiento Ab-[FGF21-engarce]<sub>1</sub> reactivo**

Se enriqueció h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1] usando una columna de escala 19 l rellena de resina de butilo 650S Tosoh® usando una columna XK de 35 cm de diámetro rellena hasta una altura de lecho de 20 cm. Se preequilibró la columna y se lavó con 3 VC (volumen de columna) de WFI y 5 VC de fosfato de sodio 50 mM a pH 7,0. Se cargó la combinación de conjugación filtrada de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> a 5 mg/ml en la columna de butilo 650S a 17 °C. A continuación, se procesó la carga de Butilo 650S a través de la resina de butilo 650S Tosoh® usando un procedimiento Unicorn programado en deslizamiento de cromatografía automatizada a 17-18 °C. La elución se realizó usando un gradiente lineal: Primero con lavado isocrático de 1,6-hexanediol al 2,4 % (Tampón A al 88 % (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) y Tampón B al 12 % (fosfato de sodio 50 mM, hexanodiol al 20 %, pH 7,0) con 7 VC; seguido de un gradiente de elución de A al 88 % + B al 12 % hasta A al 60 % + B al 40 % con 11 VC; el gradiente se mantuvo en A al 60 % + B al 40 % con 5 VC. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante ensayo de SEC para determinar la pureza con el fin de determinar qué fracciones se agruparían. Los resultados analíticos de la SEC para la combinación final se muestran en la Tabla 31. h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> se recuperó selectivamente con un alto rendimiento, correspondiente al ~90 % de recuperación de las especies de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> cargadas en la columna, y también con alta pureza > 90 % en la etapa de elución, y se resolvió bien a partir de las otras especies de reacción de conjugación, incluyendo dímeros de [SEQ ID NO: 10-L1], [SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> libres, h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub>, agregados y especies de h38C2 (+0 FGF21). Se combinaron entre sí las fracciones de la cromatografía de Butilo 650S, y se concentraron más y se sometieron a diafiltración. La concentración se estimó mediante UV a 280 nm usando la extinción de 1,47 igual a 1 mg de proteína.

**Tabla 31. Eficacia de la conjugación para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>.**

	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
Mezcla de combinación (Tox E)	0,0	3,8	12,3	40,2	43,6
Combinación de fase inversa de Butilo 650S	0,0	1,0	4,5	91,9	2,6

**Ejemplo 58. Conjugación de [segundo engarce-Ex4] a Ab-[FGF21-engarce]<sub>1</sub>**

Se trataron 34,6 g de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> en tampón lactato de sodio 30 mM a pH 4,8 (9,7 g/l, 3,569 l) con tampón MES 25 mM a pH 7,0 (2,1 l) hasta ajustar el pH a 6,3. A continuación, se añadieron 1,81 g de [L1-SEQ ID NO: 64] disueltos en 90,2 ml de WFI (agua para inyección) (la concentración final de [L1-SEQ ID NO: 64] fue de 0,065 mM o aproximadamente 0,31 mg/ml) a la solución de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. Se enjuagó el recipiente de [SEQ ID NO: 10-L1] con tampón para garantizar que se añadiera todo el péptido. La mezcla de reacción final puede ser de aproximadamente 6.0 g/l para h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. Se mezcló bien la reacción durante 5 min y luego se redujo el mezclado a TA. Se dejó esta mezcla a TA durante una noche, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20 horas con agitación suave. Se tomó una pequeña cantidad de material para el análisis mediante cromatografía de HIC para confirmar la formación de [SEQ ID NO: 10-L1]-[SEQ ID NO: 25 y 26]-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>, (ABC-1). El análisis de HIC mostró un rendimiento del 90 % de (ABC-1). El rendimiento de la etapa de conjugación se calculó como la pureza de la valencia +2 de [SEQ ID NO: 10-L1]-[SEQ ID NO: 25 y 26]-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub> (ABC-1) mediante HIC (%).

Se retiró el exceso de [L1-SEQ ID NO: 64] usando cromatografía de intercambio aniónico Capto Q, y se combinaron entre sí las fracciones de la cromatografía de Capto Q, y se concentraron más y se sometieron a diafiltración, dando la sustancia farmacológica final.

**Ejemplo 59. Enriquecimiento del Ab completamente reactivo usando columna de Fenilo 650 S**

Se enriqueció Ab (h38C2) completamente reactivo usando una columna de escala 9,5 l rellena de resina de fenilo 650S Tosoh® usando una columna de 30 cm de diámetro rellena hasta una altura de lecho de 14 cm. Se preequilibró la columna y se lavó con 2 VC (volumen de columna) de WFI y 5 VC de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M a pH 7,0. Se cargó la combinación h38C2 (153 g) a 15 mg/ml sobre la columna de fenilo 650S a TA. A continuación, se procesó la carga h38C2 a través de las resinas de fenilo 650 S Tosoh® usando un procedimiento Unicorn programado en el deslizamiento de cromatografía automatizada. Primero se realizó la elución con lavado de 1 VC usando fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0; luego la reducción de la sal desde A al 100 % (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0) hasta B al 67 % (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0) en 7 VC, mantenimiento de B al 67 % durante 6 VC, luego de B al 100 % en 3 VC, seguido de la elución desde B al 100 % hasta C al 70 % (fosfato de sodio 20 mM, hexanodiol al 20 %, pH 7,0) en 1 VC, luego manteniendo el gradiente en C al 70 % durante 5 VC. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante ensayo de HIC para determinar la pureza con el fin de determinar qué fracciones se agruparían. El h38C2 completamente conjugable puede servir como materia de alimentación para las etapas de bioconjugación posteriores que conducen al producto final deseado.

**Conclusiones:** Se desarrollaron tres etapas de conjugación como parte del procedimiento de producción de la sustancia farmacológica de anticuerpo biespecifico de bioconjugado ABC-1. Se exploraron dos estrategias diferentes para conjugar y purificar los productos intermedios del procedimiento que conducirían a la generación de la sustancia farmacológica final. Se aumentó a escala la estrategia 2 satisfactoriamente en el laboratorio y se realizó sistemáticamente en ensayos repetidos.

**Ejemplo 60. Optimización de RP de Butilo para la purificación de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>**

**Protocolos experimentales**

Los experimentos de cromatografía se realizaron a escala de 4 ml o de 103 ml usando los protocolos y las condiciones de funcionamiento que se muestran a continuación:

10 Columna de 4 ml – 0,5 cm de diámetro x 20 cm de altura operada en condiciones ambiente.

- Tampón A: Fosfato 50 mM, pH 7,0
- Tampón B: Fosfato 50 mM, pH 7,0, 1,6-hexanodiol al 20 %
- Tampón C: Fosfato 50 mM, pH 6,5
- Caudal: 125 cm/h.

15 Se recogieron fracciones de 2 ml a través del lavado y del gradiente usando Frac 950 dotado de una placa de microtitulación de pocillos profundos de VWR.

**Tabla 32.** Datos del experimento con gradientes para cada serie. Cada serie de columna era WFI preequilibrada con 3 volúmenes de columna (VC). El equilibrado tuvo lugar con 5 VC, tras lo que las columnas se cargaron con las combinaciones de conjugación de FGF21 a 4 mg/ml. Durante la etapa de elución en gradiente, la composición de fase móvil que la columna experimenta en cualquier etapa dada se expresa como una mezcla de tampón A y tampón B que se mezclan en las proporciones especificadas. Por ejemplo, una etapa en gradiente desde B al 12 % hasta B al 40 % significa una composición de partida de una mezcla de B al 12 % + A al 88 % que cambia linealmente con el tiempo hasta la composición final de B al 40 % + A al 60 % a lo largo de 11 volúmenes de columna. Después de la etapa de elución en gradiente, se lavó abundantemente cada serie de columna con 5 VC de tampón B al 100 %. Tras ello, se limpió cada serie de columna con 5 VC de NaOH 0,5 N en una dirección de flujo ascendente y después se lavó abundantemente con 5 VC de NaOH 0,1 N. Todas las evaluaciones preliminares se realizaron usando una columna de 4 ml (0,5 cm de diámetro x 20 cm de altura) rellena de resina de butilo 650S Tosoh.

n.º de serie	118	128	132	134	138	148	152	156
Temp. (°C)	22	22	22	22	22	17	17	17
Equil	A al 100 %	C al 100 %	A al 100 %					
Carga	5 ml	10 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
% de tampón de lavado	3 VC de A al 100 %	5 VC de A al 100 %	5 VC de A al 100 %	10 VC de B al 25 %, A al 75 %	10 VC de B al 12 %, A al 88 %	10 VC de B al 12 %, A al 88 %	10 VC de B al 12 %, C al 88 %	10 VC de B al 12 %, A al 88 %
Gradiente	10 VC de B al 0-90 %, A al 100-10 %	10 VC de B al 0-90 %, A al 100-10 %	20 VC de B al 0-90 %, A al 100-10 %	30 VC de B al 25-90 %, A al 75-10 %	30 VC de B al 12-90 %, A al 88-10 %	30 VC de B al 12-90 %, A al 88-10 %	30 VC de B al 12-90 %, C al 88-10 %	11 VC de B al 12-40 %, A al 88-60 %

30 **Serie n.º 118:** la primera serie de columna de butilo 650 S n.º 118 se realizó a una carga de columna de 5 mg/ml usando la solución de reacción de conjugación de h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. La columna se cargó sin ninguna sal liotrópica añadida y se operó en condiciones de temperatura ambiente. Se preequilibró la columna y se lavó con 3 VC (volumen de columna) de WFI y 5 VC de tampón A al 100 % (fosfato de sodio 50 mM a pH 7,0). Se cargó la combinación de conjugación filtrada de h38C2-[SEQ ID NO: 10- L1]<sub>1</sub> a 5 mg/ml en la columna de butilo 650S y luego se procesó a través de la resina de Butilo 350 S usando un procedimiento de Unicorn programado. Se lavó la columna con 5 VC de tampón A al 100 %, luego se ejecutó un gradiente lineal desde A al 100 % + B al 0 % (fosfato de sodio 50 mM, hexanodiol al 20 %, pH 7,0) hasta A al 10 % + B al 90 % en 10 VC; manteniendo el gradiente en B al 100 % con 5 VC. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante ensayo de SEC. En la Tabla 33, se muestran los resultados analíticos de la SEC.

40 Los resultados indican la buena separación entre Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> y la FGF21 libre. Aunque parte de la especie mAb (+0) libre resultó coeluirse en el extremo frontal del máximo del producto Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>, la mayor parte de la especie mAb (+0) se eluyó después en el gradiente de 1,6-hexanodiol.

**Tabla 33.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 118.

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab- [FGF21ΔH-A129C- L1] <sub>2</sub>	% de Ab- [FGF21ΔH-A129C- L1] <sub>1</sub>	% de Ab	% de [FGF21Δ H-A129C-L1] <sub>1</sub>
Carga bruta	4	0,7	3,3	8,9	37,3	48,9	1,0
B5	0,27	0,0	1,0	98,2	0,7	0,0	0,2
B3	0,11	0,0	2,2	65,0	25,4	7,1	0,3
B2	0,26	0,0	2,2	9,9	47,9	39,8	0,2
B1	1,02	0,0	1,1	1,8	85,2	11,8	0,0
C2	0,90	0,1	2,8	1,9	82,6	12,5	0,0
C4	0,73	0,0	0,9	0,0	1,7	97,4	0,0
C5	1,43	0,0	1,1	0,0	0,7	98,3	0,0

5 Serie n.º 128: se evaluó el efecto del aumento de la carga de proteína a 10 mg/ml en la serie de columna n.º 128, mientras que se mantuvo el gradiente igual que en la serie de columna n.º 118. Para este experimento, se utilizó una  
 10 reacción de conjugación diferente como material de carga. Esta reacción se había optimizado para una mayor concentración relativa de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> (es decir, 44,7 %), pero también tenía una concentración relativa mayor de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> (es decir, 24,4 %) y menor concentración de especies de mAb al 24,7 % mediante ensayo de SEC en comparación con la solución de carga usada en la serie de columna n.º 118. Se espera que los niveles más altos de las especies Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> y una mayor carga proteínica afecten al rendimiento de la columna y a la composición del producto de la combinación de elución. Como se desprende de la Tabla 34, las cargas crecientes dan lugar a la reducción de la resolución de las especies de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> de Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>.

**Tabla 34.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 128

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab- [FGF21ΔH-A129C- L1] <sub>2</sub>	% de Ab- [FGF21ΔH-A129C- L1] <sub>1</sub>	% de Ab	% de [FGF21Δ H-A129C-L1] <sub>1</sub>
Carga bruta	4,0	0,7	3,3	24,4	44,7	24,7	1,0
B5	1,11	0,0	2,3	81,9	14,1	1,4	0,2
B4	0,89	0,0	2,9	64,9	23,1	8,8	0,3
B3	1,02	0,0	3,5	34,7	22,9	38,7	0,1
B2	1,47	0,0	3,3	9,5	59,9	27,4	0,2
B1	2,00	0,0	2,5	3,6	86,7	7,3	0,0
C1	1,59	0,0	3,3	3,2	86,7	6,9	0,0
C2	0,97	0,0	7,0	6,3	69,9	16,8	0,0
C3	0,72	0,9	10,6	4,9	42,8	40,8	0,0
C4	0,94	0,0	6,5	1,2	10,5	81,7	0,0

15 Serie n.º 132: para mejorar la resolución de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> se realizó una elución de bajo gradiente (A al 100 % + B al 0 % a A al 10 % + B al 90 % en 20 VC) en la serie de columna n.º 132 a una carga de  
 20 columna de 5 mg/ml usando el mismo material de carga usado en la serie de columna n.º 128. La Tabla 35 muestra el perfil de elución y la pureza relativa de diversas especies conjugadas según le determinado mediante SEC para las fracciones de elución. Se obtuvo una separación mejorada entre la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> y la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> con 1,6-hexanodiol poco profundo, lo que sugiere que una elución escalonada diseñada para eluir la mayor parte de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> con una cierta concentración baja de 1,6-hexanodiol sería beneficiosa. Una serie de columna de lavado con hexanodiol al 5 % n.º 134 después de una carga de 5 mg/ml produjo la elución de todas las especies unidas (datos no mostrados).

**Tabla 35.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 132

	Conc. (mg/ml)	Agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
B3	0,19	0,0	1,4	83,3	13,0	2,2
B2	0,32	0,1	0,8	85,6	11,2	1,8
B1	0,20	0,0	0,9	80,9	15,8	2,5
C1	0,22	0,0	2,0	79,1	16,9	3,1
C5	0,27	0,0	2,1	10,2	37,2	50,6
C6	0,36	0,0	1,6	5,6	71,1	21,2
C8	0,58	0,0	2,7	3,5	89,8	5,1
C10	0,29	0,0	4,7	3,9	83,1	10,3
C11	0,20	0,0	5,8	5,3	64,4	25,5
C12	0,18	0,0	8,2	5,6	52,6	35,9
D12	0,15	0,0	5,6	4,9	39,2	47,7
D9	0,21	0,0	3,4	1,1	8,1	85,1
D8	0,28	0,0	1,4	0,6	2,8	93,2

Serie n.º 138: Después, se realizó un experimento con lavado isocrático de 1,6-hexanodiol al 2,4 % (es decir, serie de columna n.º 138) seguido de un gradiente de elución del 2,4 % al 18 % en 30 VC con una densidad de carga de 5 mg/ml. La Tabla 36 muestra el perfil de elución de esta serie con el ensayo de SEC de las fracciones. Se obtuvo una separación mejorada usando la etapa de lavado al 2,4 % que precedió al gradiente de elución observado en este perfil de elución. Basándose en esto, se determinó que el 12 % del Tampón B y el Tampón A al 88 % proporcionan una concentración inicial adecuada de 1,6-hexanodiol a la elución en gradiente lineal de más de 30 VC, mientras que la serie de la columna n.º 134 pareció retirar mediante lavado inicialmente mucho Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> debido a la concentración de 1,6-hexanodiol ligeramente superior.

5

10

**Tabla 36.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 138

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
A5	0,20	0,0	0,7	9,6	84,6	5,1
A10	0,15	0,0	1,0	83,6	11,5	3,8
A12	0,17	0,1	0,8	87,9	9,4	1,8
C8	0,10	0,2	0,7	9,9	11,1	78,2
C11	0,11	0,2	1,7	11,9	34,0	52,1
C12	0,12	0,2	2,0	10,0	53,1	34,8
D1	0,15	0,1	2,0	7,1	72,4	18,3
D5	0,39	0,1	0,9	1,5	93,3	4,2
D8	0,27	0,0	1,5	2,3	89,7	6,4
D9	0,24	0,1	2,2	3,0	86,0	8,7
E2	0,13	0,2	5,6	3,2	34,1	56,9
E4	0,10	0,2	7,9	1,4	21,9	68,5
E9	0,28	0,0	0,3	0,0	0,0	99,7

**Efecto de la temperatura y del pH**

Serie n.º 148: se ha demostrado que la temperatura y el pH son importantes parámetros del procedimiento que influyen en el rendimiento de la columna y en la resolución de las diversas especies conjugadas. Se evaluó el impacto de la temperatura inferior en la serie de columna n.º 148 para la separación de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> de otras especies en este estudio. Para este experimento, la columna y los tampones se almacenaron y se operaron a 17 °C en un refrigerador a temperatura controlada. La columna se cargó hasta 5 mg/ml, y se lavó y se eluyó usando un protocolo similar a la serie de columna n.º 138. La reducción de la temperatura de 22 °C a 17 °C produjo una capacidad de unión enormemente reducida para la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub>. Se encontró que el funcionamiento de la columna a la temperatura reducida (es decir, aproximadamente 17 °C) mejoró la separación de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> en la etapa de lavado y mejoró la resolución del producto Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> como es evidente en el perfil mostrado en la Tabla 37.

**Tabla 37.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 148 a 17 °C

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
Carga de la columna	4,00	1,1	6,7	24,0	43,8	24,4
A3	0,24	0,0	0,0	8,2	17,3	74,5
A5	0,50	0,0	3,6	46,3	45,5	4,6
A7	0,38	0,0	3,1	81,5	10,6	4,8
A9	0,16	0,0	2,9	70,0	17,3	9,8
B11	0,05	0,0	0,0	30,0	32,9	37,1
C3	0,07	0,0	3,6	11,4	18,1	66,9
C7	0,12	0,0	3,6	3,5	27,0	65,9
C11	0,24	0,0	2,7	3,2	68,1	26,0
D3	0,32	0,0	1,2	1,8	91,6	5,4
D7	0,19	0,0	2,2	2,7	89,3	5,8
D11	0,12	0,0	7,0	4,6	74,3	14,1
E5	0,12	0,0	3,5	0,0	12,9	83,6
E9	0,10	0,0	6,1	0,0	2,2	91,8
F1	0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
F5	0,14	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Serie n.º 152: se encontró que el equilibrado de la columna a un pH inferior, de 6,5, pero realizando la elución a un pH superior, de 7,0, fue perjudicial para el rendimiento de separación en 152. Se observó que la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> se une fuertemente a la columna a un pH inferior y se observó un cambio en el perfil de elución a la derecha resultando en una mala separación entre la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> y la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> (Tabla 38).

**Tabla 38.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 152

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
A3	0,15	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7
A9	0,09	0,0	0,0	8,6	87,4	3,2
B9	0,05	0,0	0,6	74,7	15,5	8,8
C1	0,06	0,0	0,4	81,1	14,4	3,9
C5	0,12	0,0	0,6	86,6	10,5	2,1
C9	0,11	0,0	0,6	73,7	22,4	3,1

(Continuación)

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH- A129C- L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH- A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
D1	0,11	0,0	1,2	29,2	49,5	20,0
D5	0,13	0,0	1,8	13,1	25,7	59,5
D9	0,29	0,0	1,6	3,4	84,0	11,0
E1	0,31	0,0	1,3	2,0	93,7	2,9
E5	0,12	0,2	6,7	4,1	74,1	14,8
E8	0,13	0,0	5,9	2,0	24,5	67,5
E9	0,13	0,0	6,1	1,9	19,5	72,6
F1	0,13	0,0	4,1	0,6	1,5	93,8
F5	0,20	0,0	0,4	0,0	0,1	99,5
F9	0,08	0,0	0,9	0,0	0,0	99,1

**Desarrollo de las condiciones finales y demostración de la uniformidad del procedimiento**

5 Serie n.º 156: la combinación seleccionada de las condiciones operativas, es decir, pH, temperatura, condiciones de lavado y elución en gradiente lineal usadas en la serie de columna n.º 148 proporcionaron la resolución adecuada de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub>. Se exploró una mejora adicional en la separación para lograr la resolución de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> de la especie de mAb en la serie de columna n.º 156 usando una etapa de retención isocrática de 1,6-hexanodiol al 8 % durante la elución en gradiente. Con 1,6-hexanodiol al 8 %, se eluye la mayor parte de la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> de la columna dejando una gran proporción de la especie de mAb aún unida a la columna. La especie de mAb se eluyó posteriormente durante la etapa de regeneración con un lavado isocrático de 1,6-hexanodiol al 100 %. Los resultados de la SEC de las fracciones de la serie de columna n.º 156 realizada a 5 mg/ml de densidad de carga de columna se muestran en la Tabla 39. El máximo de elución observado a mitad de la etapa de gradiente está enriquecido en especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> con niveles muy bajos de especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> y algunas especies de mAb. Se preparó una combinación representativa a partir de las fracciones n.º C8-D6, produciendo una concentración de proteína de la combinación de 0,225 mg/ml correspondiente a un rendimiento de proteína de la columna del 24 %.

**Tabla 39.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 156

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH- A129C- L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH- A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
A3	0,22	0,0	1,6	32,5	63,0	2,9
A4	0,44	0,0	2,9	62,9	33,3	0,8
A5	0,13	0,1	3,0	83,5	12,8	0,6
C6	0,13	0,0	3,5	3,0	58,9	34,6
C8	0,21	0,0	2,0	2,1	82,1	13,8
C10	0,30	0,0	1,2	1,7	92,3	4,9
D3	0,22	0,0	1,2	1,4	94,7	2,7
D5	0,13	0,0	2,4	2,2	91,9	3,5
D6	0,10	0,0	3,7	3,0	88,2	5,1
E9	1,32	0,9	9,0	0,0	3,3	86,8
E10	0,80	0,8	4,7	2,0	2,1	90,4

20 Serie n.º 160: se evaluó el rendimiento del aumento a escala en la serie de columna n.º 160 usando una columna de 103 ml rellena usando una columna XK de 2,6 cm de diámetro rellena hasta una altura del lecho de 20 cm. La columna se cargó hasta 5 mg/ml, y se lavó y se eluyó usando un protocolo similar a la serie de columna n.º 156. Los resultados de la SEC de fracciones de la serie de columna n.º 160 realizada a una densidad de carga de columna de 5 mg/ml se muestran en la Tabla 40. El máximo de elución de la etapa de gradiente lineal contenía fracciones de alta pureza enriquecidas en la especie Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. Se preparó una combinación de elución combinando las

fracciones D2 - F1 contenía 36,4 % de proteína total, correspondiente a > 85 % de recuperación de la especie +1 cargada en la columna.

**Tabla 40.** Resultados de fracciones de carga y columna de la SEC para la serie n.º 160

	Conc. (mg/ml)	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
C7	0,13	0,0	2,4	5,1	56,1	36,4
D1	0,16	0,0	2,2	4,4	68,6	24,9
D2	0,22	0,0	1,8	3,4	81,6	13,1
D3	0,33	0,0	1,4	2,6	89,9	6,0
D5	0,49	0,0	0,9	1,7	95,5	1,8
D7	0,54	0,0	0,8	1,3	96,1	1,8
E3	0,39	0,0	0,8	1,5	95,9	1,8
E5	0,27	0,0	1,1	1,4	95,4	2,1
E7	0,11	0,0	1,9	2,2	93,0	2,8
F1	0,11	0,0	2,6	2,5	90,6	4,2
F2	0,11	0,0	2,0	82,9	14,6	0,5
F3	0,11	0,7	6,4	0,0	4,0	88,8

- 5 Se realizaron varias series de columnas (n.º 178, n.º 180 y n.º 182) en condiciones idénticas para ensayar la reproducibilidad del rendimiento a una carga de 5 mg/ml. Se preparó una combinación de elución para cada serie, y los perfiles de las combinaciones de elución de las 3 series realizadas en las mismas condiciones operativas se muestran en la Tabla 41, y los resultados han indicado resultados uniformes.

**Tabla 41.** Reproducibilidad de varias series de aumento a escala

	% de agregados grandes	% de agregados	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>2</sub>	% de Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1] <sub>1</sub>	% de Ab
Combinación final n.º 156	0,0	0	7,2	84,9	7,9
Combinación final n.º 160	0,0	1,3	1,7	94,3	2,7
Combinación final n.º 178	0	1,5	2,9	92,7	2,9
Combinación final n.º 180	0	1,5	1,6	93,4	3,4
Combinación final n.º 182	0	1,4	2,1	92,2	4,3

- 10 Conclusiones: Se escogió Butilo 650 S como la resina candidata preferida para la etapa de purificación cuando el procedimiento de conjugación se llevó a cabo con la proteína FGF-21 acoplada al mAb primero seguido por el péptido Exendina4. La resina proporcionó una buena capacidad de unión de 5 mg/ml en ausencia de sal liotrópica. La elución del producto unido se realizó usando un gradiente de 1,6-hexanodiol a pH 7,0. La especie conjugada
- 15 única Ab-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub> se enriqueció y se eluyó selectivamente usando una estrategia de elución secuencial, es decir, etapa de lavado isocrático con hexanodiol al 2,4 % seguida de una elución de gradiente lineal de hexanodiol al 2,4 %-8 %. Se obtuvo un rendimiento de más del 85 % para la especie mAb +1 FGF21 cargada en la columna.

- 20 Se encontró que la concentración de hexanodiol durante el paso de lavado, la densidad de carga de la columna, el pH y la temperatura eran parámetros importantes que influían en la capacidad de unión, la resolución y el rendimiento de la columna. Se aumentó a escala la etapa de purificación satisfactoriamente hasta la escala de 100 ml en el laboratorio y se realizó sistemáticamente en ensayos repetidos.

**Ejemplo 61. Ensayos *in vitro* de moléculas ABC**

En el ensayo Taqman de Glut1, se usaron adipocitos 3T3-L1 diferenciados para medir la expresión de ARNm de mediante el procedimiento de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) descrito más adelante. Se trataron los adipocitos 3T3-L1 diferenciados los días 10-14 privados de suero durante la noche con compuestos durante 6 h. Se extrajo el ARN total de estas células, y se midió la expresión de ARNm de Glut1 y GAPDH usando un kit de RT-PCR de Quantitect Probe, y se realizó una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real en una máquina Taqman. Se determinó la bioactividad de los compuestos mediante un cambio en los niveles de ARNm de Glut1 normalizados por los niveles de ARNm de GAPDH de cada muestra. En el ensayo de AMPc, se sembraron células de ovario de hámster chino (CHO) que sobreexpresaban GLP-1R humano (CHO-hGLP-1R) en placas de 96 pocillos en medio exento de suero con IBMX 300  $\mu$ M. Se incubaron las células con compuestos a TA durante 1 h. Se midieron los niveles de AMPc usando un kit de AMPc de CisBio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la bioactividad de los compuestos mediante los valores de CE<sub>50</sub> obtenidos del ensayo (véase la Tabla 42).

**Tabla 42.** Potencia *in vitro* de los compuestos en los ensayos Taqman de Glut1 y AMPc

Comp.	CE <sub>50</sub> (nM) de FGF21 (Glut1) (N)	CE <sub>50</sub> (pM) de hGLP-1R (AMPc) (N)
FGF21	2,1(2)	--
Ab[FGF21] <sub>2</sub>	1,1	--
Ab[Ex4] <sub>2</sub>	--	2,4(2)
ABC-1	0,8(7)	25,7(4)

**Ejemplo 62. Ensayos *in vivo* de ABC en modelos murinos**

**Farmacocinética.** Se evaluó la farmacocinética de [SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>h38C2-(IgG1)-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>, también denominado conjugado bifuncional asimétrico-1 (ABC-1), en ratones Swiss-Webster macho (22-24 g). Los ratones recibieron los compuestos IV y SC a 3 mg/kg, y se tomaron muestras de sangre de 3 ratones por punto de tiempo en los diferentes puntos de tiempo hasta 120 horas. Se prepararon muestras de suero y se analizaron mediante dos ensayos ELISA. En el ensayo de GLP-1, los conjugados fueron capturados por el anticuerpo específico C-terminal de Exendina4 y detectados por el mAb específico de GLP-1 N-terminal. En el ensayo de FGF21, los conjugados se capturaron con anticuerpo anti-Id y se detectaron mediante un mAb FGF21. Las estimaciones de parámetros PK se resumen en la Tabla 43.

**Tabla 43.** Estimaciones de parámetros PK de ABC-1 tras la administración IV y SC a 3 mg/kg en ratones Swiss-Webster

Ensayo	T <sub>1/2</sub> (h)		AUC (h* $\mu$ g/ml)		C <sub>máx</sub> ( $\mu$ g/ml)		CL (ml/h/kg)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC	
GLP-1	94	80	1108	1028	21,7	6,9	2,7	2,9	93
FGF21	34	34	872	489	35,0	10,3	3,4	3,8	56

**Peso corporal y AUC de glucosa.** Se evaluó la eficacia *in vivo* de ABC-1 en un estudio de una sola dosis en ratones ob/ob. Los compuestos se administraron SC el día 0 a 1 o 3 mg/kg, y se realizó un OGTT el día 3. ABC-1 redujo significativamente el peso corporal a 1 y 3 mg/kg, y mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa a 3 mg/kg 3 días después de una sola dosis única (Tabla 44).

**Tabla 44.** Variación del peso corporal a partir del día 0 medida al día 3, y AUC de glucosa durante el OGTT medida al día 3, tras una sola inyección SC de ABC-1 en ratones ob/ob. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett. Valores de ETM proporcionados entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Variación media del peso corporal (ETM)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)
Vehículo	+ 1,42 (0,32)	100
ABC-1 (1)	+0,47 (0,30)*	74
ABC-1 (3)	-1,97 (0,29)***	40***
Control de delgados (vehículo)	+0,95 (0,16)	62*

**Comparación de diferentes moléculas de ABC *in vivo*.** Se compararon dos moléculas bifuncionales asimétricas (ABC): ABC-1 y ABC-2. Ambas ABC comprenden la fórmula: [SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>[Ab]-[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>1</sub>. Ambas ABC comprenden una versión de h38C2 como anticuerpo: ABC-1 comprende una versión de IgG1 de h38C2 (SEQ

ID NO: 25 y 26) y ABC-2 comprende una versión de IgG2 de h38C2 (SEQ ID NO: 25 y 76). Se comparó la potencia *in vitro* de ABC-1 y ABC-2 en ensayos basados en células (ensayo de Glut1 para el grupo de FGF21 y ensayo de AMPc para el grupo de GLP-1), y mostraron actividades comparables.

5 Se evaluó la farmacocinética de ABC-2 en ratones Swiss-Webster macho (22-24 g). Los ratones recibieron los compuestos IV y SC a 3 mg/kg, y se tomaron muestras de sangre de 3 ratones por punto de tiempo en los diferentes puntos de tiempo hasta 120 horas. Se prepararon muestras de suero y se analizaron mediante dos ensayos ELISA. En el ensayo de GLP-1, los conjugados fueron capturados por el anticuerpo anti-Id y detectados por el mAb específico de GLP-1 N-terminal. En el ensayo de FGF21, los conjugados se capturaron con anticuerpo anti-Id y se detectaron mediante un mAb FGF21. Las estimaciones de parámetros PK se resumen en la Tabla 45.

10 **Tabla 45.** Estimaciones de parámetros PK de ABC-2 tras la administración IV y SC a 3 mg/kg en ratones Swiss-Webster

Ensayo	T <sub>1/2</sub> (h)		AUC (h*ug/ml)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	
GLP-1	137	67	5618	3835	68
FGF21	63	47	1454	1116	77

15 Se evaluó la eficacia *in vivo* de ABC-1 y ABC-2 en un estudio de una sola dosis en ratones ob/ob. Los compuestos se administraron SC el día 0 a 0,3 o 3 mg/kg, y se realizó un OGTT el día 3. Ambos compuestos a 3 mg/kg redujeron significativamente el peso corporal y mejoraron la tolerancia a la glucosa 3 días después de una sola dosis única (Tabla 46).

**Tabla 46.** Variación del peso corporal del día 0 al día 3 y AUC de glucosa durante el OGTT medida al día 3, tras una sola inyección SC de ABC-1 y ABC-2 en ratones ob/ob. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Variación media del peso corporal (ETM)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)
Vehículo	+2,2 (0,13)	100
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (0,3)	+ 1,03 (0,52)	70*
Ab[FGF21] <sub>2</sub> (3)	+0,58 (0,31)	74*
ABC-1 (0,3)	+ 1,72 (0,18)	83
ABC-1 (3)	-1,97 (0,21)***	45***
ABC-2 (0,3)	+ 1,88 (0,14)	77
ABC-2 (3)	-2,42 (1,01)***	50***
Control de delgados (vehículo)	+ 1,03 (0,17)	61**

20 **Ejemplo 63. Ensayos *in vivo* de ABC en macacos cangrejeros**

También se investigó la farmacocinética de ABC-1 en el macaco cangrejero macho tras la administración de un solo bolo IV y SC a un nivel de dosis de 3 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre de los animales en los puntos de tiempo designados hasta las 21 horas. Se prepararon muestras de suero y se analizaron mediante dos ensayos ELISA. En el ensayo de GLP-1, los conjugados fueron capturados por el anticuerpo específico C-terminal de Exendina4 y detectados por el mAb específico de GLP-1 N-terminal. En el ensayo de FGF21, los conjugados se capturaron con anticuerpo anti-Id y se detectaron mediante un mAb FGF21. Las estimaciones de parámetros PK se resumen en la Tabla 47.

**Tabla 47.** Estimaciones de parámetros PK de ABC-1 tras la administración IV y SC a 3 mg/kg macacos cangrejeros.

Ensayo	T <sub>1/2</sub> (h)		AUC (h*ug/ml)		C <sub>máx</sub> (ug/ml)		CL (ml/h/kg)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC	
GLP-1	77	71	3088	2110	65,6	19,1	1,0	1,5	68
FGF21	60	48	2233	1339	77,3	17,7	1,4	2,3	60

**Ejemplo 64. Eficacias de las dosis de ABC-1**

**Eficacia de la dosis repetida de ABC-1.** Se evaluó la eficacia de la dosis repetida de ABC-1 en comparación con Ab[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> (también denominado Ab[FGF21]<sub>2</sub>) y Ab[L1-SEQ ID NO: 64]<sub>2</sub> (también denominado Ab[Ex4]<sub>2</sub>) en ratones db/db. Los compuestos se administraron el día 0 y 7. El peso corporal se midió dos veces a la semana, y se realizó un OGTT el día 10. El día 11, se recogieron muestras de hígado, páncreas y suero para el análisis de lípidos e inmunohistoquímica (IHC). ABC-1 (10 mg/kg) redujo significativamente el aumento de peso corporal en comparación con el grupo tratado con el vehículo 3 días después de la segunda dosis, y también normalizó el nivel de glucemia en ayunas y mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa en mayor medida que los agentes individuales solos 3 días después de la segunda dosis en estos ratones (Tabla 48). Además, el ABC-1 redujo significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol en suero, y redujo el contenido de triglicéridos hepáticos en ~43 % en comparación con el grupo tratado con vehículo (Tabla 49). En el páncreas, se observó un aumento significativo en la masa de células beta en 2,7 veces, analizado por IHC en ratones tratados con ABC-1 (Tabla 49).

**Tabla 48.** Variación del peso corporal del día 0 al día 10 y AUC de glucosa durante el OGTT medida al día 3, tras la inyección SC repetida de compuestos ratones ob/ob. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett. Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Variación media del peso corporal (ETM)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)
Vehículo	2,4 (0,2)	100
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (3)	1,7(0,2)	60***
Ab[FGF21] <sub>2</sub> (10)	3,6 (0,2)	67***
ABC-1 (10)	0,5(0,8)*	47***
Control de delgados (vehículo)	1,7 (0,1)	35***

**Tabla 49.** Lípidos en suero, niveles de triglicéridos hepáticos y masa de células beta pancreáticas el día 11 después de la inyección SC repetida de los compuestos en ratones db/db. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett. Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Nivel de triglicéridos medio en suero (mg/dl) (ETM)	Nivel de colesterol medio en suero (mg/dl) (ETM)	Nivel medio de triglicéridos hepáticos (mg/dl) (ETM)	Masa media de células beta (mg) (ETM)
Vehículo	542 (91)	177 (8,3)	13,0 (2,2)	0,67 (0,09)
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (3)	302 (21)*	167 (4,9)	17,4 (1,4)	1,39 (0,23)
Ab[FGF21] <sub>2</sub> (10)	356 (35)	171 (7,3)	9,6 (2,2)	1,60 (0,13)*
ABC-1 (10)	234 (42)**	120 (8,3)***	7,4 (1,8)	1,82 (0,30)**
Control de delgados (vehículo)	ND	ND	ND	1,23 (0,21)

Se recogieron datos adicionales de la eficacia de dosis repetidas con ABC-1 en comparación con agentes Ab[FGF21]<sub>2</sub> y Ab[Ex4]<sub>2</sub> en ratones db/db para definir mejor los efectos de la molécula sobre la función pancreática y la masa de células beta. Los compuestos se administraron el día 0 y 7, y se realizó un OGTT el día 10. En el punto de tiempo de 15 minutos del OGTT, se recogió sangre para la medición de la secreción de insulina plasmática estimulada por glucosa. El día 11, se recogieron muestras de páncreas para los análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos. Todos los tratamientos mejoraron significativamente la tolerancia a la glucosa en comparación con los controles tratados con vehículo. Se observó la potenciación de la secreción de insulina inducida por glucosa y una mayor proliferación de células inmunorreactivas de insulina (% de células beta positivas para PCNA) en todos los grupos de tratamiento en comparación con los controles tratados con el vehículo, a excepción de la dosis más alta de ABC-1 (10 mg/kg). Así pues, a las dosis más bajas de ABC-1 ensayadas, los efectos del compuesto sobre el páncreas coinciden con los de los agentes individuales. Inesperadamente, la dosis de 10 mg/kg de ABC-1 se asoció con un aumento de la tinción de insulina inmunorreactiva (masa de células beta) y el contenido de insulina pancreática sin un aumento significativo en la proliferación de las células beta o en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Estos datos sugieren que a dosis de ABC-1 asociadas a una mayor pérdida de peso (véase la Tabla 48 anterior y estudios en ratones DIO que se presentan más adelante), un efecto sensibilizador de la insulina anula el impulso para la proliferación de las células beta y la secreción de insulina, generando una acumulación de insulina en células beta preexistentes.

**Tabla 50.** Tolerancia a la glucosa, secreción de insulina estimulada por glucosa y estado de las células beta pancreáticas al día 1 después de la inyección SC repetida de compuestos en ratones db/db. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)	Insulina media en plasma a los 15 min (ng/ml) (ETM)	Masa media de células beta (mg) (ETM)	% de células beta positivas en PCNA (ETM)	Contenido medio de insulina pancreática (ug/mg de proteína total) (ETM)
Vehículo	100	4,2 (0,6)	0,32 (0,02)	1,1 (0,4)	2,26 (0,54)
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (3)	61***	7,8 (1,0)	0,54 (0,08)	3,3 (0,4)*	2,25 (0,42)
Ab[FGF21] <sub>2</sub> (10)	73**	5,8 (1,2)	0,49 (0,05)	4,4 (0,3)**	4,21 (0,88)
ABC-1 (1)	63***	7,1 (1,3)	0,44 (0,05)	3,6 (0,7)*	2,72 (0,61)
ABC-1 (3)	39***	10,2 (1,8)**	0,77 (0,12)**	4,4 (1,0)**	6,40 (2,86)
ABC-1 (10)	36***	3,7 (0,8)	0,71 (0,13)**	2,4 (0,3)	15,98 (3,57)***

5 **Eficacia de la dosis subcrónica.** Se evaluó la eficacia de dosis subcrónica de ABC-1 en comparación con Ab[FGF21]<sub>2</sub> y Ab[EX4]<sub>2</sub> en ratones DIO (resultados mostrados en la Tabla 51). Todos los compuestos se dosificaron SC una vez a la semana, se midió el peso corporal y la ingesta de alimentos dos veces a la semana, y se realizó un OGTT al día 17, 3 días después de la tercera dosis semanal. El día 20, se recogieron muestras de hígado y suero para el análisis de lípidos. ABC-1 redujo de forma significativa y dependiente de la dosis el peso corporal. A los 3 mg/kg, ABC-1 causó una mayor pérdida de peso que los agentes individuales solos a la misma dosis. ABC-1 inhibió la ingesta de alimentos, hasta la cantidad de Ab[EX4]<sub>2</sub> a 3 mg/kg, lo que indica el efecto GLP-1 de ABC-1. Sin embargo, la cantidad de la inhibición de la ingesta de alimentos no podría explicar la profunda pérdida de peso causada por ABC-1, lo que sugiere que la pérdida de peso inducida por ABC-1 se debe deber a la combinación de ambos grupos de FGF21 y GLP-1. Todos los grupos de tratamiento de ABC redujeron significativamente los niveles de glucemia en ayunas y mejoraron la tolerancia a la glucosa 3 días después de la tercera dosis semanal, y también redujeron significativamente el contenido de triglicéridos hepáticos 6 días después de la tercera dosis semanal. De forma similar a lo que se observó en los ratones db/db, el tratamiento con ABC-1 de una vez a la semana produjo una reducción significativa en los niveles de colesterol en suero en ratones DIO, mientras que ninguno de los agentes individuales tuvo mucho efecto.

20 **Tabla 51.** Variación en el peso corporal, ingesta de alimentos acumulada, glucemia basal y AUC de glucosa durante el OGTT el día 17, y niveles de colesterol en suero y triglicéridos hepáticos al día 20, después de tres inyecciones semanales SC de compuestos en ratones DIO. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Variación media del peso corporal (ETM)	Ingesta media acumulada de alimentos (g)	Glucosa basal media (mg/dl) (ETM)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)	Colesterol medio en suero (mg/dl) (ETM)	Nivel medio de triglicéridos hepáticos (mg/dl) (ETM)
Vehículo	+ 1,2 (0,6)	41,8	161 (15)	100	162 (9)	13,8 (2,9)
Ab[FGF21] <sub>2</sub> (3)	-0,9 (0,6)	45,0	164 (6)	101	164 (8)	6,3 (1,6)*
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (3)	-3,6 (0,3)***	34,6	107(8)***	66***	131 (7)	3,5 (1,7)**
ABC-1 (1)	-3,6 (0,5)***	39,2	113 (6)**	63***	130 (8)*	3,8 (1,8)**
ABC-1 (3)	-7,8 (1,2)***	34,6	95 (6)***	64***	112 (6)***	3,0 (0,9)***
ABC-1 (10)	-10,1 (1,1)***	36,9	91 (5)***	57***	95 (21)***	4,3 (1,2)*

25 **Duración del efecto.** Para determinar la duración del efecto de ABC-1 *in vivo*, se realizó un estudio de eficacia de una sola dosis en ratones DIO. Se administraron 3 mg/kg de ABC-1 SC al día 0, se midió el peso corporal diariamente y se realizó un OGTT el día 13. ABC-1 demostró una eficacia sostenida en la causa y el mantenimiento de la pérdida de peso y en la mejora de la tolerancia a la glucosa hasta 13 días después de una sola dosis en ratones DIO.

**Tabla 52.** Variación del peso corporal hasta el día 13 tras una sola inyección SC de 3 mg/kg de ABC-1 en ratones DIO. \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante el ensayo t para muestras no relacionadas. Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Días después de la dosis	Variación media del peso corporal (ETM)	
	Vehículo	ABC-1 (3 mg/kg)
2	-1,0 (0,2)	-2,6 (0,2)***
4	-1,0 (0,3)	-3,2 (0,2)***
6	-1,2 (0,2)	-2,9 (0,3)***
8	-1,4 (0,2)	-3,1 (0,3)***
10	-1,1 (0,3)	-3,1 (0,3)***
12	-0,9 (0,3)	-2,8 (0,3)***
13	-0,9 (0,3)	-2,6 (0,3)***

**Tabla 53.** AUC de glucosa durante el OGTT 13 después de una sola inyección SC de 3 mg/kg de ABC-1 en ratones DIO. \*\* $p < 0,01$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett

Tratamiento (mg/kg)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)
Vehículo	100
ABC-1 (3)	76**

Para determinar la duración del efecto de ABC-1 en comparación con Ab[FGF21]<sub>2</sub> t Ab[Ex4]<sub>2</sub> solos, y la combinación física de los dos *in vivo*, se realizó un estudio de eficacia de una sola dosis en ratones DIO. Todos los compuestos se administraron SC el día 0, se midió el peso corporal dos veces a la semana y se realizó el OGTT los días 7, 13 y 21. Los resultados se muestran en la Tabla 54. ABC-1 demostró una eficacia sostenida en la causa y el mantenimiento de la pérdida de peso y en la mejora de la tolerancia a la glucosa hasta 21 días después de una sola dosis en ratones DIO. La pérdida de peso inducida por ABC-1 fue superior a la de los agentes individuales solos, y comparable con la combinación de Ab[FGF21]<sub>2</sub> y Ab[Ex4]<sub>2</sub> juntos. Sin embargo, la AUC de glucosa durante el OGTT en el grupo de combinación volvió a los niveles del grupo tratado con vehículo, mientras que los del grupo tratado con ABC-1 todavía fueron significativamente inferiores a los del grupo tratado con vehículo. Estos datos indican la eficacia superior y sostenida de ABC-1 con respecto a los agentes individuales solos, así como la combinación física de los dos. La eficacia sostenida de ABC-1 *in vivo* sostiene la dosificación de una vez a la semana del compuesto.

**Tabla 54.** Variación del peso corporal y AUC de glucosa durante el OGTT, el día 7, 13 y 21 tras una sola inyección SC de compuestos en ratones DIO. #no disponible debido a la finalización del grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Variación media del peso corporal (ETM)			AUC de glucosa media (% de control de vehículo)		
	Día 7	Día 13	Día 21	Día 7	Día 13	Día 21
Vehículo	+0,9 (0,5)	+2,2 (0,7)	+4,4 (0,8)	100	100	100
ABC-1 (3)	-2,9 (0,2)***	-1,2 (0,4)***	+0,7 (0,4)***	64***	81	83*
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (0,3)	+0,6 (0,3)	+2,3 (0,6)	ND#	77***	103	ND#
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (1,5)	-1,3 (0,4)***	+0,4 (0,4)*	+2,4 (0,5)	62***	75*	98
Ab[FGF21] <sub>2</sub> (3)	+0,4 (0,3)	ND	ND	101	ND	ND
FGF21 (0,6)	+ 1,4 (0,3)	ND	ND	99	ND	ND
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (0,3)+ Ab[FGF21] <sub>2</sub> (3)	-1,7 (0,4)***	-1,4 (0,5)***	0,0 (0,7)***	79**	101	ND
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (0,3) + FGF21 (0,6)	+0,1 (0,2)	+0,8 (0,2)	+3,2 (0,4)	77***	98	ND

Eficacia de la dosis subcrónica. También se evaluó la eficacia de la dosis subcrónica de ABC-1 en comparación con la combinación física de Ab[FGF21]<sub>2</sub> y Ab[Ex4]<sub>2</sub> en ratones DIO (Tabla 55). Todos los compuestos se administraron SC una vez a la semana. Se midió el peso corporal dos veces a la semana, y se realizó un OGTT 3 días después de la tercera dosis semanal. ABC-1 redujo significativamente la pérdida de peso y mejoró la tolerancia a la glucosa en la misma medida en que los grupos de combinación de la misma cantidad total de dosis o las dosis similares coincidieron con la potencia *in vitro*.

**Tabla 55.** Variación en el peso corporal y AUC de glucosa durante el OGTT el día 17, y niveles de colesterol en suero el día 18, después de tres inyecciones semanales SC de compuestos en ratones DIO. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001 frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayos posteriores de Dunnett. Los valores de ETM se proporcionan entre paréntesis.

Tratamiento (mg/kg)	Variación media del peso corporal (ETM)	Ingesta media acumulada de alimentos (g)	AUC de glucosa media (% de control de vehículo)	Nivel de colesterol medio en suero (mg/dl) (ETM)
Vehículo	-1,3 (0,5)	44,0	100	163 (11)
ABC-1 (3)	-5,1 (0,9)	46,9	67***	125 (7)**
ABC-1 (10)	-9,5 (1,4)***	43,9	58***	102 (5)***
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (0,3)+Ab[FGF21] <sub>2</sub> (3)	-4,8 (0,8)	50,8	62***	132 (10)*
Ab[Ex4] <sub>2</sub> ( 1)+Ab[FGF21] <sub>2</sub> ( 10)	-9,3 (1,3)***	49,0	52***	107 (5)***
Ab[Ex4] <sub>2</sub> (5)+Ab[FGF21] <sub>2</sub> (5)	-11,4 (1,2)***	39,2	52***	109 (3)***

Las mayores reducciones de magnitud en el aumento del peso corporal inducidas por el tratamiento con ABC-1 se observaron en ausencia de mayores reducciones en la ingesta de alimentos que las inducidas por los agentes individuales Ab[FGF21]<sub>2</sub> o Ab[Ex4]<sub>2</sub> (véanse las Tablas 51 y 55). Se realizaron estudios de calorimetría indirecta en ratones DIO para determinar si la pérdida de peso adicional inducida por ABC-1 en comparación con los agentes individuales se debía a un aumento en el gasto energético. Los compuestos se inyectaron SC el día 0 y el día 7, y los parámetros se evaluaron de manera continua durante 48 horas comenzando inmediatamente después de la segunda dosis. Ab[Ex4]<sub>2</sub> (1 mg/kg) no alteró el consumo de O<sub>2</sub>, la producción de CO<sub>2</sub>, la producción de calor ni el cociente respiratorio. Ab[FGF21]<sub>2</sub> (10 mg/kg) aumentó el consumo de O<sub>2</sub>, la producción de CO<sub>2</sub> y la producción de calor, pero no afectó al cociente respiratorio. Inesperadamente, los efectos de ABC-1 (10 mg/kg) sobre el consumo de O<sub>2</sub>, la producción de CO<sub>2</sub> y la producción de calor fueron comparables y no superiores a los de Ab[FGF21]<sub>2</sub> (10 mg/kg). Por lo tanto, la mayor pérdida de peso corporal inducida por ABC-1 no se puede explicar por un mayor gasto de energía, superior al efecto de los agentes individuales.

**Ejemplo 65. Análisis de la matriz génica**

Se llevaron a cabo análisis de la matriz génica para estudiar un número más amplio de candidatos en tejido hepático y tejido adiposo blanco con el fin de dilucidar el mecanismo para aumentar la pérdida de peso provocada por ABC-1. Los ratones DIO recibieron una vez a la semana durante 3 semanas ABC-1 (10 mg/kg), Ab[FGF21]<sub>2</sub> (10 mg/kg) o Ab[Ex4]<sub>2</sub> (3 mg/kg), y se identificaron los genes regulados diferencialmente por el tratamiento con ABC-1, pero no Ab[FGF21]<sub>2</sub> o Ab[Ex4]<sub>2</sub>. De los más de 45.000 genes evaluados por matriz, los análisis de qPCR posteriores confirmaron una regulación positiva y negativa selectiva de un subconjunto de genes en el hígado de ratones tratados con ABC-1, pero no en ratones tratados con Ab[FGF21]<sub>2</sub> o Ab[Ex4]<sub>2</sub> (Tabla 56 ). Algunos de los genes identificados fueron particularmente inesperados, y sugieren nuevos mecanismos de acción para la terapia con ABC-1 no anticipados por Ab[FGF21]<sub>2</sub> ni por Ab[Ex4]<sub>2</sub> (por ejemplo, Acot3, Saa1/2). Estos genes también pueden ser útiles marcadores farmacodinámicos predictivos.

**Tabla 56.** Cambios en la expresión génica el día 20, después de tres inyecciones semanales SC de compuestos en ratones DIO.

Genes		Función	Cambio múltiplo
Abcd2	Casete de unión a ATP d2	Transportador de ácidos grasos	+4
Acot3	Acil-CoA tioesterasa 3	Oxidación de ácidos grasos de peroxisomas	+80
CIDEA	Efactor de tipo DFFA inductor de muerte celular A	Apoptosis	-10
Cyp2b9	Citocromo P450, familia 2, subfamilia b	Oxidación de ácidos grasos	+100

(Continuación)

Genes		Función	Cambio múltiplo
Cyp4a14	Citocromo P450, familia 4, subfamilia a, polipéptido 14	Metabolismo de ácidos grasos	+22
Fmo2	Monooxigenasa que contiene flavina 2	Metabolismo de fármacos	+2,8
Gstm5	glutación S-transferasa mu 5	Desintoxicación	+2,0
Hmgcr	3-hidroxi-3-metolglutaril-CoA reductasa	Biosíntesis del colesterol	+5
Klb	β-Klotho	Correceptor de FGF21	+ 1,6
Lepr	Receptor de leptina	Señalización de leptina	+7,8
Saa1/2	proteína 1/2 de amiloide sérico A	Marcador de inflamación	-5,6
Scd1	estearoil-Coenzima A desaturasa 1	Síntesis de ácidos grasos	+2,9
Srebf2	Proteína de unión a elementos reguladores de esterol 2	Metabolismo del colesterol	+ 1,9

5 Por consiguiente, en algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de evaluación o determinación de la idoneidad de un paciente para un tratamiento de un trastorno metabólico, que comprende medir los niveles de expresión génica de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en Abcd2, Acot3, Cidea, Cyp2b9, Cyp4a14, Fmo2, Gstm5, Hmgcr, Klb, Lepr, Saa1/2, Scd1 y Srebf2, y comparar el nivel de expresión génica con el nivel de expresión génica respectivo después de un período inicial de tratamiento. En algunos aspectos, los genes se seleccionan del grupo que consiste en Acot3 y Saa1/2. Las mediciones de la expresión génica pueden ser *in vitro*. Las mediciones de la expresión génica pueden ser extracorpóreas.

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de determinación de los niveles de expresión relativa de un gen seleccionado del grupo que consiste en Abcd2, Acot3, Cidea, Cyp2b9, Cyp4a14, Fmo2, Gstm5, Hmgcr, Klb, Lepr, Saa1/2, Scd1 y Srebf2, que comprende medir los niveles de expresión génica antes y después del tratamiento con un compuesto de la divulgación, o uno o ambos de un agonista del receptor de FGF21 y/o un agonista del receptor de GLP1. Dicha determinación se puede usar entonces para recomendar un curso clínico de acción.

15 En algunos aspectos, el procedimiento comprende medir la expresión de dichos genes en el hígado. En algunos aspectos, el procedimiento se refiere a un procedimiento para evaluar la probabilidad de un paciente de perder peso como resultado del tratamiento con un compuesto de la divulgación, basándose dicho procedimiento en un aumento en la expresión de Acot3 y/o una disminución en la expresión de Saa1/2 para sugerir que el paciente tiene más probabilidades de experimentar pérdida de peso como resultado del tratamiento con un compuesto de la divulgación, o un agonista del receptor de FGF21 y/o un agonista del receptor de GLP1.

#### 20 **Ejemplo 66. Estabilidad de h38C2-[SEQ ID -NO: 7-L1]<sub>2</sub> y h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub>**

Se prepararon diversas formulaciones de h38C2-[SEQ ID NO: 7-L1]<sub>2</sub> (Ab-[FGF21AH-H125C-L1]<sub>2</sub>) y h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>2</sub> (Ab-[FGF21ΔH-A129C-L1]<sub>2</sub>) y se sometieron a un intervalo de condiciones de estrés (los datos completos se encuentran en los documentos US2011/13289533, US61/579,609 y PCT/IB2011/054874, estando cada uno de sus contenidos, en particular los Ejemplos 72-76 incluidos por referencia en el presente documento). Comparando los datos de varios ensayos de estabilidad, tales como un ensayo del aspecto, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), electroforesis capilar (iCE) y ultracentrifugación analítica, el perfil de estabilidad general de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub> parecía ser superior al de Ab-[L1-FGF21ΔH-H125C]<sub>2</sub>. También es evidente que la reducción del pH de la formulación (por ejemplo, acetato, pH 4) proporcionó una mejor estabilidad en comparación con un pH más alto (por ejemplo, pH 6-8).

#### 30 **Ejemplo 67. Formulaciones de [FGF21-L1]<sub>1</sub>-[AbHL1-Ex4]<sub>1</sub> y Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>**

Aunque se pueden usar formulaciones líquidas con los compuestos de la divulgación, las formulaciones liofilizadas pueden proporcionar una mayor longevidad de la estabilidad (véanse los Ejemplos 72-76 de los documentos US2011/13289533, US61/579,609 y PCT/IB2011/054874, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento). Por consiguiente, en algunos aspectos, la divulgación proporciona una formulación que comprende entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/ml de ABC o Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub> y entre aproximadamente 1 y 150 mM de ácido láctico o acetato de sodio, pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5; y al menos uno de los siguientes:

- 40 (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/ml de crioprotector;  
(ii) entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1,0 mg/ml de agente quelante;  
(iii) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/ml de antioxidante;

(iv) entre aproximadamente 0,02 y 2,0 mg/ml de tensioactivo.

En algunos aspectos, las formulaciones de la divulgación comprenden dos o más de (i) a (iv). En algunos aspectos, las formulaciones de la divulgación comprenden tres o más de (i) a (iv). En algunos aspectos, las formulaciones de la divulgación comprenden (i), (ii), (iii) y (iv).

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una formulación liofilizada que comprende:

- (i) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/ml de un ABC;
- (ii) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 150 mM de ácido láctico, a pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5; y
- (iii) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/ml de crioprotector;
- 10 (iv) entre aproximadamente 0,02 y 2,0 mg/ml de tensioactivo.

En algunos aspectos, la formulación liofilizada puede comprender además entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1,0 mg/ml de agente quelante. El agente quelante puede ser EDTA o DTPA, y puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 0,5 mg/ml. El agente quelante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mg/ml.

15 En algunos aspectos, la formulación liofilizada puede comprender además entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/ml de antioxidante. En algunos aspectos, el antioxidante puede ser L-metionina. El antioxidante puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 5 mg/ml. El antioxidante puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 mg/ml. El antioxidante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/ml.

20 En algunos aspectos, el ABC es un compuesto de la divulgación como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el ABC es la especie específica [SEQ ID NO: 56-L1]<sub>1</sub>-h38C2-[SEQ ID NO: 10-L1]<sub>1</sub>. En algunos aspectos, el ABC está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml. En algunos aspectos, el ABC está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml. En algunos aspectos, el ABC está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml. En algunos aspectos, el ABC está presente en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml.

30 En algunos aspectos, el ácido láctico está presente en una cantidad de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mM. En algunos aspectos, el ácido láctico está presente en una cantidad de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos, el ácido láctico está presente en una cantidad de aproximadamente 30 mM. El pH puede ser de entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 5,3. El pH puede ser de aproximadamente 4,8 ± 0,5. El pH puede ser de aproximadamente 4,8.

35 En algunos aspectos, el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en trehalosa dihidratada, sacarosa y manitol. El crioprotector puede ser trehalosa dihidratada. El crioprotector puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 120 mg/ml. El crioprotector puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 90 mg/ml.

40 En algunos aspectos, el tensioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste en polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámero. El tensioactivo puede ser polisorbato 20. En algunos aspectos, el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 mg/ml. En algunos aspectos, el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg/ml. En algunos aspectos, el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,2 mg/ml.

En algunos aspectos, la divulgación comprende una formulación adecuada para la liofilización que comprende lo siguiente:

- (i) aproximadamente 10 mg/ml de ABC;
- (ii) aproximadamente 30 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;
- 45 (iii) aproximadamente 90 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) aproximadamente 0,1 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

50 Lo anterior (todos los Ejemplos 66 y 67) también se refiere a formulaciones que comprenden Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>. Por consiguiente, en algunos aspectos la divulgación proporciona una formulación liofilizada que comprende:

- (i) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 150 mM de ácido láctico, a pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5; y
- 55 (iii) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/ml de crioprotector;

(iv) entre aproximadamente 0,02 y 2,0 mg/ml de tensioactivo.

La divulgación también proporciona formulaciones liofilizadas que se liofilizan después de la predilución de la formulación de partida en una cantidad deseada (por ejemplo, x2, x3) para obtener propiedades más deseables de potencia o torta liofilizada (por ejemplo, fluidez, porosidad) dando lugar a un tiempo de reconstitución superior (es decir, requiere menos tiempo para su reconstitución) y el procedimiento de preparación de dosis fácil para el paciente. La divulgación también proporciona formulaciones liofilizadas que se pueden reconstituir a una concentración mayor o menor de los ingredientes (por ejemplo, x0,33, x0,5, x2, x3, x4), en comparación con la composición de formulaciones líquidas previamente liofilizadas (pre-lío), añadiendo un volumen menor o mayor de diluyente (por ejemplo, x3, x2, x1, x0,5, x0,33, x0,25), respectivamente. Los ejemplos de diluyente son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de dextrosa (por ejemplo, 5 %) o una solución acuosa que contiene un agente farmacéutico, enzima, tensioactivo, azúcar, etc.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 mM de ácido láctico, a pH 4,8 ± 0,5;
- (iii) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) entre aproximadamente 0,01 y 0,1 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) entre aproximadamente 0,04 y aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) aproximadamente 10 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;
- (iii) aproximadamente 30 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,017 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) aproximadamente 0,033 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) aproximadamente 0,067 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- (i) entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) aproximadamente 15 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;
- (iii) aproximadamente 45 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,025 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) aproximadamente 0,05 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) aproximadamente 0,1 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) aproximadamente 30 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;
- (iii) aproximadamente 90 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) aproximadamente 0,1 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) aproximadamente 15 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;
- (iii) aproximadamente 45 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,025 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) aproximadamente 0,05 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) aproximadamente 0,1 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- (i) entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;
- (ii) aproximadamente 30 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;
- (iii) aproximadamente 90 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (vii) aproximadamente 0,1 mg/ml de L-metionina; y
- (viii) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- 5 (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;  
 (ii) aproximadamente de 30 a 60 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;  
 (iii) de aproximadamente 90 a 180 mg/ml de trehalosa deshidratada;  
 (iv) de aproximadamente 0,05 a 0,1 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;  
 (v) de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/ml de L-metionina; y  
 (vi) de aproximadamente 0,2 a 0,4 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- 10 (i) entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;  
 (ii) aproximadamente 30 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;  
 (iii) aproximadamente 90 mg/ml de trehalosa deshidratada;  
 (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;  
 (v) aproximadamente 0,1 mg/ml de L-metionina; y  
 (vi) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- 15 (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;  
 (ii) aproximadamente 30 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;  
 (iii) aproximadamente 90 mg/ml de trehalosa deshidratada;  
 (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;  
 (v) aproximadamente 0,1 mg/ml de L-metionina; y  
 (vi) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende la siguiente formulación:

- 25 (i) entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 mg/ml de Ab-[L1-FGF21ΔH-A129C]<sub>2</sub>;  
 (ii) aproximadamente 15 mM de ácido láctico, pH 4,8 ± 0,5;  
 (iii) aproximadamente 45 mg/ml de trehalosa deshidratada;  
 (iv) aproximadamente 0,025 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;  
 (v) aproximadamente 0,05 mg/ml de L-metionina; y  
 (vi) aproximadamente 0,1 mg/ml de polisorbato 20.

- 30 Cada una de las formulaciones anteriores también puede comprender elementos adicionales según lo descrito en el presente documento. Además, cada una de las formulaciones anteriores también puede ser adecuada para la posterior liofilización y reconstitución a un menor volumen. En algunos aspectos, las formulaciones se pueden concentrar en entre aproximadamente el doble y aproximadamente el triple.

#### **Ejemplo 68. Estabilidad de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]**

- 35 Se prepararon diversas formulaciones de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] mediante intercambio de tampón usando casetes de diálisis de corte de peso molecular de 10 kDa, y luego se filtraron en condiciones estériles (todos los experimentos usaron ABC-1). Las formulaciones se sometieron a una selección de condiciones de estrés (véase la Tabla 57). Las muestras se analizaron luego usando un ensayo de aspecto, UV (absorción ultravioleta) y cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Las muestras se analizaron en varios puntos de tiempo (Tabla 57) para evaluar la tendencia de la estabilidad.

#### Ensayo del aspecto

- 40 La turbidez aumenta con el almacenamiento a diversas temperaturas: tanto la formulación de ácido láctico 20 mM como la de histidina 20 mM, pH 5,8 (Formulaciones C y D) mostraron un aumento de la turbidez después de bien 1 semana de almacenamiento a 40 °C o de 2 semanas a 25 °C o de 2 semanas a 40 °C. Estos datos sugieren que las formulaciones C y D conducen a la inestabilidad de las formulaciones de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]. Al estresarse, tanto el acetato de sodio a pH 4,0 como el ácido glutámico a pH 4,0 no mostraron aumento de la turbidez independientemente de las condiciones de almacenamiento.

No se observó ningún cambio significativo en UV a lo largo del tiempo, indicando que incluso si se observó formación de partículas en algunas de las formulaciones enumeradas en la Tabla 57, la concentración neta de proteína no se vio afectada significativamente a lo largo del tiempo.

#### Formación de especies de alto peso molecular (HMW)

- 50 Se usó SE-HPLC para medir la formación de HMW para diversas formulaciones enumeradas en la Tabla 57. La SE-HPLC es capaz de separar de forma fiable las HMW, y es un importante ensayo indicador de la estabilidad para [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]. La HMW en el ensayo de SE-HPLC se define como la especie que se eluye antes del máximo de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]. Las formulaciones en histidina 20 mM, a pH 5,8, y fosfato 20 mM, a pH 8,0, mostraron una alta formación de HMW, tanto

inicial como también dependiente del tiempo. La tendencia de la agregación no lineal de las formulaciones de proteínas a lo largo del tiempo es conocida en la literatura. Las formulaciones en acetato de sodio 20 mM, a pH 4,0, y ácido glutámico 20 mM, a pH 4,0, mostraron la menor cantidad de HMW en comparación con otras formulaciones. Por lo tanto, las formulaciones en acetato de sodio 20 mM, a pH 4,0, y ácido glutámico, a pH 4,0, proporcionan una

5 estabilidad superior para la formación de HMW.  
% de especies (especies de alto peso molecular) medido mediante SE-HPLC. Las condiciones de SE-HPLC incluyen: columna de SEC Toso Biosep G3000SWXL 5 µm, 7,8 x 300 mm, fase móvil: fosfato de sodio 200 mM; tampón de cloruro de sodio 100 mM (pH 7,0), temperatura de la columna: 25 °C, caudal: 0,3 ml/min (isocrático), detección: absorbancia UV a 214 nm, tiempo de ejecución: 42 min.

#### 10 **Ejemplo 69. Detección en tampón de pH de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]**

Se investigó la estabilidad de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] en diversos tampones acuosos con el objetivo de encontrar un medio estabilizador apropiado que también se pudiera liofilizar (todos los experimentos usaron ABC-1). El Ejemplo 68 demostró el sorprendente resultado de que los compuestos de la divulgación eran más estables en acetato de sodio y ácido glutámico a pH 4,0. Sin embargo, el acetato de sodio se sublima y, por consiguiente, es difícil incorporarlo a un tampón liofilizado. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un tampón alternativo para los compuestos de la divulgación que proporcione una estabilidad óptima a largo plazo en una formulación liofilizada. La inestabilidad del engarce, así como cualquier recorte hidrolítico de los componentes proteicos genera especies de bajo peso molecular (LMW). Además, se pueden formar especies de alto peso molecular si los conjugados se agregan en la formulación ensayada. Las formulaciones se prepararon mediante intercambio de tampón en la formulación deseada con una concentración de proteína diana en el intervalo de 7 a 9 mg/ml. Las formulaciones se filtraron usando un filtro de 0,2 µm, se envasaron en viales de vidrio y se almacenaron a la temperatura deseada. En los puntos de tiempo indicados, se ensayaron las muestras.

#### Ensayo del aspecto

La turbidez aumenta con el almacenamiento a diversas temperaturas y condiciones: tanto la formulación de ácido cítrico 20 mM (todos los pH) como la de ácido succínico 20 mM (>pH 5,8) (Formulaciones A-C, K y L) mostraron un aumento de la turbidez después un almacenamiento de 2 semanas a 25 °C o de 2 semanas a 30 °C. Al estresarse, las muestras tanto de ácido glutámico como de ácido láctico mostraron una turbidez mínima independientemente de las condiciones de almacenamiento.

A excepción de las muestras de ácido cítrico, no se observó ningún cambio significativo en UV a lo largo del tiempo, indicando que incluso si se observó formación de partículas en algunas de las formulaciones enumeradas en la Tabla 57, la concentración neta de proteína no se vio afectada significativamente a lo largo del tiempo.

#### Medición de HMW mediante SE-HPLC y monitorización de LMW mediante SDS-PAGE

Se observó un efecto pronunciado del tampón y del pH sobre el estrés por temperatura durante 2 semanas. Los datos se presentan en la Tabla 59. En el punto de tiempo inicial, se observó una tendencia al aumento de HMW en las formulaciones de ácido cítrico y las formulaciones de pH superior (> 4,8). Las formulaciones de ácido glutámico, pH 4,2 y 4,5, mostraron un rendimiento relativamente superior para el % de HMW.

La tendencia de LMW fue directamente proporcional al pH. Tras el almacenamiento a 30 °C durante 1 semana, las formulaciones de pH más bajo mostraron un aumento pronunciado del % de LMW, presumiblemente debido a la fragmentación. Entre las formulaciones de ácido glutámico, se necesita un equilibrio del pH de las formulaciones para evitar una fragmentación excesiva debido a la inestabilidad del engarce y al recorte de proteínas. Por ejemplo, la formulación D, pH 4,2, en estado líquido, produce una fragmentación sustancial en comparación con otras formulaciones de ácido glutámico. La tendencia del % de LMW dependiente del pH sugiere que es adecuada una formulación de pH 4,5 (confirmada mediante SDS-PAGE, datos no mostrados).

**Tabla 59.** Datos de SEC de las formulaciones de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4].

ID	Formulación	% de HMW inicial	% de HMW tras 1 semana a 30 °C	% de HMW tras 2 semanas a 25 °C	% de HMW tras 2 semanas a 30 °C
A	Ácido cítrico 20 mM, pH 4,2	3,4	4,8	4,7	4,8
B	Ácido cítrico 20 mM, pH 4,5	3,5	5,5	5,4	5,6
C	Ácido cítrico 20 mM, pH 4,8	3,2	5,2	5,2	5,6

45

(Configuración)

ID	Formulación	% de HMW inicial	% de HMW tras 1 semana a 30 °C	% de HMW tras 2 semanas a 25 °C	% de HMW tras 2 semanas a 30 °C
D	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,2	2,5	2,2	2,2	2,0
E	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,5	2,6	2,4	2,3	2,3
F	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,8	2,7	2,7	2,6	2,7
G	Ácido láctico 20 mM, pH 4,2	2,6	3,1	2,6	2,8
H	Ácido láctico 20 mM, pH 4,5	2,6	3,0	2,5	2,6
I	Ácido succínico 20 mM, pH 4,2	2,6	2,6	2,3	2,6
J	Ácido succínico 20 mM, pH 4,5	2,7	3,1	2,8	3,2
K	Ácido succínico 20 mM, pH 4,8	2,9	3,6	3,3	3,9
L	Ácido succínico 20 mM, pH 5,3	3,1	4,0	3,8	4,4

Además, se usó también la formulación de ácido glutámico a pH 4,5 para evaluar si los conjugados son solubles en disolventes acuosos tamponados a alta concentración y para evaluar la estabilidad a alta concentración. Se observó un aumento relacionado con la concentración (A280) en el % de HMW tras el almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 60.

5

**Tabla 60.** Datos de alta concentración de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]

Muestra	A280	Turbidez NTU	% de HMW	% de HMW de 1 semana a 2-8 °C
Inicial	8,9	-	2,4	2,4
17 min	32,3	9,6	2,4	2,7
27 min	48,9	11,2	2,5	2,8
42 min	90	18,6	2,5	3,0

#### Ejemplo 70. Formulaciones liofilizadas de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]

Aunque se pueden usar formulaciones líquidas con los compuestos de la divulgación, las formulaciones liofilizadas pueden proporcionar una mayor longevidad de la estabilidad. Los Ejemplos 68 y 69 muestran que las formulaciones de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] solo con ácido glutámico, aunque superiores a otros tampones tales como la histidina, pueden no proporcionar una estabilidad adecuada para el uso deseado a largo plazo (todos los experimentos usaron ABC-1). La combinación de ácido glutámico con diversos tipos de estabilizadores tales como un azúcar o poliol, que actúan como crioprotector y lioprotector (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, manitol) y un tensioactivo para la estabilidad a la agitación (por ejemplo, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero) y un agente quelante (por ejemplo, EDTA, DTPA) proporciona una mejora sinérgica de la estabilidad. Por lo tanto, las combinaciones potencian claramente la estabilidad de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4].

10

15

20

Las formulaciones se prepararon mediante intercambio de tampón y la adición de excipiente con una concentración de proteína diana que varió entre las formulaciones (todos los experimentos usaron ABC-1). Las formulaciones preparadas se filtraron usando un filtro de 0,2 µm y se envasaron en viales de vidrio. Para preparar formulaciones liofilizadas, se liofilizaron los viales, se detuvieron y se taparon. En los puntos de tiempo indicados, se ensayaron las muestras mediante diversos procedimientos analíticos incluyendo la SEC, iCE y cGE reducida. Además, las formulaciones líquidas también se evaluaron durante 4 semanas para evaluar la tendencia de la estabilidad de las

formulaciones líquidas. Se analizó el contenido en agua de las formulaciones liofilizadas tras la liofilización, y todos fueron inferiores al 0,5 %.

Las formulaciones liofilizadas se almacenaron bajo diversos estreses térmicos, y la Tabla 61 muestra los datos de SEC, iCE y cGE reducida (electroforesis en gel capilar) en los puntos de tiempo indicados. cGE produce una estimación semicuantitativa de los fragmentos de proteínas. Las formulaciones liofilizadas mostraron una mejor estabilidad en comparación con sus homólogos líquidos en todos los frentes (% de HMW,  $\Delta\%$  de las especies ácidas y  $\Delta\%$  de Frag). Las formulaciones liofilizadas de ácido glutámico en presencia de excipientes estabilizantes (en presencia de un crioprotector/lioprotector) mostraron una buena estabilidad. Por lo tanto, se concluye que las formulaciones de ácido glutámico liofilizadas son apropiadas para ensayar la estabilidad del almacenamiento a más largo plazo. Finalmente, los agentes quelantes metálicos (por ejemplo, EDTA, DTPA) se espera que sean beneficiosos para lograr la estabilidad.

Las muestras de formulación liofilizadas también se ensayaron en cuanto a la bioactividad relativa. Se midió la bioactividad y se expresó como el % relativo con respecto al de un material de referencia usando tanto un ensayo de ELISA de unión no competitiva (FGF21) como un ensayo de potencia de Exendina GLP-1 (péptido Ex4). Los datos de bioactividad se presentan en la Tabla 62. Estos datos proporcionan más confianza en la estabilidad e integridad funcional proporcionada por los componentes de la formulación liofilizada.

#### **Ejemplo 71. Estabilidad de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] frente a la agitación**

Se preparó la formulación de ácido glutámico/trehalosa/EDTA/PS80 mediante intercambio de tampón y adición de excipiente con una concentración de proteína diana en el intervalo de 15 mg/ml. Las formulaciones preparadas se filtraron usando un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y se envasaron en viales de vidrio. La agitación se aplicó usando un agitador orbital a velocidad de 300 rpm. En los puntos de tiempo indicados, se ensayaron las muestras. Los resultados de la Tabla 63 demuestran que la presencia de polisorbato 80 ayuda a prevenir la inestabilidad inducida por la agitación (todos los experimentos usaron ABC-1).

**Tabla 63.** Datos de estabilidad de las formulaciones contra el estrés por agitación

Formulación	Aspecto inicial	Aspecto tras 24 h de agitación	Variación del % de HMW tras 24 h de agitación
Ácido glutámico 20 mM, 85 mg/ml de trehalosa dihidratada, pH 4,5	Claro	Líquido lechoso y precipitación	0,1
Ácido glutámico 20 mM, 85 mg/ml de trehalosa dihidratada, 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 4,5	Claro	Claro con unas cuantas partículas	0,3

Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona una formulación que comprende entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/ml de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] y entre aproximadamente 1 y 150 mM de ácido glutámico, pH entre aproximadamente 4.0 y aproximadamente 5,5; y al menos uno de los siguientes:

- (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/ml de crioprotector;
- (ii) entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1,0 mg/ml de agente quelante;
- (iii) entre aproximadamente 0,02 y 2,0 mg/ml de tensioactivo.

En algunos aspectos, las formulaciones de la divulgación comprenden uno o más de (i) a (iv). En algunos aspectos, las formulaciones de la divulgación comprenden dos o más de (i) a (iv). En algunos aspectos, las formulaciones de la divulgación comprenden (i), (ii) e (iii).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una formulación liofilizada que comprende:

- (i) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/ml de conjugado de FGF21;
- (ii) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 150 mM de ácido glutámico, a pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0; y
- (iii) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/ml de crioprotector;
- (iv) entre aproximadamente 0,02 y 2,0 mg/ml de tensioactivo.

En algunos aspectos, la formulación liofilizada puede comprender además entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1,0 mg/ml de agente quelante. El agente quelante puede ser EDTA o DTPA, y puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 0,5 mg/ml. El agente quelante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mg/ml.

En algunos aspectos, el [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] es un compuesto de la divulgación como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el conjugado de FGF21-Ex4 es

[FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4]. En algunos aspectos el conjugado de FGF21-Ex4 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml. En algunos aspectos, el conjugado de FGF21-Ex4 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 90 mg/ml. El conjugado de FGF21-Ex4 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml. El conjugado de FGF21 está presente en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml.

En algunos aspectos, el ácido glutámico está presente en una cantidad de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mM. En algunos aspectos, el ácido glutámico está presente en una cantidad de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos, el ácido glutámico está presente en una cantidad de aproximadamente 20 mM. El pH puede ser de entre aproximadamente 4,2 y aproximadamente 5,3. El pH puede ser de aproximadamente  $4,5 \pm 0,5$ . El pH puede ser de aproximadamente 4,5.

En algunos aspectos, el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en trehalosa dihidratada, sacarosa y manitol. El crioprotector puede ser trehalosa dihidratada. El crioprotector puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 120 mg/ml. El crioprotector puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 85 mg/ml.

En algunos aspectos, el tensioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste en polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámero. El tensioactivo puede ser polisorbato 20. En algunos aspectos, el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 mg/ml. En algunos aspectos, el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mg/ml. En algunos aspectos, el tensioactivo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,2 mg/ml.

En algunos aspectos, la divulgación comprende una formulación adecuada para la liofilización que comprende lo siguiente:

- (i) entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 mg/ml de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4];
- (ii) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 mM de ácido glutámico, pH  $4,5 \pm 0,5$ ;
- (iii) entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,0 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,3 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la divulgación comprende una formulación adecuada para la liofilización que comprende lo siguiente:

- (i) aproximadamente 30 mg/ml de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4];
- (ii) aproximadamente 20 mM de ácido glutámico, pH  $4,5 \pm 0,5$ ;
- (iii) aproximadamente 85 mg/ml de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico dihidratado;
- (v) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

En algunos aspectos, la invención comprende una formulación adecuada para la liofilización que comprende:

- (i) aproximadamente 30 mg/ml de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4];
- (ii) aproximadamente 20 mM de ácido glutámico, pH  $4,5 \pm 0,5$ ;
- (iii) aproximadamente 8,5 % de trehalosa deshidratada;
- (iv) aproximadamente 0,005 % de EDTA disódico dihidratado; y
- (v) aproximadamente 0,02 % de polisorbato 80.

#### **Ejemplo 72. Procedimiento de enriquecimiento en anticuerpo**

En algunas situaciones en las que h38C2 se incubaba con un péptido o una proteína para la conjugación, la reacción no se completa, y queda algún anticuerpo sin reaccionar. Un ensayo de HIC analítico (procedimiento descrito más adelante) para investigar el fenómeno separó 2 máximos de elución temprana (normalmente, aproximadamente del 0,6 al 1,8 % de proteína y del 16,9 al 19,4 % de proteína respectivamente) y un máximo principal (normalmente, del aproximadamente 75,2 al 79,5 % de proteína, aunque se observaron varianzas de hasta el 73,5 % y el 83,3 % de proteína). La proteína del máximo principal era completamente reactiva mientras que las del máximo 1 y 2 no reaccionaron. Por lo tanto, era necesario desarrollar un procedimiento mejor para la purificación del anticuerpo h38C2.

#### Procedimiento de HIC

El presente apartado describe el uso de la cromatografía de HIC para evaluar el porcentaje de diferentes isoformas presentes en el anticuerpo h38C2 de las muestras en proceso y de sustancias farmacológicas. Se cree que estas especies son los componentes del material de partida que conjugarán cero (máximo 1), uno (máximo 2) o dos péptidos (máximo principal) en la posición Lys-99 (uno por cada uno de los dos Fab por h38C2). La separación y la

elución se producen en un gradiente de reducción de sal con un aumento simultáneo en el disolvente orgánico (alcohol isopropílico) sobre el gradiente del presente procedimiento, lo que aumenta la afinidad de las proteínas más hidrófobas para la fase móvil, como en la cromatografía de fase inversa. Las áreas de los máximos se integran para determinar la abundancia relativa de cada isoforma.

- 5 Se desarrolló un procedimiento de HIC analítico con una columna de gel TSK Fenil-5PW (7,5 mm x 75 mm, 10 µm, TOSOH) para separar el máximo principal del mAb no reactivo (P1, P2) y reactivo del anticuerpo IgG<sub>1</sub> h38C2. Las fases móviles son A: sulfato de amonio 0,75 M, fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0; y B: fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0, IPA al 10 %. La columna se procesa a 0,65 ml/minuto a 35 °C con la absorbancia medida a 214 nm. Se prepara una muestra de 100 µg para inyección diluyendo la muestra o el patrón a 1 mg/ml con diluyente (fase móvil A: agua, 50:50).

**Tabla 64.** Procedimiento de HIC analítico. Las fases móviles son A: sulfato de amonio 0,75 M, fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0; y B: fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0, IPA al 10 %.

Tiempo (minutos)	% de B	Flujo (ml/min)
0,0	0,0	0,65
6,8	50,0	0,65
42,8	81,0	0,65
43,0	95,0	0,65
48,0	95,0	0,65
48,1	0,0	0,65
53,0	0,0	0,65

**Ejemplo 73. Correlación de los datos de iCE, Met-Ox, con el aumento de h38C2 no reactivo**

- 15 Se realizó un estudio de retención a 25 °C con caldo de cultivo clarificado de h38C2. Las muestras se congelaron en los tiempos designados. Las muestras se descongelaron y se purificaron mediante columnas de giro de Proteína A y se sometieron a ensayos. Hubo una correlación entre el aumento de las especies ácidas y oxidadas y el aumento de la forma no reactiva del mAb (Tabla 65). Puede haber otros factores implicados en la fabricación de h38C2 no reactivo, pero las especies ácidas y la oxidación de las fracciones de azufre aparecen ser dos de los factores implicados.

20 **Tabla 65.** Resultados del estudio de retención del caldo para los niveles de iCE, Met-Ox y h38C2 no reactivo

Horas de incubación a 25 °C	HIC no reactivo 2000	Especies ácidas	Met-Ox
0	16,48	31,1	3,2
3	16,54	31,7	3,2
24	22,10	36,1	6,8
27	22,09	37,3	5,9
48	26,48	40,9	8
56	28,40	43,3	9,2
72,5	32,22	45,7	10,4
95	34,97	49,8	12,6
140	37,71	51,6	13,8

**Ejemplo 74. Selección de la columna**

- 25 Inicialmente, se usó una columna de gel TSK Fenil-5PW (tamaño de partícula de 10 µm) para desarrollar un ensayo de HIC para separar el mAb conjugable de la forma no reactiva. Se aumentó a escala una columna de gel TSK Fenil-5PW (tamaño de partícula de 20 µm) para producir h38C2 completamente reactivo. La capacidad de la columna era de 4-5 g/l y funcionaba a alta presión. El siguiente procedimiento se había usado para fabricar material para estudios de conjugación. Se equilibró la columna con NaCl 0,5 a 1 M en fosfato de sodio 50 mM, pH 7, y se cargó a 4-5 g/l de resina. La columna no se lavó y se sometió a un tampón de elución que comprendía fosfato de sodio 50 mM, IPA al 20 %, pH 7. Se desarrolló un gradiente lineal del 42 al 60 % de tampón de elución en fosfato de sodio 50 mM, pH 7, sobre 4,8 volúmenes de columna (VC), luego se aumentó la concentración hasta el 100 % del

tampón de elución respectivo hasta que se recogió el material y la absorbancia volvió a casi los niveles basales. Aunque este procedimiento era adecuado para los suministros a escala de laboratorio, se requería un procedimiento de mayor rendimiento con una mayor capacidad de carga. Se consideró o ensayó una variedad de resinas HIC (Tabla 66).

5 **Tabla 66.** Resinas de HIC usadas para el ensayo analítico y la purificación de h38C2. ND = No disponible.

Resina	Aplicación	Tamaño de partícula	Tamaño de poro	Capacidad (g/l)
de gel TSK Fenil-5PW	analítica	10 µM	1000 Å	4
de gel TSK Fenil-5PW	analítica	20 µM	1000 Å	-4
Fenil 650 S	escalable	35 µM	750 Å	18
PPG 600 M	escalable	65 µM	750 Å	~15-20
Fenil 600 M	escalable	65 µM	750 Å	~50
Fenil Sefarosa HP	escalable	34 µM	ND	ND
Butil 600 M	escalable	65 µM	750 Å	20
Butil Sefarosa HP	escalable	34 µM	ND	ND

10 Para la cromatografía de Fenil-5PW, Fenil 600 M, Butil 600 M y Fenil 650 S, el tampón de equilibrado fue fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0. La carga se ajustó a una composición similar, que tenía el mismo pH y la misma conductividad. Las cargas variaron de 4 a 50 g/l de resina en Fenil 600 M (5-10 g/l y 20 g/l), gel TSK Fenil 5 PW y Butil 600 M. Las cargas en las columnas de Fenil 650 S fueron de 15 a 22 g de mAb/l de resina. Las columnas se equilibraron con 5 VC de tampón de equilibrado (Tabla 67), después se cargó la columna y se lavó con 1-2 VC de tampón de equilibrado, después se lavó con de 0 a 2 VC de tampón base. El mAb se eluyó con un gradiente en etapas de 1 a 2 VC del 40 al 43 % de tampón de elución que consistía en fosfato de sodio 20 mM, IPA al 20 %, pH 7,0. A continuación, un gradiente lineal de 5-10 VC con 40-63 % de tampón de elución. Finalmente, se sometió la columna a 3-6 VC de tampón de elución para asegurar la elución del mAb restante. La proteína se eluyó en el transcurso de 3-15 VC, dependiendo de la rapidez con que se desarrollaron los gradientes. Los rendimientos fueron del 0 al 43 % para las resinas de Fenil 5 PW, Fenil 600 M y Butil 600 M con producto a concentraciones de 0,5 a 2 mg/ml. El balance de masa normalmente fue de ~90-100 %. Los resultados para el Fenil 650 S se describen a continuación.

15 **Tabla 67.** Procedimiento de HIC usado para la exploración inicial de la columna. Tampón B = fosfato de sodio 20 mM, pH 7 con IPA al 20 %.

Etapas	% de B	VC	Solución
Equilibrado		5	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7 (Tampón A)
Carga		ND	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7
Lavado 1		2	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7
Lavado 2		0-2	Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7
Elución 1	40-43	1-2	Fosfato de sodio 20 mM, IPA al 20 %, pH 7
Elución 2	40-60	5-10	Fosfato de sodio 20 mM, IPA al 20 %, pH 7
Elución 3	100	5	Fosfato de sodio 20 mM, IPA al 20 %, pH 7

25 Se ensayó la resina de Fenil 5 PW (20 µM) en una columna de 4 ml, pero no fue eficaz para enriquecer el máximo principal, mostrando solamente un 90 % del h38C2 reactivo. Además, la resina de Fenil 5 PW no era escalable, ya que funcionaba a alta presión con el tamaño de perla de 20 µm y tenía una capacidad baja, ~ 4-5 g/l de resina. Cuando la columna de Butil 600 M se cargó a 23 g/l, no proporcionó ningún enriquecimiento. La columna de Fenil 600 M cargada a 20 g/l mostró un buen enriquecimiento del máximo principal al 91-92 %, pero el rendimiento global del aproximadamente 43 % fue menor que el mínimo preferido del aproximadamente 50 % de rendimiento y aproximadamente 95 % de máximo principal. Cuando la misma columna estaba cargada a 5 g/l de resina, la fracción de máximo tenía menos máximo principal que el material de carga, demostrando una relación entre una mayor carga de la columna y una mayor pureza del producto. Después se ensayó Fenil 650 S con las perlas de 35 µm. Las perlas más pequeñas proporcionan más superficie y sitios de unión, lo que proporciona una mejor resolución. Mediante el ajuste de las concentraciones de sal y la duración de las etapas de lavado, se eliminó la mayor parte de la forma inactiva del anticuerpo, mientras que más del h38C2 totalmente reactivo (FR) permaneció unido a la resina. Se

obtuvieron rendimientos de hasta el 57-58 % y combinaciones de productos que contenían 92-95 % de máximo principal.

**Ejemplo 75. Desarrollo de etapas de reducción de sal, de meseta y de lavado con tampón**

5 Se evaluaron varios parámetros durante el desarrollo de tres etapas de lavado para aumentar al máximo el rendimiento y la pureza del producto. Durante la etapa de gradiente lineal de reducción de sal, se ensayaron la pendiente, duración y la concentración final del lavado. Después de esto, fue necesario establecer la concentración óptima y la duración del lavado de la meseta, y la duración óptima del lavado con tampón. Los resultados de varias series experimentales importantes se muestran en la Tabla 68, comparando la Tabla 69 los datos del ensayo de HIC de dos estas series experimentales.

10 **Tabla 68.** Definición del protocolo de lavado de reducción de sal para la columna de Fenil 650 S. ND =- no disponible. \*Este no fue un lavado de tampón base, también contenía NaCl como se enumera. \*\*Esta serie usó fosfato de sodio 20 mM, 1,6-hexanodiol, pH 7,0, el resto se eluyó con IPA al 20 % IPA en tampón base

Serie	Gradiente salino (NaCl)	VC	Meseta	VC	Tampón	VC	Etapas	VC	% de rendimiento	% de rendimiento del máximo principal
140	1 M-0 M	10			0 M	2	-	-	46	61
143	0,75 M-0 M	8			0 M	5	-	-	11	15
152	1 M-0,3 M	7	0,30 M	3	*0,10 M	3	-	-	53	71
155	1 M-0,35 M	3	0,35 M	3	-	-	-	-	45	57
159	1 M-0,44 M	7	0,44 M	4	*0,3 M	4	0 M	2	50	ND
167	1 M-0,3 M	7	0,30 M	8	0 M	2	-	-	47	65
171	1 M-0,33 M	7	0,33 M	6	0 M	2	-	-	57	75
**177	1 M-0,30 M	7	0,30 M	2	0 M	4	-	-	73	96
185	1 M-0,33 M	7	0,33 M	6	0 M	3	-	-	58	76
Escala de 9,5 l	1 M-0,33 M	7	0,33 M	6	0 M	3			72	93
GLP de 33 l	1 M-0,33 M	7	0,33 M	6	0 M	2			75	94

15 **Tabla 69.** Datos del ensayo de HIC Los máximos 1 y 2 no son reactivos/son parcialmente activos. El máximo principal es completamente reactivo en las reacciones de conjugación \*El patrón de referencia se ha medido al 73,5-83,3 % en el ensayo de HIC en diferentes días.

Serie - Fracción	Máximo 1	Máximo 2	Máximo principal
Patrón de referencia	1,2	19,4	*75,6
140 - Fracción 6	3	86,8	10,2
140 - Fracción 10	0	11,1	88,9
140 - Fracción 12	0	11,2	88,8
140 - Fracción 22	0	9,7	90,3
Patrón de referencia	1,8	19,2	75,2
152 - Fracción 10	2,3	66,2	31,5
152 - Fracción 14	0	9,5	90,5
152 - Fracción 20	0	5,9	94,1
152 - Fracción 22	0	2,9	97,1
152 - Fracción 24	0	8,1	91,9
Patrón de referencia	0,6	17,9	77,1

(Continuación)

Serie - Fracción	Máximo 1	Máximo 2	Máximo principal
Combinación de productos a escala de 9,5 l	ND	7,2	90,7
Patrón de referencia	1,7	16,9	79,5
Escala de 33 l, Ciclo A, GLP	0,16	9,73	88,7

Fenil 650 S 140 (Tabla 68) mostró una cantidad significativa de proteína tanto en el lavado como en la fase de elución de la serie. En estas series iniciales, se usó un gradiente lineal de NaCl de 1 M a 0 M sobre 10 VC. El gradiente fue seguido por un lavado con tampón base de 2 VC de fosfato de sodio 20 mM. Esta fue la primera serie que demostró el potencial para eliminar el componente no reactivo y obtenerse rendimientos más aceptables de h38C2 completamente reactivo. Esto se muestra con mayor detalle en la Tabla 69, donde la fracción 6 (lavado) contiene el 86,2 % de h38C2 no reactivo pero solo el 10,2 % de máximo principal. Durante la elución con IPA al 20 %, 3 fracciones contenían mAb reactivo al 90 % y la cantidad de mAb no reactivo se redujo al ~10 %.

La serie 143 de Fenil 650 S (Tabla 68) usó un gradiente lineal de NaCl de 0,75 M a 0 M sobre 8 VC. El gradiente fue seguido de un lavado de tampón base de 5 VC que tenía mucha más proteína en la fase de lavado que la serie anterior, con un rendimiento concomitante bajo del 11 %. Basándose en el rendimiento sorprendentemente bajo obtenido de esta serie, se postuló que la resina se puede beneficiar del equilibrado de la sal para proporcionar una unión más estrecha a las proteínas. También se postuló que debía establecerse un equilibrio entre el uso de un volumen suficiente de tampón base para eliminar la sal y el mAb no reactivo, al tiempo que se reducía al mínimo la pérdida del producto.

Muchas de las series posteriores usaron 2-3 volúmenes de tampón base en lugar de 5 VC. La serie 152 de Fenil 650 S usó un gradiente lineal de NaCl de 1 M a 0,30 M sobre 7 VC. El gradiente fue seguido por un lavado de meseta de 3 VC con NaCl 0,30 M en tampón base y luego un lavado de meseta de 3 VC con NaCl 0,10 M en tampón base que contenía aún menos proteína en el lavado y un aumento concomitante en el máximo de elución, dando un rendimiento del 53 % (Tabla 68). El inicio de una meseta en la etapa de reducción de sal en NaCl 300 mM fue un descubrimiento fundamental que finalmente condujo a las mejoras requeridas. Dos fracciones de elución de la serie 152 contenían 94 y 97 % de máximo principal (Tabla 69), demostrando que el procedimiento funcionaba para conseguir el objetivo de un rendimiento > 50 % y un máximo principal > 90 % en la combinación de producto de Fenil 650 S. La fracción de lavado 10 tuvo un máximo principal del 31,5 %, lo que demostró que un lavado en meseta con más de NaCl 0,30 M podría retener más producto en la columna.

La serie 155 de Fenil 650 S usó un gradiente lineal de NaCl de 1 M a 0,35 M sobre 3 VC (Tabla 68). El gradiente fue seguido por un lavado de meseta de 3 VC con NaCl 0,35 M en tampón base que proporcionó un rendimiento del 43 %, más bajo el de la serie anterior. Un factor fue que se aplicó una carga doble, 45 g/l a la columna. La mayor parte de la proteína salió de la columna en el flujo a través y el lavado, haciendo efectivamente la carga 16 g/l. La pendiente más pronunciada del gradiente de reducción de sal, que separó por lavado más del máximo principal, también redujo el rendimiento.

La serie 159 de Fenil 650 S usó un gradiente lineal de NaCl de 1 M a 0,44 M sobre 7 VC (Tabla 68). El gradiente fue seguido por un lavado de meseta de 4 VC con NaCl 0,44 M en tampón base, seguido por un lavado de meseta de 4 VC con NaCl 0,3 M en tampón base y un lavado de meseta a 2 VC con tampón base que administró un rendimiento del 50 %, que fue inferior al de la serie anterior. Sin embargo, la optimización del lavado del tampón base fue otro descubrimiento clave que ayudó a aumentar al máximo tanto la pureza como los rendimientos.

La serie 167 de Fenil 650 S usó un gradiente lineal de NaCl de 1 M a 0,3 M sobre 7 VC (Tabla 68). El gradiente fue seguido por un lavado de meseta de 8 VC con NaCl 0,3 M en tampón base, seguido por un lavado de meseta de 2 VC con tampón base. El rendimiento fue del 51 %. Se postuló que el rendimiento podría haber sido mayor si la concentración del lavado de NaCl 0,3 M hubiera sido superior.

La serie 171 de Fenil 650 S usó un gradiente lineal de NaCl de 1 M a 0,33 M sobre 7 VC (Tabla 68). El gradiente fue seguido por un lavado de meseta de 6 VC con NaCl 0,33 M en tampón base, seguido por un lavado de meseta de 2 VC con tampón base que proporcionó un rendimiento del 57 %.

Se realizó una serie de desarrollo del procedimiento final para ajustar las condiciones con el fin de eliminar el NaCl durante el lavado con fosfato 20 mM. Las etapas de lavado se establecieron en el transcurso de varios experimentos, se completaron los perfeccionamientos finales en las etapas de lavado como se muestra en las series 171 y 185 (Tabla 68) que proporcionaron la elución de la mayor parte del mAb no reactivo. Una vez cargada la columna y lavada con 1 VC de tampón de NaCl 1 M, un gradiente lineal de NaCl 1-0,33 M sobre 7 VC eliminó de manera eficaz el mAb no reactivo. Un lavado en meseta de NaCl 0,33 M para 5-6 VC permitió que el material no reactivo se lavara a fondo de la columna. Un lavado de 2-3 VC con tampón base eliminó la sal restante para acondicionar la columna para la elución, y se estableció como el procedimiento de elección. Posteriormente, para las plantas piloto a escala de 33 l, el lavado de NaCl 0,33 M se redujo a 5 VC, y el fosfato de sodio 20 mM se redujo a 2

VC sin perder la calidad del producto.

El tampón de elución se cambió de IPA al 14 % a 1,6-hexanodiol al 15 %. El objetivo fue el de eliminar el potencial de inflamabilidad del IPA a gran escala. La concentración de IPA en el tampón de elución se estableció en el 14 %, ya que se recogió un alto rendimiento del h38C2 completamente reactivo a escala de laboratorio, normalmente en 1,5 VC. Se ensayó el tampón de elución de hexanodiol a pequeña escala en la serie 177 (Tabla 68). La combinación de productos se recogió en 1,5 VC, con un rendimiento de 73 % y contenía 88 % del máximo principal. Las fracciones individuales se recogieron para las series de columnas de escala de laboratorio. Las fracciones combinadas se recogieron, en general, a 200 mUA en el máximo ascendente, y entre 200 y 400 mUA en el máximo descendente. Después de revisar la calidad del producto de los soportes, eran suficientemente altos en % del máximo principal, de modo que la estrategia de combinación para las series de la columna de 33 l fue la de recoger el máximo del producto de 100 UA a 100 mUA.

#### Ejemplo 76. Ensayo de elución acuosa

Otra consideración fue encontrar una columna que se pudiera eluir sin componentes orgánicos en el tampón de elución, sin dejar de enriquecer en h38C2 completamente reactivo. Se seleccionaron columnas más hidrófilas para esta detección, de modo que el mAb no se uniera tan firmemente a la resina. Con la proteína menos estrechamente unida, el potencial para eluir el mAb con un tampón acuoso era mayor. Para que fuera una metodología eficaz, el procedimiento todavía necesitaba separar el h38C2 completamente reactivo del no reactivo. Se ensayaron las columnas PPG 600 M, Butil HP y Fenil HP usando metodología muy similar a los procedimientos desarrollados con la columna de Fenil 650 S descrita en el presente documento (Tabla 70). Para la cromatografía de PPG 600 M, Butil HP y Fenil HP (escala de 4 ml), el tampón de equilibrado fue fosfato de sodio 20 mM, NaCl 2,5 M, pH 7,0. La carga se ajustó a una composición similar, que tenía el mismo pH y la misma conductividad. A la carga de 18-19 g de mAb/l de resina, le siguió un lavado de 5 VC con tampón de equilibrado. A continuación, se realizó un lavado con reducción de sal de NaCl 2,5 M a 0 M sobre 13-15 VC, seguido de 3 VC de tampón de fosfato 20 mM. Como alternativa, una serie de Butilo tuvo un lavado de reducción de sal de NaCl 1 M a 0,3 M, seguido de 3 VC de tampón fosfato 20 mM. Las columnas se separaron con 5 VC de fosfato de sodio 20 mM, IPA al 20 %, pH 7,0.

**Tabla 70.** Condiciones operativas de las columnas de PPG 600M, Butil HP y Fenil HP. A = fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7. B = fosfato de sodio 20 mM, pH 7.

Etapa	Caudal lineal	Volumen	Solución
Preequilibrado	200 cm/h	5 VC	A: NaCl 2,5 M, Fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0
Carga	120 cm/h	15 ml	5 g/l de h38C2 en NaCl 2,5 M, Fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0
Lavado	100 cm/h	5 VC	A: NaCl 2,5 M, Fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0
Elución	100 cm/h	B al 0-100 % sobre 143-15 VC, manteniendo B al 100 % para 3 VC	B: Fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0
Separación	200 cm/h	5 VC	IPA al 20 % v/v en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0
Limpieza	200 cm/h	3 VC	NaOH 0,5 N
Almacenamiento	200 cm/h	3 VC	NaOH 0,1 N

La columna PPG 600 M estaba ligeramente sobrecargada a 18 g/l, con aproximadamente un 5 % del mAb que fluía durante el lavado con alto nivel de sal. El mAb se eluyó a medida que la conductividad disminuyó. Sin embargo, hubo un gran máximo amplio sin definición que indica una separación de las especies reactivas/no reactivas. La columna de Butil HP se mantuvo la más prometedora; de hecho, una cantidad sustancial de mAb se eluyó durante la elución de sal a menor nivel. Sin embargo, los resultados del ensayo de HIC mostraron que la combinación contenía el 43 % de máximo 2 y el 53 % de máximo principal. El h38C2 no se eluyó en la fase acuosa durante el lavado con reducción de sal de la columna Fenil HP. El h38C2 enriquecido solo se eluyó con un gradiente de IPA. Dado que el mAb solo se podía eluir con IPA, la columna de Fenil HP no era adecuada para un procedimiento de elución acuosa. Por lo tanto, ninguna de estas columnas fue capaz de proporcionar una estrategia de purificación alternativa o una razón para cambiar de la resina de Fenil 650 S.

#### Ejemplo 77. Procedimiento de purificación de Fenil 650S refinada

Se descongeló h38C2 a 20 g/l de mAb y se diluyó 1:1 con fosfato de sodio 40 mM, NaCl 2 M, pH 7, se filtró a través de un filtro de 0,45/0,2 µm y se cargó a 16-18 g/l en una columna de HIC de Fenil 650 S (TOSOH), que se equilibró con fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0 (Tabla 71). La columna se lavó con 1 VC de tampón de equilibrado y

5 luego se desarrolló un gradiente de 7 VC de NaCl 1 a 0,33 M en fosfato de sodio 20 mM, pH 7. El gradiente se mantuvo a NaCl 0,33 M en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 para 5 VC, y fue seguido por un lavado de 2 VC con el tampón base, fosfato de sodio 20 mM, pH 7. Las formas menos reactivas de h38C2 se eluyeron durante la aplicación de estas etapas de lavado. Para la fase de elución, se desarrolló un gradiente del 0 al 15 % de 1,6 hexanodiol sobre 1 VC y se mantuvo al 15 % hasta que se completó la elución. El producto de h38C2 completamente reactivo se recogió en forma de una combinación de aproximadamente 1-2 VC.

10 **Tabla 71.** El procedimiento de columna de HIC de Fenil 650 S \*La dirección del flujo es de abajo a arriba. Todas las demás etapas tienen una dirección de flujo de arriba abajo. La velocidad de alimentación fue limitada por una presión máxima del sistema de 300 kPa. La unión de proteína en estas condiciones de carga fue del 100 %. Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (18-22 °C). B: fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0.

Etapa	Caudal lineal (cm/h)	VC	% de B	Solución
Lavado abundante	60	3	-	Milli -Q
Equilibrado	80	5	-	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, NaCl 1 M
Carga	80	ND	-	~10 g/l en fosfato de sodio 20 mM a pH 7, NaCl 1 M
Lavado	80	1	-	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, NaCl 1 M
Gradiente salino	80	7	0-67	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, NaCl 1 M-0,33 M
Meseta salina	80	5	67	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, NaCl 0,33 M
Lavado con tampón	80	2	100	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7
Elución	60	1	0-75	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, 1,6-hexanodiol al 20 %
Elución	60	5	75	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, 1,6-hexanodiol al 20 %
Lavado abundante	60	3	-	H2O purificada (WFI: agua para inyección)
*Limpieza	60	3	-	Hidróxido de sodio 0,5 M
Lavado abundante	60	3	-	WFI
Almacenamiento	60	2	-	Fosfato de sodio 20 mM a pH 7, etanol al 20 %

15 A continuación, se sometió la combinación de producto de Fenil 650 S que contenía h38C2 completamente reactivo al 90-95 % a diafiltración en histidina 10 mM (8 diavolumenes) con una membrana Hydrosart de 30 kD (3 m<sup>2</sup> por Sartorius) a 130-280 g de mAb/m<sup>2</sup> de membrana. El material retenido de UF se ajustó a 25 g/l con la cantidad apropiada de enjuague UF de tampón UF. Se introdujo una solución madre que contenía una cantidad de 4-5 veces de los excipientes restantes en la solución de proteína diafiltrada con el fin de establecer la formulación intermedia final de la sustancia farmacológica. La formulación final fue: histidina 10 mM, glicina 10 mM, sacarosa al 2 %, pH 6,5 ± 0,3. La solución de compuesto intermedio de DS formulada se hizo pasar a través de un filtro final de 0,45/0,2 µm y se almacenó en bolsas de Stedium de tamaño apropiado o el equivalente hasta seis meses a 2-8 °C. Para un almacenamiento a largo plazo, se congeló el producto intermedio de DS a -70 °C hasta -80 ForC en botellas de PET de 1 l o 4 l.

20 Las Tablas 72 y 73 muestran los rendimientos de las series del procedimiento de grado GLP y GMP usando el procedimiento perfeccionado de Fenil 650S

**Tabla 72.** Tabla de purificación de h38C2 totalmente reactivo (FR) a escala de 1,1 kg según la norma GLP (buenas prácticas de laboratorio) \*Se produjo un error de muestreo y no se obtuvo la combinación de producto real. La muestra analizada tenía una concentración de proteína de 2 g/l en lugar de 11,4 g/l

Etapa	[mAb] (g/l)	Volumen (l)	Masa (g)	Rendimiento del mAb total (%)	Máximo principal, h38C2 (%)	Rendimiento de máximo principal de h38C2 (%)
Ciclo A de combinación de P 650 S	11,08	37,25	413	76	88,7	92
Ciclo B de combinación de P 650 S	11,4	36	411	76	*77	91
Combinación de UF 1	25,4	15,9	403	98	-	-
Combinación de UF 2	25	16,4	411	100	-	-
h38C2 FR (Formulado)	19,9	40	796	98	-	-

- 5 **Tabla 73.** Tabla de purificación de h38C2 totalmente reactivo (FR) a escala de 1,2 kg según la norma GMP (buenas prácticas de fabricación). \*Se produjo un error de programa que omitió la reducción de sal y la etapa de lavado en meseta, desplazando parte de la proteína de la columna. Se repitió toda la etapa de lavado. El máximo principal de la fracción fue del 94,3 %, ligeramente superior al 91,3 % del ciclo B. El rendimiento estaba dentro del intervalo de 60-75 %.

Etapa	[mAb] (g/l)	Volumen (l)	Masa (g)	Rendimiento del mAb total (%)	Máximo principal, h38C2 (%)	Rendimiento de máximo principal de h38C2 (%)
Ciclo A,B de carga de P 650 S	10,27	57,3	588,5	-	83,3	-
Ciclo A de combinación de P 650 S	9,03	43,1	389,2	*66	94,3	79
Ciclo B de combinación de P 650 S	8,41	53,68	451,4	77	91,5	92
Combinación de UF	25,4	32,6	828	99,5	-	-
h38C2 FR (Formulado)	19,7	40,8	804	97		

#### Ejemplo 78. Eficacia de conjugación de h38C2 completamente reactivo con Ex4-engarce

- 10 La relación entre los resultados del ensayo de HIC que presentan el máximo principal en las muestras y la capacidad de ambos sitios de conjugación para reaccionar con el sustrato se muestran en la Tabla 74 que se presenta a continuación. Después de las diferentes etapas de purificación de HIC, se incubó cada muestra de h38C2 con una relación molar de 1:3 de [SEQ ID NO: 53-L1], y después se contó el número de conjugaciones de E4-engarce por anticuerpo usando cromatografía de exclusión de tamaño.
- 15 La serie 171 de H38C2 se purificó sobre Fenil 650 S de acuerdo con el procedimiento perfeccionado del Ejemplo 77 y se contuvo en una solución de tampón base e IPA al 15 %. Las fracciones de elución en un total de 3 VC de h38C2 FR serie 171 se agruparon y la combinación mostró un 92,4 % de máximo principal mediante el ensayo de HIC. El h38C2 se incubó con una relación molar de 1:3 de Ex4-engarce. La reacción de conjugación llegó al 87,8 % de finalización y 11,8 % del mAb reaccionó con un péptido.
- 20 La serie 177 de H38C2 se purificó en Fenil 650 S de acuerdo con el procedimiento perfeccionado del Ejemplo 77 y se contuvo en una solución de tampón base y 1,6-hexanodiol al 15 %, y a continuación se sometió a diafiltración en glicina 10 mM, histidina 10 mM a pH 6,5. Las fracciones de elución en un total de 1,5 VC de serie 177 de h38C2 FR se agruparon, y la combinación mostró un 88 % de máximo principal. El h38C2 se incubó con una relación molar de 1:3 de Ex4-engarce. La reacción de conjugación llegó al 96 % de finalización y 3,9 % del mAb reaccionó con un péptido.
- 25

Comparando las series 171 y 177, era evidente que el IPA interfería con la reacción, ya que la serie 177 tenía una mayor eficacia de conjugación sin IPA, y todo lo demás era equivalente.

5 Se purificó la serie "E-tox" de h38C2 FR sobre Fenil 650 S de acuerdo con el procedimiento perfeccionado del Ejemplo 77 y se contuvo en una solución de tampón base e IPA al 15 %. Las fracciones de elución en un total de 5 VC de h38C2 FR serie "E-tox" se agruparon y la combinación mostró un 90,7 % de máximo principal mediante el ensayo de HIC. El h38C2 se incubó con una relación molar de 1:3 de Ex4-engarce. La reacción de conjugación llegó al 93,2 % de finalización y 6,7 % del mAb reaccionó con un péptido.

A la luz de la Tabla 74, se puede observar que el análisis de exclusión por tamaño, que mide la cantidad de anticuerpo completamente reactivo de una muestra, se correlaciona muy bien con el análisis de máximo principal.

10 **Tabla 74.** Eficacia de conjugación de h38C2 completamente reactivo con Ex4-Engarce.

Conjugación de h38C2 con Ex4-engarce	Ensayo de HIC con columna de gel TSK Fenil-5PW	Ensayo de HIC de columna de gel TSK Butil NBR para determinar la eficacia de conjugación		
	Máximo principal, h38C2 (%)	h38C2 (%)	h38C2 +1 Ex4-engarce (%)	h38C2 +2 Ex4-engarce (%)
h38C2 FR 171 en IPA al 15 %	92,4	0,4	11,8	87,8
h38C2 FR 177 después de UF/DF 182	88,0	0,1	3,9	96
Serie 124652-198: E-Tox	90,7	0,1	6,7	93,2

#### Ejemplo 79. Importantes hallazgos de desarrollo de Fenil 650 S

15 La columna de Fenil 650 S se escogió después de explorar varias resinas de HIC de TOSOH™ y otros vendedores. La resina tiene una alta capacidad de carga (intervalo de aproximadamente 16 a aproximadamente 18 g/l), para una resina de HIC. El tamaño de partícula de 35 µm ofrece la resolución necesaria para eliminar el mAb no conjugable mientras enriquece la forma reactiva del anticuerpo. A gran escala, se han usado columnas con alturas de lecho de 10, 13,5 y 20 cm. Los caudales son de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces superiores para las dos columnas más cortas y, por consiguiente, la invención proporciona el uso de columnas de alturas de lecho de columna de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm y, preferentemente, de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 15 cm, permitiendo un procesamiento más eficaz a menor presión. Se puede usar una altura de lecho de columna de 20 cm para cumplir los requisitos de procesamiento, pero se requerirían tiempos de procesamiento más largos. El intervalo de carga de columna y la estrategia de lavado descritos anteriormente se han optimizado tanto para el enriquecimiento como para el rendimiento del h38C2 completamente reactivo. Las estrategias anteriores y las otras resinas proporcionaron recuperaciones de proteínas del aproximadamente 11 al aproximadamente 55 %, y no alcanzaron los niveles de enriquecimiento deseados de h38C2 completamente reactivo. El trabajo de desarrollo a pequeña escala empleó IPA al 20 % en fosfato de sodio 20 mM, a pH 7,0, como tampón de elución. La presente invención proporciona el uso de 1,6-hexanodiol para evitar el uso de IPA con el fin de evitar problemas de inflamabilidad a gran escala.

20 La columna de Fenil 650 S es robusta y tiene una capacidad de carga cuatro veces superior a la de la columna de Fenil 5PW, consigue caudales superiores a los de la columna de Fenil 5 PW, debido a un mayor tamaño de partícula, y es escalable y reproducible.

25 Los resultados obtenidos con el procedimiento desarrollado con Fenil 650 S a escalas de 4 ml, 75 ml, 9,5 l y 33 l con procedimientos de purificación similares, todos lograron excelentes rendimientos y produjeron h38C2 completamente reactivo. La escala de 9,5 l administró 110 g de h38C2 FR (bien por encima del objetivo de 80-90 g) que representaba un rendimiento total de proteína del 72 %. El ensayo de HIC mostró que el máximo principal comprendía el 93 % de la proteína total.

30 La presente invención proporciona un procedimiento para suministrar h38C2 completamente reactivo a un rendimiento máximo principal de al menos aproximadamente el 85 % y, preferentemente, al menos aproximadamente el 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 92 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, con un rendimiento de proteína total de al menos aproximadamente el 65 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 70 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 72 %.

35 El procedimiento de purificación administró el h38C2 completamente reactivo necesario para la conjugación con FGF21 y, posteriormente, con el péptido Ex4 para la preparación de ABC1.

40 Los rendimientos de proteína total a grandes escalas con la columna de Fenil 650 S se han optimizado para conseguir al menos aproximadamente el 55 %, preferentemente al menos aproximadamente el 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 65 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 68 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 70 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 72 %.

más preferentemente al menos aproximadamente el 70 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 75 %. La presente invención también proporciona un procedimiento de suministro de al menos aproximadamente el 85 %, preferentemente al menos aproximadamente el 88 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de h38C2 completamente reactivo.

- 5 El enriquecimiento satisfactorio de h38C2 completamente reactivo para la conjugación se consiguió con la resina de Fenil 650 S. La capacidad de carga máxima de la columna de Fenil 650 S fue de aproximadamente 20-22 g/l.

La capacidad de carga máxima se determina equilibrando la columna con tampón y aplicando luego la carga de proteína hasta que se observa un avance de la absorbancia. El nivel de avance normalmente se establece en 5-10 % de la absorbancia máxima. La carga de la columna se detiene y el avance se recoge mientras se lava la columna con tampón de equilibrado. La diferencia entre la masa de proteína aplicada menos la cantidad de avance de proteína es la capacidad máxima de carga. En otra serie de columna, se aplica la carga máxima calculada a la columna para verificar que la cantidad de proteína se unirá a la columna.

La columna 650 S dio un rendimiento óptimo cuando se cargó a una capacidad de al menos 2/3. Las cargas de la columna, en general, fueron ~15-18 g/l, que aproximadamente 70-80 % de la capacidad máxima de la carga. Se encontró que era ventajoso cargar casi la capacidad de unión de la columna. Si la columna tiene demasiados sitios de unión disponibles después de la carga, entonces la elución del mAb no reactivo podría retrasarse durante las etapas de lavado y no retirarse antes de la elución de la forma totalmente conjugable. Por consiguiente, en algunos aspectos, la columna puede cargarse hasta al menos aproximadamente el 50 % de capacidad, y preferentemente al menos aproximadamente el 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %. En la serie 155 (Tabla 67), la columna se sobrecargó a 45 g/l y la mayor parte del material no se unió a la columna. Se prosiguió con la serie de la columna y se recuperó la proteína del resto de la serie. El cálculo de la carga total menos la cantidad de proteína en el avance dio una carga práctica de 16 g/l. La columna se sobrecargó más allá del punto de ruptura normal y se retiró más proteína de la columna por lavado de lo esperado. La capacidad de unión de la columna de Fenil 650 S está entre aproximadamente 22-30 g/l, cerca o por encima de los 22 g/l ensayados sin que se produzca ningún avance.

Una parte importante de la purificación es definir un lavado acuoso de reducción de sal de 3 etapas que eluya el anticuerpo no reactivo. Mediante el ajuste de las concentraciones de sal dina, la pendiente del lavado con reducción de sal y la duración del lavado, se eluyó la mayor parte de la forma inactiva de la columna mientras que la mayor parte del h38C2 completamente reactivo permaneció unido a la resina. La elución se realizó en el modo de fase inversa mediante alcohol isopropílico (IPA) o 1,6-hexandiol. Aunque se realizaron ensayos de columna adicionales para identificar las condiciones de elución acuosa, no se identificó un procedimiento adecuado.

Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona el sorprendente perfeccionamiento de un procedimiento para purificar h38C2. En algunos aspectos, h38C2 comprende SEQ ID NO: 25 y 26. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de perfeccionamiento de h38C2 y sus variantes. En el presente contexto, "variantes del mismo" se refiere a anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende una CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  de la secuencia de  $V_L$  mostrada en SEQ ID NO: 27; y una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende una CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  de la secuencia de  $V_H$  mostrada en SEQ ID NO: 28. Preferentemente, el h38C2 es un anticuerpo IgG1. Preferentemente, la variante de h38C2 comprende la  $V_L$  como se expone en SEQ ID NO: 27 y la  $V_H$  como se establece en SEQ ID NO: 28, y comprende además una región constante de cadena ligera al menos un 95 % idéntica a una o más de SEQ ID NO 78, 79, 80 y 81, y una región constante de cadena pesada al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos, la identidad de cada cadena constante independientemente de una de las SEQ ID NO: 27 o 28 puede ser al menos de un 96 %, al menos de un 97 %, al menos de un 98 % o al menos de un 99 %. En algunos aspectos, la región constante de la cadena ligera difiere en no más de 5 restos de aminoácido de una o más de las SEQ ID NO: 78, 79, 80 y 81. En algunos aspectos, la región constante de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 81. En algunos aspectos, la región constante de la cadena ligera difiere en no más de 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácido de la SEQ ID NO: 81.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de extracción de h38C2 completamente reactivo o variante del mismo a partir de una mezcla de h38C2 parcialmente no reactivo o una variante el mismo y h38C2 completamente no reactivo o una variante del mismo, que comprende someter la muestra a cromatografía de fase inversa sobre una columna de fenilo.

En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición que comprende h38C2 totalmente reactivo o variante del mismo. Una muestra reactiva de h38C2 o variante del mismo puede definirse como una muestra de h38C2 o una variante del mismo en la que ambos sitios de unión al antígeno están completamente disponibles para la unión al antígeno en al menos aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 88 % aproximadamente un 90 % de los anticuerpos de la muestra.

Cuando el anticuerpo sea un anticuerpo catalítico, tal como h38C2 o una variante del mismo, los sitios de unión al antígeno reactivo estarán disponibles para catalizar la reacción respectiva, y en el caso de h38C2 o variante del mismo, formar conjugados covalentes con los engranes de las fórmulas X-Y-Z descrita en el presente documento.

Sin el deseo de quedar limitados por la teoría, una hipótesis para la presencia de anticuerpos parcial y totalmente no reactivos en una muestra es en la que uno o ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo se han unido con moléculas pequeñas "pegajosas" presentes de manera natural en algún momento a lo largo del ciclo de producción precedente.

5 El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser inferior a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser inferior a aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser de entre aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser de entre aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula de las perlas de columna puede ser inferior a aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . En algunos aspectos, se puede usar una columna de fenilo de grado "S".

10 En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de al menos aproximadamente 500 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de al menos aproximadamente 650 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de al menos aproximadamente 700 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de entre aproximadamente 500 Å y 1.000 Å. En algunos aspectos, las perlas pueden comprender poros de entre aproximadamente 700 Å y 800 Å.

15 En algunos aspectos, la columna de HIC puede comprender perlas de resina conjugada con fenilo de aproximadamente 35  $\mu\text{M}$  que comprenden poros de aproximadamente 750 Å. En algunos aspectos, la columna puede ser una columna de fenilo 650 S.

20 La HIC se puede llevar a cabo a entre aproximadamente 0 °C y 37 °C. Esto puede estar a temperatura ambiente (de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C). Esto puede estar a una temperatura de entre aproximadamente 16 °C y aproximadamente 23 °C.

El caudal lineal de la columna puede ser de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 cm/h. Los caudales preferidos pueden ser de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 90 cm/h.

25 El tampón base puede comprender un agente de tamponamiento seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio, fosfato de potasio, fosfato de amonio, HEPES, Tris o bis-Tris, y preferentemente fosfato de sodio, en una concentración de entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 100 mM, y preferentemente de entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 70 mM, y más preferentemente de entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de aproximadamente 20 mM. Por debajo de una concentración de aproximadamente 5 mM, es probable que exista una concentración de sal demasiado débil para tamponar de forma eficaz, y por encima de aproximadamente 100 mM, la concentración aumentada de sal puede afectar negativamente a la solubilidad de la solución. El pH puede estar entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, y más preferentemente entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2, y lo más preferentemente aproximadamente 7.

30 En algunos aspectos, la columna se puede someter a un lavado de equilibrado de carga previo a la carga. El lavado de equilibrado previo a la carga puede comprender un tampón base y entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 1,5 M de sal.

En algunos aspectos, la columna se puede someter a un lavado de equilibrado después de la carga, que comprende tampón base y que comprende además entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 1,5 M de sal.

40 La sal para cualquiera de las etapas (incluyendo los tampones previo a la carga, de carga y posterior a la carga) puede estar en un intervalo de concentraciones cuyo límite inferior se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,75 M y 0,8 M, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 0,8 M, 0,9 M, 1 M, 1,1 M, 1,2 M, 1,3 M, 1,4 M y 1,5 M. La concentración de sal puede ser de aproximadamente 0,75 M. La concentración de sal puede ser de aproximadamente 0,5 M. La concentración de sal puede ser de aproximadamente 1 M. La sal puede seleccionarse del grupo que consiste en NaCl, KCl y citrato monosódico. La sal puede ser NaCl. La sal puede ser NaCl a aproximadamente 1 M.

45 En algunos aspectos, la columna se puede someter a un gradiente de sal lineal en tampón de base, en el que la concentración de sal de partida está entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,5 M y es preferentemente aproximadamente 1 M, y cuya concentración final está entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 0,4 M, y está preferentemente entre aproximadamente 0,3 M y aproximadamente 0,35 M, y es más preferentemente aproximadamente 0,33 M. Se ha encontrado que se obtienen resultados particularmente ventajosos cuando la reducción de la concentración de la sal (en particular NaCl) a través del gradiente es igual a una disminución de 90-100 mM por 1 VC (por ejemplo, se usarían entre aproximadamente 10-11 VC para reducir la concentración de sal de 1,5 M a 0,5 M). Por consiguiente, en algunos aspectos, el gradiente de sal lineal se caracteriza por una reducción en la concentración de sal de entre aproximadamente 90 mM y 100 mM por 1 VC. Por consiguiente, se ha encontrado que cuando se usa un gradiente de NaCl, es deseable mantener al menos aproximadamente 0,65-0,7 M de NaCl por aproximadamente 7 VC y, en algunos aspectos, aproximadamente 0,67 M de NaCl por aproximadamente 7 VC. El gradiente lineal puede comprender al menos aproximadamente 4, preferentemente al menos aproximadamente 4,5, y más preferentemente al menos aproximadamente 5VC. Un volumen demasiado pequeño de gradiente lineal puede

hacer que la pendiente del gradiente sea demasiado pronunciada y que no haya tiempo suficiente para que el material no reactivo se eluya. En algunos aspectos, el gradiente de sal lineal puede comprender entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 VC. En algunos aspectos, el gradiente de sal lineal puede comprender entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7 VC. En algunos aspectos, el gradiente de sal lineal puede comprender aproximadamente 7 VC. La sal puede seleccionarse del grupo que consiste en NaCl, KCl y citrato monosódico. La sal puede ser NaCl.

De manera favorable, la columna se puede someter entonces a un lavado en meseta en tampón base, que comprende entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,4 M de sal (como antes), y preferentemente 0,33 M de sal, entre aproximadamente 4 VC y aproximadamente 7 VC, y preferentemente aproximadamente 6 VC, y más preferentemente aproximadamente 5 VC. La sal puede ser NaCl. El NaCl puede estar a 0,33 M.

En algunos aspectos, la columna se puede someter luego a un lavado adicional con tampón base en un intervalo de VC cuyo límite inferior se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1, 2, 3, 4 y 5, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y en el que el intervalo puede estar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10, o aproximadamente 2 y aproximadamente 8, o aproximadamente 3 y aproximadamente 8, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6. En algunos aspectos, el lavado adicional en tampón base está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 VC de tampón base.

En algunos aspectos, la elución en la columna puede realizarse usando tampón base y un gradiente de concentración lineal de 1,6-hexanodiol. El gradiente lineal de elución puede progresar desde una concentración inicial de 1,6-hexanodiol de entre aproximadamente 0 a aproximadamente 1 %, y preferentemente del aproximadamente 0 % hasta un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 % y aproximadamente 22 %. La elución con hexanodiol puede aumentarse en un volumen de columna entre aproximadamente 0,5 VC y aproximadamente 3 VC de tampón de elución o hasta que se recoja la combinación de elución. En algunos aspectos, se puede ejecutar una etapa de elución adicional que comprenda el tampón base y 1,6-hexanodiol a una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 % y 22 % aproximadamente 0 % a aproximadamente 22 %, para hasta 5 VC o hasta que se recoja la combinación de elución. En algunos aspectos, el VC de elución total es de aproximadamente 7 VC. En algunos aspectos, el VC de elución total es de aproximadamente 6 VC.

Aunque el hexanodiol al 20 % funcionó bien, se encontró que el 15 % permitió un mejor caudal en UF/DF.

El h38C2 eluido se puede someter entonces a diafiltración en un tampón adecuado (por ejemplo, histidina aproximadamente 10 mM, glicina aproximadamente 10 mM, sacarosa al aproximadamente 2 %, pH 6,5 ± 0,3).

En algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento de purificación de una muestra de h38C2 o una variante del mismo, en el que ambos sitios de unión al antígeno están completamente disponibles para la unión al antígeno en al menos aproximadamente el 85 % de los anticuerpos de la muestra, que comprende:

(i) equilibrar una columna de HIC con un lavado de equilibrado previo a la carga que comprende un tampón base que comprende entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 100 mM de fosfato de sodio, fosfato de potasio o fosfato de amonio, HEPES, Tris y bis-Tris, a entre aproximadamente pH 6,5 y aproximadamente 7,5, y que comprende además una sal seleccionada del grupo que consiste en NaCl, KCl y citrato monosódico, a una primera concentración de entre aproximadamente 0,5 M y 1,5 M; en el que la columna de HIC comprende perlas de resina conjugadas con fenilo por debajo de aproximadamente 50 µm de diámetro y que comprenden poros de al menos aproximadamente 500 Å;

(ii) cargar la columna con una muestra de h38C2 a entre aproximadamente 4 y aproximadamente 80 g/l en tampón de carga que comprende el tampón base y que comprende además la sal a la primera concentración;

(iii) lavar la columna con lavado de equilibrado posterior a la carga que comprende el tampón base y la sal a la primera concentración;

(iv) lavar la columna con un gradiente de sal, que comprende el tampón base y que comprende además un gradiente de concentración lineal de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 0,25 M de la sal, caracterizado porque la concentración de sal disminuye entre aproximadamente 90 mM y 100 mM por 1 VC;

(v) Lavar la columna con un lavado en meseta de sal, comprendiendo entre aproximadamente 4 VC y aproximadamente 8 VC de la sal a entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,4 M en el tampón base;

(vi) lavar la columna con un lavado de tampón que comprende el tampón base;

(vii) eluir el h38C2 con un tampón de elución, que comprende el tampón base y un gradiente de concentración lineal de 1,6-hexanodiol que comienza a una concentración de entre aproximadamente 0 a aproximadamente 1 % de 1,6-hexanodiol y termina en un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 % y 22 % aproximadamente 0 % a aproximadamente 22 % de 1,6-hexanodiol para entre aproximadamente 0,5 VC a

aproximadamente 3 VC o hasta que se recoja la combinación de elución;

- (viii) opcionalmente, realizar una etapa de elución adicional que comprenda el tampón base y 1,6-hexanodiol a una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 % y 22 % aproximadamente 0 % a aproximadamente 22 %, para hasta 5 VC o hasta que se recoja la combinación de elución.

En algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento de purificación de una muestra de h38C2 o una variante del mismo, en el que ambos sitios de unión al antígeno están completamente disponibles para la unión al antígeno en al menos aproximadamente el 85 % de los anticuerpos de la muestra, que comprende:

- (i) equilibrar una columna de HIC de Fenil 650 S con un lavado de equilibrado previo a la carga que comprende aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio, aproximadamente 1 M de NaCl, a aproximadamente pH 7;
- (ii) cargar la columna con una muestra de h38C2 a entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 g/l en aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio a aproximadamente pH 7;
- (iii) lavar la columna con lavado de equilibrado posterior a la carga que comprende aproximadamente 1 VC de NaCl 1 M en fosfato de sodio aproximadamente 20 mM a aproximadamente pH 7;
- (iv) lavar la columna con un gradiente de NaCl, que comprende fosfato de sodio 20 mM a pH 7, y que comprende además un gradiente de concentración lineal de aproximadamente 1 M a aproximadamente 0,33 M de NaCl, caracterizado porque la concentración de sal disminuye entre aproximadamente 90 mM y 100 mM por 1 VC;
- (v) lavar la columna con un lavado en meseta de NaCl, que comprende aproximadamente 5 VC aproximadamente 0,33 M de NaCl en aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio a aproximadamente pH 7;
- (vi) lavar la columna con un lavado de tampón que comprende aproximadamente 2 VC de fosfato de sodio 20 mM a aproximadamente pH 7;
- (viii) eluir el h38C2 con un tampón de elución, que comprende fosfato de sodio 20 mM a pH 7 y un gradiente de concentración lineal de 1,6-hexanodiol que comienza a una concentración de entre aproximadamente 0 a aproximadamente 1 % de 1,6-hexanodiol y termina en un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 % o aproximadamente 16 % de 1,6-hexanodiol para entre aproximadamente 1 VC.
- (viii) realizar una etapa de elución adicional que comprende fosfato de sodio 20 mM a pH 7 y 1,6-hexanodiol a una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 % y aproximadamente 16 %, para aproximadamente 2 a aproximadamente 5 VC o hasta que se recoge la combinación de elución.

#### Ejemplo 80. Análisis de adipocitos después del tratamiento con ABC-1

Además del análisis de la expresión génica mediante matriz en el tejido adiposo blanco, se realizó la evaluación histoquímica en el tejido adiposo blanco de ratones DIO tratados con ABC-1, Ab[Ex4]<sub>2</sub> o Ab[FGF21]<sub>2</sub>. Los compuestos se administraron una vez a la semana (días 0 y 7), y se midieron el peso corporal y la ingesta de alimentos dos veces a la semana. El día de la finalización (día 10), se extirpó un depósito gonadal blanco adiposo, se pesó, se fijó, se embebió en parafina y se seccionó para el análisis histoquímico del tamaño celular y la apoptosis (tinción de TUNEL). ABC-1 redujo significativamente el peso corporal y el peso húmedo del tejido adiposo, así como el tamaño de los adipocitos, con una tendencia hacia la reducción de la apoptosis adipocitaria.

**Tabla 75.** Cambio del peso corporal, ingesta de alimentos, peso del depósito adiposo, tamaño adipocitario y tinción de TUNEL el día 10, tras dos inyecciones SC semanales de compuestos en ratones DIO

Tratamiento	Variación media del peso corporal (g)	Ingesta media acumulada de alimentos (g)	Peso medio de tejido adiposo (g)	Tamaño medio adipocitario (superficie del pixel)	Tinción de TUNEL (superficie del pixel)
Vehículo	+2,2	30,8	0,6	3336	43,6
ABC-1 a 10 mg/kg	-7,9	23,6	0,3	1652	32,0
ABC-13 mg/kg	-3,6	25,4	0,4	2111	30,8
Ab[Ex4] <sub>2</sub> a 0,3 mg/kg	-1,0	19,2	0,7	3148	48,2
Ab[FGF21] <sub>2</sub> a 10 mg/kg	-2,5	29,4	0,7	2990	41,0

**Ejemplo 81. Efecto de ABC-1 en monos después de una dieta rica en grasas**

En un estudio diseñado para investigar la eficacia de ABC-1 macacos cangrejeros después de alimentarse con una dieta rica en grasas durante 6 meses, 8 machos adultos recibieron ABC-1 por vía intravenosa dos veces a la semana durante dos semanas a dosis de 1,0 mg/kg (semanas 1 y 2), 3,0 mg/kg (semanas 3 y 4) y 10 mg/kg (semanas 5 y 6). Se realizaron rastreos de DXA de todo el cuerpo bajo anestesia después de un ayuno nocturno al inicio y al final del período de dosificación de 6 semanas. Se analizaron y se estimaron la composición de los 3 compartimentos corporales que consistía en masa grasa, masa corporal magra y contenido mineral óseo (BMC). No se observó un cambio notable en los pesos corporales entre el inicio y los períodos de dosificación de 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg. Sin embargo, al final del tratamiento con 10,0 mg/kg, se observó una disminución considerable del peso corporal medio (9,0 % con un error típico de  $\pm 5,4$  %). Los valores medios del Índice de Masa Corporal (IMC) fueron inferiores en un 12,09 % al final del período de dosificación (Semana 6) en comparación con los valores basales medios. El análisis de la composición corporal mediante DXA mostró valores porcentuales medios inferiores para el tejido ( $-34,9 \pm 12,9$  %) y porcentaje de grasa regional ( $-35,6 \pm 12,9$  %) y masa grasa ( $-42,1 \pm 14,0$  %) en el tronco y todo el cuerpo al final de los períodos de dosificación (Semana 6), con respecto a los valores basales. No se observaron cambios notables en la masa de tejido magro, el contenido mineral óseo (BMC) ni la masa total durante los períodos de observación, lo que sugiere que la pérdida de peso inducida por ABC-1 se dirige únicamente a una pérdida de masa grasa.

**Tabla 76.** Efecto de ABC-1 en macacos cangrejeros tras 6 meses de dieta rica en grasas.

	Peso corporal (kg)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Masa total mediante DXA (kg)	Masa magra mediante DXA (kg)	Masa de grasa mediante DXA (kg)	BMC mediante DXA (kg)
Línea basal	5,9 $\pm$ 0,3	33,6 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	0,27 $\pm$ 0,02
Semana 6	5,2 $\pm$ 0,2	29,6 $\pm$ 0,9	5,3 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,2	0,58 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,02

A menos que se indique lo contrario, cuando se usa el término " Ab-L1-FGF21 $\Delta$ H-A129C" en el contexto de los ejemplos específicos, se refiere al anticuerpo h38C2 (SEQ ID NO: 25 y 26), con cada brazo del anticuerpo unido covalentemente a través de K<sup>99</sup> de SEQ ID NO: 26 al engarce-1 (L1), y cada molécula L1 conjugada covalentemente al grupo tiol de Cys<sup>129</sup> en SEQ ID NO: 10 (de acuerdo con la numeración de SEQ ID NO: 1). El compuesto también puede describirse como Ab-(FGF21 $\Delta$ H-A129C-L1)<sub>2</sub>, h38C2-(FGF21 $\Delta$ H-A129C-L1)<sub>2</sub> y h38C2-(SEQ ID NO: 10-L1)<sub>2</sub>. Resultará evidente que pueden ser posibles modificaciones menores de la secuencia del anticuerpo, engarce específico y molécula de FGF21, en particular sitios polimórficos conocidos, tales como la posición 146, que puede ser L o P. Se observa que los variantes P146 y L146 de FGF21 no parecen mostrar ninguna diferencia biológica.

Cuando se describen moléculas conjugadas bifuncionales asimétricas (ABC), y compuestos intermedios y derivados de los mismos en el contexto de ejemplos específicos, un subíndice 1 o 2 indica el número de especies de unión a proteínas o de unión a péptidos conjugadas por anticuerpo.

Cuando se usan letras en el contexto de describir grupos de engarce o variables químicas (por ejemplo, Y para definir un grupo de reconocimiento), la fórmula puede representarse mediante una combinación de mayúsculas y minúsculas de la letra, o doble minúscula, para evitar cualquier posible confusión entre la fórmula representada por la letra única y un aminoácido o nucleótido indicado por el código IUPAC de una letra. Así pues, Y, como grupo de reconocimiento, también puede describirse como Yy o yy.

Tabla 57. Formulaciones de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] (ABC-1)

Formulación	Proteína (mg/ml)	pH	Aspecto (NTU)								SE-HPLC (% de HMW)							
			Inicial	1 semana 5 °C	2 semana 5 °C	1 semana 25 °C	2 semana 25 °C	1 semana 40 °C	2 semana 40 °C	Inicial	1 semana 5 °C	2 semana 5 °C	1 semana 25 °C	2 semana 25 °C	1 semana 40 °C	2 semana 40 °C		
A	Acetato de sodio 20 mM, pH 4	4,0	4	6	4	6	3	4	4	11	2,7	2,3	2,4	2,3	2,5	3,0	4,3	
B	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,0	4,0	6	4	4	4	3	3	6	2,5	2,2	2,3	2,2	2,1	2,0	2,0		
C	Ácido láctico 20 mM, pH 4,8	4,8	4	6	6	11	28	75	40	2,7	2,5	2,6	2,6	2,7	3,8	5,2		
D	Histidina 20 mM, pH 5,8	5,9	5	7	4	5	28	334	357	4,3	4,5	4,8	4,0	4,2	3,8	4,0		
t	Fosfato de sodio 20 mM, pH 8,0	7,9	7	8	4	7	8	6	7	4,0	4,6	5,1	6,8	7,2	5,4	5,6		

**Tabla 58.** Aspecto y datos de UV de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] (ABC-1)

	Formulación	Aspecto (NTU)				Concentración (mg/ml)			
		Inicial	1 semana 30°C	2 semanas 25 °C	2 semanas 30 °C	Inicial	1 semana 30°C	2 semanas 25 °C	2 semanas 30 °C
A	Ácido cítrico 20 mM, pH 4,2	12	530	<b>296</b>	<b>362</b>	8,1	<b>5,5</b>	<b>5,9</b>	<b>5,5</b>
B	Ácido cítrico 20 mM, pH 4,5	<b>84</b>	519	<b>580</b>	<b>528</b>	8,4	<b>5,0</b>	<b>5,3</b>	<b>4,8</b>
C	Ácido cítrico 20 mM, pH 4,8	<b>55</b>	498	<b>522</b>	<b>530</b>	8,0	<b>4,8</b>	<b>5,3</b>	<b>4,4</b>
D	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,2	7	6	5	3	8,4	8,3	8,6	8,5
E	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,5	7	7	6	6	8,3	8,3	8,5	8,5
F	Ácido glutámico 20 mM, pH 4,8	6	58	17	34	8,3	8,4	8,7	8,6
G	Ácido láctico 20 mM, pH 4,2	6	5	6	5	8,3	8,4	8,7	8,6
H	Ácido láctico 20 mM, pH 4,5	8	9	7	9	8,4	8,4	8,7	8,6
I	Ácido succínico 20 mM, pH 4,2	6	4	7	7	8,3	8,4	8,6	8,5
J	Ácido succínico 20 mM, pH 4,5	7	13	9	13	8,3	8,5	8,6	8,7
K	Ácido succínico 20 mM, pH 4,8	6	315	39	291	8,3	8,2	8,6	8,2
L	Ácido succínico 20 mM, pH 5,3	6	390	12	368	8,2	8,1	8,5	8,1

**Tabla 61.** Formulaciones liofilizadas de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] (ABC-1) (Liq = líquida; Lio = liofilizada)

ID	Conc. de proteína mg/ml	Tampón	pH	Excipientes	Liq/Lio	% de HMW inicial	% de HMW tras 4 semanas a 5 °C	% de HMW tras 4 semanas a 25 °C	% de especies ácidas inicial	% de especies ácidas tras 4 semanas a 25 °C	% de Frag. inicial	% de Frag. tras 4 semanas a 5 °C
A	15	Ácido glutámico 20 mM	4,5	85 mg/ml de trehalosa dihidratada, 0,05 mg/ml de EDTA, 0,5 mg/ml de PS80	Liq.	1,0	1,2	1,7	39,62	49,61	1,3	2,3
B	30	Ácido glutámico 20 mM	4,5	85 mg/ml de trehalosa dihidratada, 0,05 mg/ml de EDTA, 0,5 mg/ml de PS80	Lio	1,4	1,5	1,6	42,19	41,63	1,5	1,5

**Tabla 62.** Datos de bioactividad (% relativo) de formulaciones liofilizadas seleccionadas de [FGF21]-[primer engarce]-[Anticuerpo]-[segundo engarce]-[Ex4] enumerados en la Tabla 61

Ensayo	Bioactividad tras la liofilización t = 0	Bioactividad tras 1 mes a 5 °C	Bioactividad tras 1 mes a 25 °C	Bioactividad tras 3 mes a 5 °C	Bioactividad tras 3 mes a 25 °C
FGF21	93,0	89	78	87	99
Ex4	116,0	127	113	112	124

**Listado de secuencias**

5 <110> CovX Technologies Ireland Limited Pfizer Inc.

<120> Compuestos antidiabéticos

<130> PC71861A

10

<150> US61/579.609

<151> 22-12-2011

<150> US61/644.831

15

<151> 09-05-2012

<160> 82

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H o está ausente

30

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L o P

35

<400> 1

ES 2 623 786 T3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 2  
 <211> 180  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

- <210> 3
- <211> 181
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 10 <222> (1)..(1)
- <223> X = H o está ausente.
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 15 <222> (79)..(79)
- <223> X = D o C
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 20 <222> (125)..(125)
- <223> X = H o C

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (129)..(129)  
 5 <223> X = A o C

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (146)..(146)  
 10 <223> X = P o L

<400> 3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Xaa Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Xaa Arg Asp Pro  
 115 120 125

Xaa Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

15 <210> 4  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> X = H o está ausente

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (125)..(125)  
 10 <223> X = C o H

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (129)..(129)  
 15 <223> X = A o C

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (146)..(146)  
 20 <223> X = L o P

<400> 4

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Xaa Arg Asp Pro  
 115 120 125

Xaa Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

ES 2 623 786 T3

<210> 5  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = H o está ausente

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (146)..(146)  
 <223> X = L o P

15

<400> 5

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

ES 2 623 786 T3

<210> 6  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

```

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1                               5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20                               25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35                               40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50                               55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65                               70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85                               90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100                              105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro Ala
115                              120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130                              135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145                              150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165                              170 175

Ser Tyr Ala Ser
180
    
```

10

<210> 7  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 7

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 8  
 <211> 181  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 10 <222> (1)..(1)  
 <223> X = H o está ausente

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 15 <222> (146)..(146)  
 <223> X = L o P

<400> 8

ES 2 623 786 T3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Cys Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

5 <210> 9  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30  
 Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60  
 Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95  
 Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110  
 Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Cys  
 115 120 125  
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140  
 Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175  
 Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 10  
 <211> 180  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Cys  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

5 <210> 11  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = H o está ausente

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 623 786 T3

<222> (146)..(146)  
 <223> X = P o L

<400> 11

5

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 12  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 12

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30  
 Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60  
 Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95  
 Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110  
 Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125  
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140  
 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175  
 Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 13  
 <211> 180  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 13

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

- <210> 14
- <211> 180
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 14

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Cys His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 15  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 15

5

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Cys Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 16  
 <211> 181  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 16

Cys Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

10

ES 2 623 786 T3

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

- <210> 17
- <211> 181
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <220>
- <221 > MISC\_FEATURE
- 10 <222> (1)..(1)
- <223> X = H o está ausente
  
- <220>
- <221 > MISC\_FEATURE
- 15 <222> (56)..(56)
- <223> X = K o R
  
- <220>
- <221 > MISC\_FEATURE
- 20 <222> (59)..(59)
- <223> X = K o R
  
- <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (69)..(69)  
 <223> X = K o R

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (122)..(122)  
 <223> X = K o R

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (146)..(146)  
 <223> X = L o P

15 <400> 17

```

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1           5           10           15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
          20           25           30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
          35           40           45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Xaa Ala Leu Xaa Pro Gly Val Ile Gln
 50           55           60

Ile Leu Gly Val Xaa Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65           70           75           80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
          85           90           95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
          100          105          110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Xaa Ser Pro His Arg Asp Pro
          115          120          125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
          130          135          140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
          145          150          155          160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
          165          170          175

Pro Ser Tyr Ala Ser
          180
    
```

ES 2 623 786 T3

<210> 18  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 18

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

10 <210> 19  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 19

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 20  
 <211> 180  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

10

ES 2 623 786 T3

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 21  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 22

<211> 180

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 23  
 <211> 181  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 23

ES 2 623 786 T3

Lys Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15  
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30  
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60  
 Ile Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95  
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110  
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125  
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140  
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175  
 Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 24

<211> 180

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

ES 2 623 786 T3

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu  
 20 25 30  
 Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile  
 50 55 60  
 Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu  
 85 90 95  
 Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly  
 100 105 110  
 Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala  
 115 120 125  
 Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala  
 130 135 140  
 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro  
 165 170 175  
 Ser Tyr Ala Lys  
 180

<210> 25  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 25

5

ES 2 623 786 T3

Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr  
 20 25 30  
 Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly  
 85 90 95  
 Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 26

<211> 448

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26



ES 2 623 786 T3

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

ES 2 623 786 T3

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 27  
 <211> 112  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr  
 20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

10

<210> 28  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

ES 2 623 786 T3

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 29

<211> 112

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 29

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr  
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly  
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

10

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

15 <213> *Mus musculus*

<400> 30

ES 2 623 786 T3

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

Thr Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg Asn Tyr  
 20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Lys Tyr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

5 <210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Enlazador Polipeptídico  
 <400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

15 <210> 32  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 32

Met Asn Ser Asn Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala  
 20 25

<210> 33

ES 2 623 786 T3

<211> 209  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 33

Met Asn Ser Asn Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro  
 20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr  
 35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg  
 50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val  
 85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly  
 100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu  
 115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu  
 130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly  
 145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu  
 165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp  
 180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala  
 195 200 205

Ser

ES 2 623 786 T3

<210> 34  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 34

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
 20 25 30

10 <210> 35  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 35

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

20 <210> 36  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

<400> 36

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

35 <210> 37  
 <211> 40  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

5

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

10

<400> 37

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

15 <210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

25 <222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

30 <222> (40)..(40)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína, homoserina o está ausente

<400> 38

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

35 <210> 39

<211> 39

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

45 <220>

<221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

5 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (38)..(38)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

10 <400> 39

His	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Xaa	Ser									
			35												

15 <210> 40  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

25 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (36)..(36)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 40

His	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Xaa	Pro	Pro	Ser									
			35												

35 <210> 41  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

5 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (34)..(34)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

10 <400> 41

```

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1              5              10              15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
              20              25              30

Ser Xaa Ala Pro Pro Pro Ser
              35
    
```

15 <210> 42  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

25 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (32)..(32)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 42

```

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1              5              10              15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Xaa
              20              25              30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
              35
    
```

35 <210> 43  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

5 <222> (28)..(28)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 43

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Xaa Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

10

<210> 44

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

20

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

30

<400> 44

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

35

<210> 45

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

5 <222> (26)..(26)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 45

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Xaa Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

10

<210> 46

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

20

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

25

<220>

<221 > MISC\_

<222> (24)..(24)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

30

<400> 46

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

35

<210> 47

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

45 <222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

5 <222> (23)..(23)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 47

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Xaa Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

10

<210> 48

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

20

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

25

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

30

<400> 48

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

35

<210> 49

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

5 <222> (20)..(20)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 49

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

10

<210> 50

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

20

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

25

<220>

<221 > MISC\_

<222> (19)..(19)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

30

<400> 50

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Xaa Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

35

<210> 51

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

45 <223> X = Aib

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(17)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

5  
 <400> 51

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Xaa Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

10 <210> 52  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 20 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 25 <222> (16)..(16)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 52

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Xaa  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

30 <210> 53  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 40 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

5

<400> 53

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

10 <210> 54

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

20

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

25

<222> (13)..(13)

<223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 54

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Xaa Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

30

<210> 55

<211> 39

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

40

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

5  
 <400> 55

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

10 <210> 56  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (11)..(11)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina

<400> 56

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Xaa Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

30  
 <210> 57  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina  
 5  
 <400> 57

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Xaa  
 20 25 30

10 <210> 58  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 20 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

<220>  
 <221 > MISC\_  
 25 <222> (21)..(21)  
 <223> X = K, KSH, KSMAL, Dap, Dab, R, Y, C, T, S homocisteína u homoserina  
 <400> 58

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser  
 <210> 59  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = d-His

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib



ES 2 623 786 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Xaa Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Xaa Xaa Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

5 <210> 61  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

15 <400> 61

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

20 <210> 62  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

35 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> X = KSH

<400> 62

ES 2 623 786 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

5 <210> 63  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

15 <400> 63

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Lys Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

20 <210> 64  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

35 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X = KSH

<400> 64

ES 2 623 786 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

5 <210> 65  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

15 <400> 65

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Lys Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

20 <210> 66  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

35 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> X = KSH

<400> 66

ES 2 623 786 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Xaa Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

5 <210> 67  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

15 <400> 67

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

20 <210> 68  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X = Aib

35 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> X = KSH

<400> 68

ES 2 623 786 T3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

5 <210> 69  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>  
<221 > MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> X = Aib

15 <400> 69

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

20 <210> 70  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

30 <220>  
<221 > MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> X = Aib

35 <220>  
<221 > MISC\_FEATURE  
<222> (21)..(21)  
<223> X = KSH

<400> 70

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Xaa Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (146)..(146)  
 <223> X = L o P

5

<400> 73

```

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1           5           10           15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
      20           25           30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
      35           40           45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
      50           55           60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65           70           75           80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
      85           90           95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
      100          105          110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
      115          120          125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
      130          135          140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145          150          155          160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg Ser
      165          170          175

                Pro Ser Tyr Ala Ser
                        180
    
```

10 <210> 74  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X = H o está ausente

20 <400> 74

ES 2 623 786 T3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

- <210> 75
- <211> 181
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221 > MISC\_FEATURE
- 10 <222> (1)..(1)
- <223> X = H o está ausente
- <400> 75

ES 2 623 786 T3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly  
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Cys Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

<210> 76  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 76

5

ES 2 623 786 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys  
 210 215 220

ES 2 623 786 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440

<210> 77

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogos Sintéticos de Exendina Humana-4

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

5 <222> (1)..(1)

<223> X = C(O)CH3

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

10 <222> (3)..(3)

<223> X = Aib

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

15 <222> (15)..(15)

<223> X = KSH

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

20 <222> (41)..(41)

<223> X = NH2

<400> 77

Xaa His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Xaa Glu  
1 5 10 15

Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro  
20 25 30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
35 40

25

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

35 <222> (46)..(46)

<223> X = V o A

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

40 <222> (84)..(84)

<223> X = V o L

<400> 78

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

ES 2 623 786 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Xaa Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Xaa Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 79  
 <211> 107  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 79

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Val Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

10  
 <210> 80  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 80

ES 2 623 786 T3

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1           5           10           15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
                20           25           30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
                35           40           45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50           55           60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65           70           75           80

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85           90           95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                100           105

```

5 <210> 81  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 81

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1           5           10           15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
                20           25           30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
                35           40           45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50           55           60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65           70           75           80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85           90           95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                100           105

```

10 <210> 82  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 82

ES 2 623 786 T3

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu



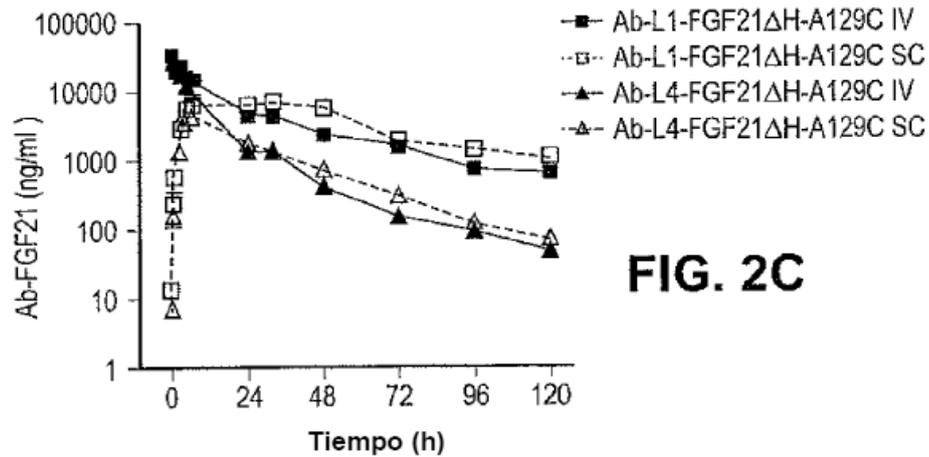
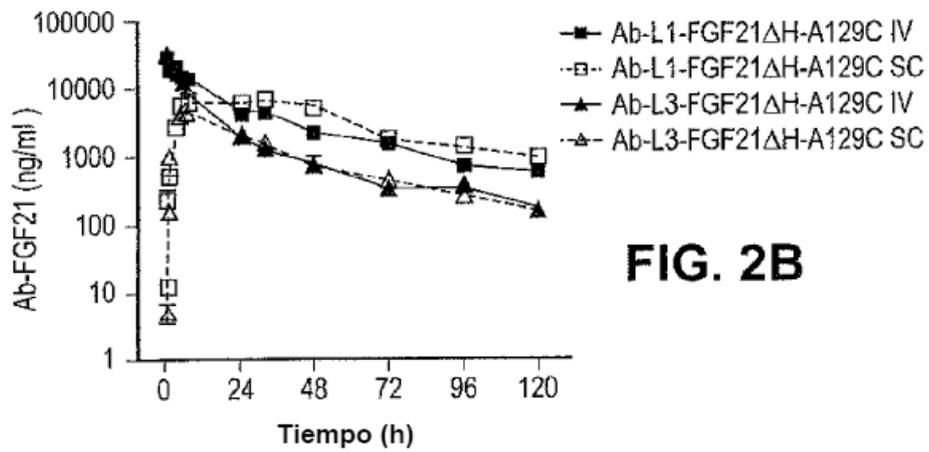
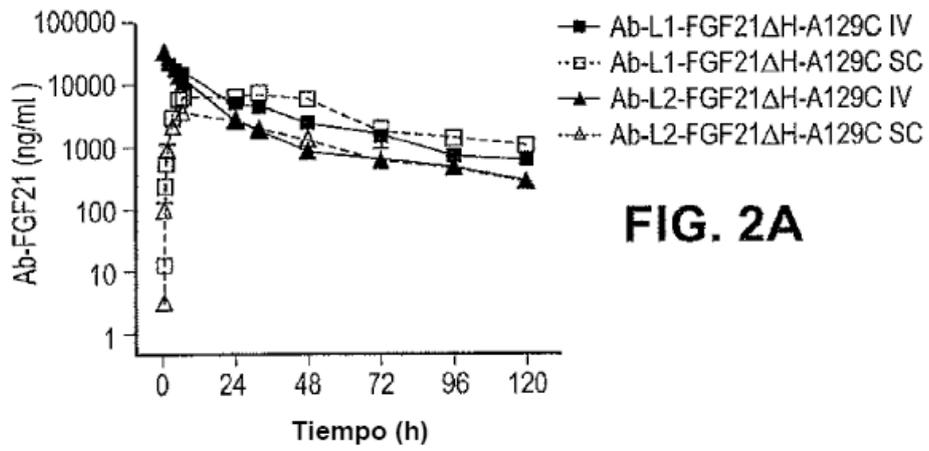
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de una muestra de anticuerpo h38C2 o una variante del mismo, en el que ambos sitios de unión al antígeno están completamente disponibles para la unión al antígeno en al menos aproximadamente el 85 % de los anticuerpos de la muestra, que comprende:
- 5 (i) equilibrar una columna de HIC (cromatografía de interacción hidrófoba) con un lavado de equilibrado previo a la carga que comprende un tampón base que comprende entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 100 mM de fosfato de sodio, fosfato de potasio o fosfato de amonio, HEPES, Tris y bis-Tris, a entre aproximadamente pH 6,5 y aproximadamente 7,5, y que comprende además una sal seleccionada del grupo que
- 10 consiste en NaCl, KCl y citrato monosódico, a una primera concentración de entre aproximadamente 0,5 M y 1,5 M; en el que la columna de HIC comprende perlas de resina conjugadas con fenilo inferiores a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diámetro y que comprenden poros de al menos aproximadamente 500 Å;
- (ii) cargar la columna con una muestra de h38C2 a entre aproximadamente 4 y aproximadamente 80 g/l en tampón de carga que comprende el tampón base y que comprende además la sal a la primera concentración;
- 15 (iii) lavar la columna con lavado de equilibrado posterior a la carga que comprende el tampón base y la sal a la primera concentración;
- (iv) lavar la columna con un gradiente de sal, que comprende el tampón base y que comprende además un gradiente de concentración lineal de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 0,25 M de la sal, **caracterizado porque** la concentración de sal disminuye entre aproximadamente 90 mM y 100 mM por volumen de columna (VC);
- 20 (v) lavar la columna con un lavado en meseta de sal, que comprende entre aproximadamente 4 VC y aproximadamente 8 VC de la sal a entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,4 M en el tampón base;
- (vi) lavar la columna con un lavado de tampón que comprende el tampón base;
- (viii) eluir el h38C2 con un tampón de elución, que comprende el tampón base y un gradiente de concentración lineal de 1,6-hexanodiol que comienza a una concentración de entre aproximadamente 0 y aproximadamente
- 25 1 % de 1,6-hexanodiol y termina en un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 % y aproximadamente 22 % de 1,6-hexanodiol para entre aproximadamente 0,5 VC y aproximadamente 3 VC o hasta que se recoja la combinación de elución;
- 30 (viii) opcionalmente, realizar una etapa de elución adicional que comprende el tampón base y 1,6-hexanodiol a una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 % y aproximadamente 22 %, para hasta 5 VC o hasta que se recoja la combinación de elución;
- 35 en el que el anticuerpo h38C2 o una variante del mismo comprende una región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende una CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  de la secuencia de  $V_L$  mostrada en SEQ ID NO: 27; y preferentemente como se expone en SEQ ID NO: 27, y una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende una CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  de la secuencia de  $V_H$  mostrada en SEQ ID NO: 28, y preferentemente como se expone en SEQ ID NO: 28.
- 40 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende además una región constante de cadena ligera al menos un 95 % idéntica a una o más de SEQ ID NO: 78, 79, 80 y 81, y una región constante de cadena pesada al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 82.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es una gG1 y puede comprender SEQ ID NO: 25 y 26.
- 45 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la columna de HIC comprende perlas de resina conjugada con fenilo de aproximadamente 35  $\mu\text{m}$  que comprenden poros de aproximadamente 750 Å.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el lavado de equilibrado previo a la carga de la etapa (i) comprende aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio,
- 50 aproximadamente 1 M de NaCl, a aproximadamente pH 7.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa (ii), la columna se carga con una muestra de h38C2 a entre aproximadamente 15 y aproximadamente 18 g/l en aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio a aproximadamente pH 7.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa (iii), el
- 55 lavado de equilibrado posterior a la carga comprende aproximadamente 1 VC de NaCl 1 M en aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio a aproximadamente pH 7.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa (iv), el gradiente de NaCl comprende fosfato de sodio 20 mM a pH 7, y en el que el gradiente de concentración lineal es de

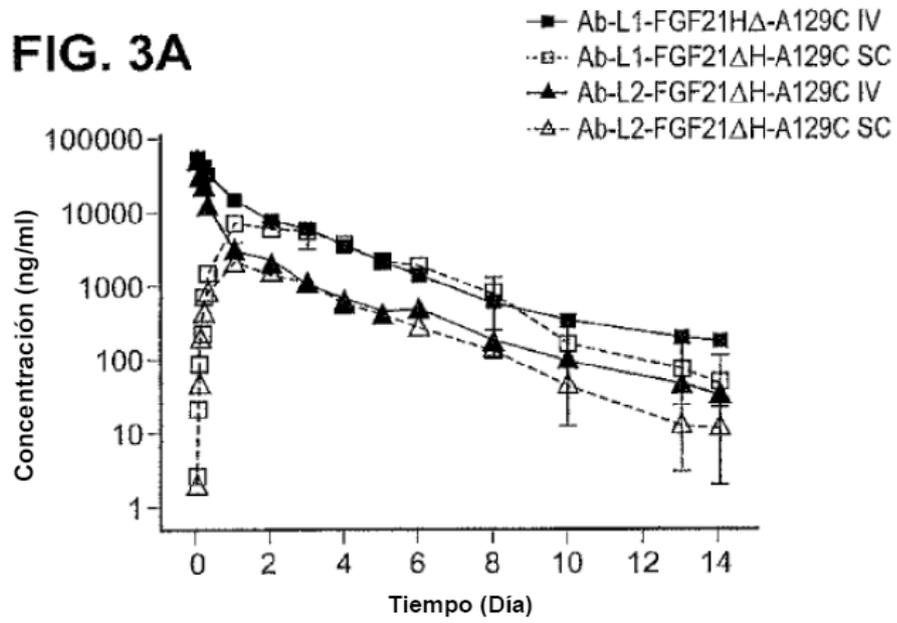
aproximadamente 1 M a aproximadamente 0,33 M de NaCl y la concentración de sal disminuye entre aproximadamente 90 mM y 100 mM por 1 VC.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa (iv), el gradiente de sal lineal comprende al menos aproximadamente 4 VC.
- 5 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el lavado en meseta de sal de la etapa (v) comprende aproximadamente 5 VC de aproximadamente 0,33 M de NaCl en aproximadamente 20 mM de fosfato de sodio a aproximadamente pH 7.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón base de la etapa (vi) comprende aproximadamente 2 VC de fosfato de sodio 20 mM a aproximadamente pH 7.
- 10 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón de elución de la etapa (vii) comprende fosfato de sodio 20 mM a pH 7.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gradiente de concentración lineal de la etapa (vii) comprende un gradiente de concentración lineal de 1,6-hexanodiol que comienza a una concentración de entre aproximadamente 0 y aproximadamente 1 % de 1,6-hexanodiol y termina en un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 % o aproximadamente 16 % de 1,6-hexanodiol para aproximadamente 1 VC.
- 15 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de elución adicional comprende fosfato de sodio 20 mM a pH 7 y 1,6-hexanodiol a una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 % y aproximadamente 16 %, para aproximadamente 2 a aproximadamente 5 VC o hasta que se recoge la combinación de elución.
- 20

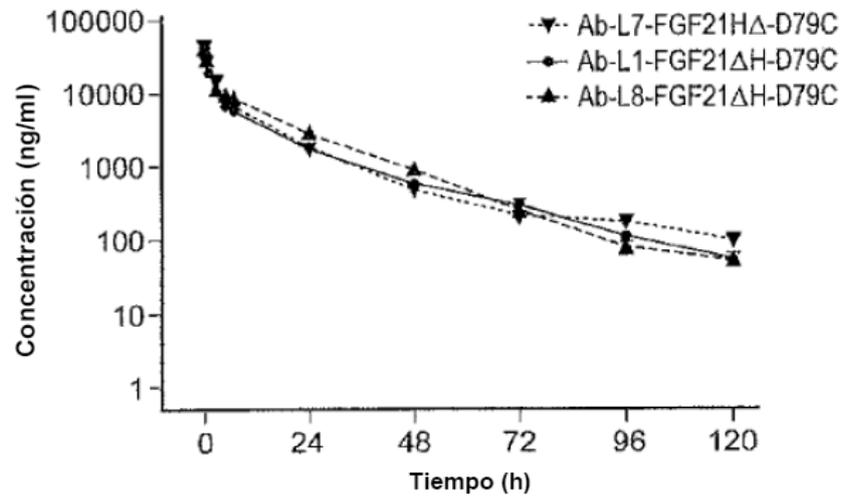




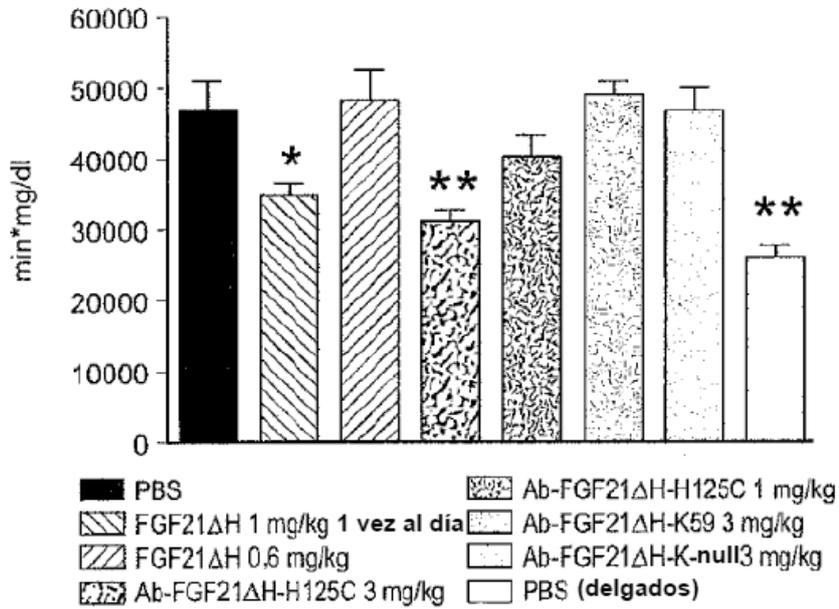
**FIG. 3A**



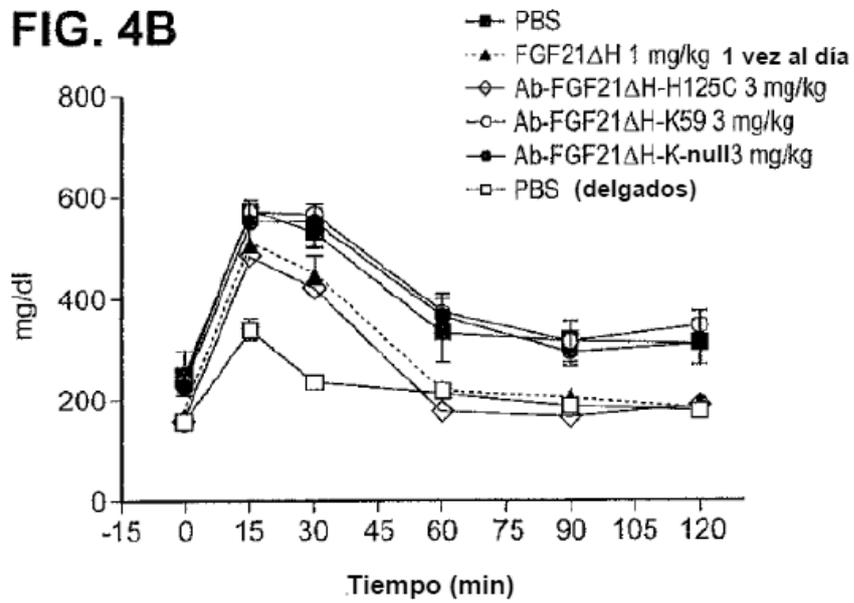
**FIG. 3B**



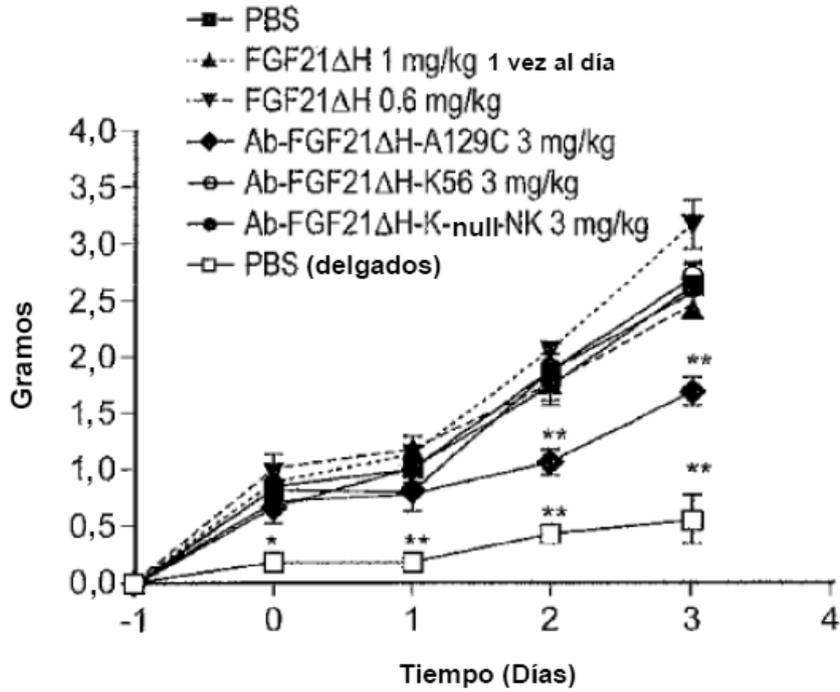
**FIG. 4A**



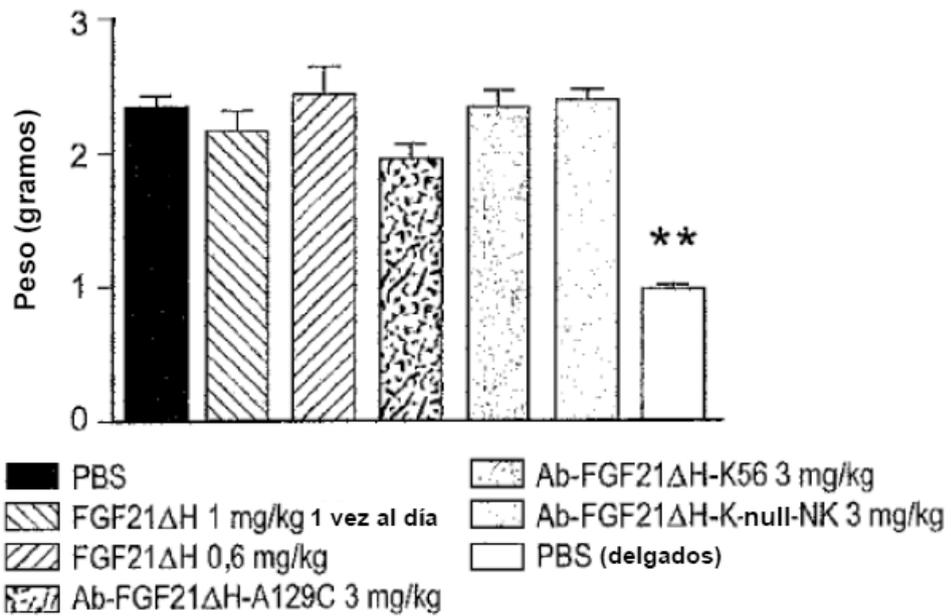
**FIG. 4B**



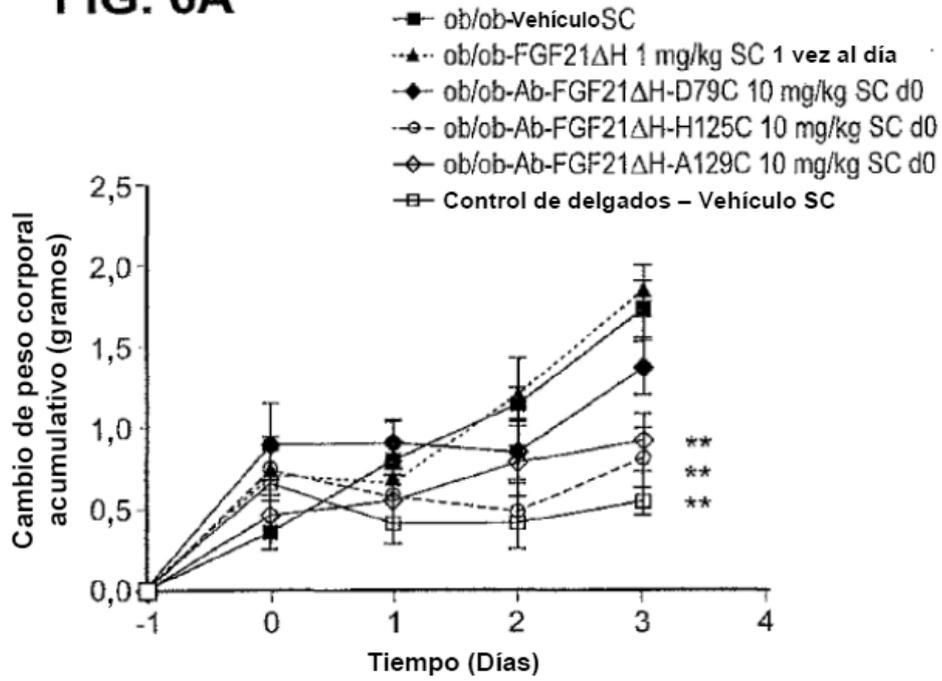
**FIG. 5A**



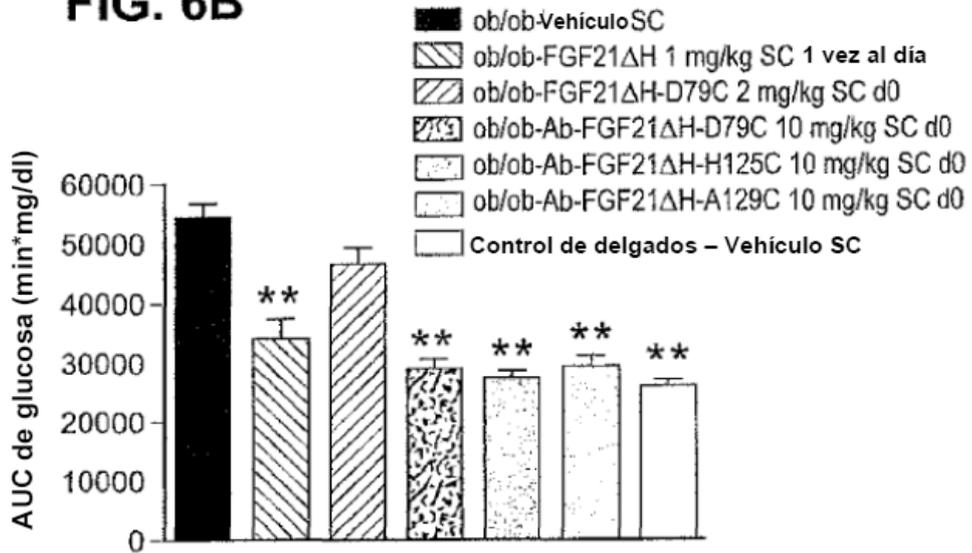
**FIG. 5B**



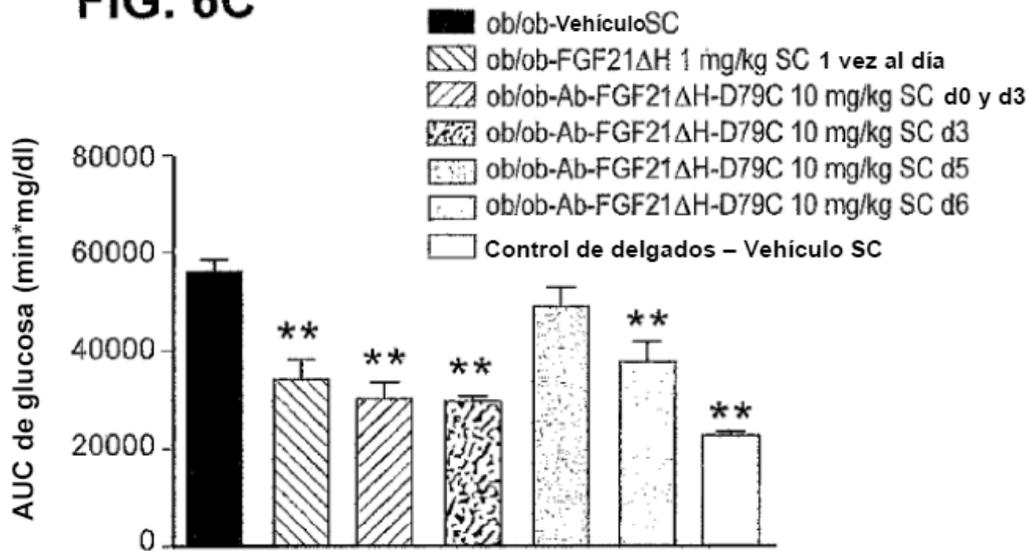
**FIG. 6A**



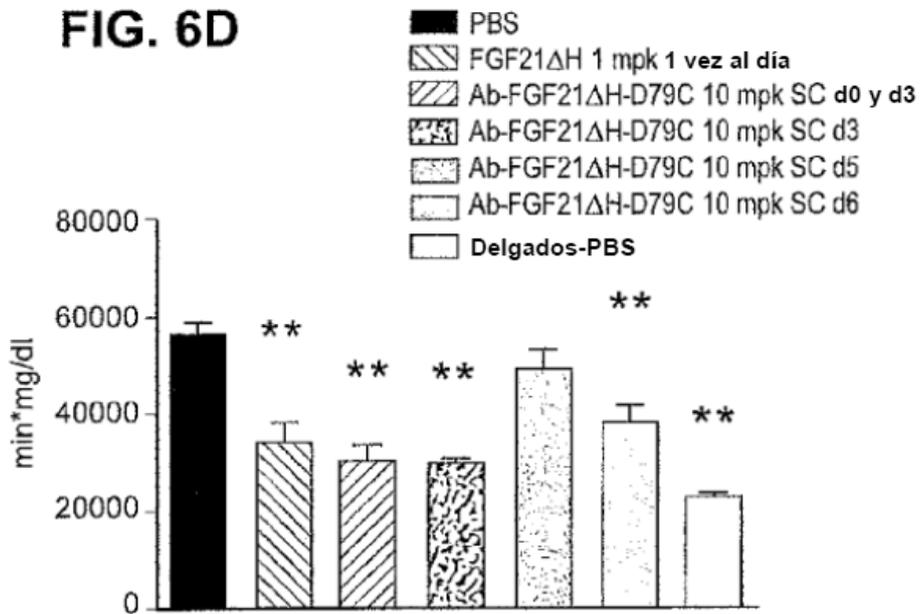
**FIG. 6B**

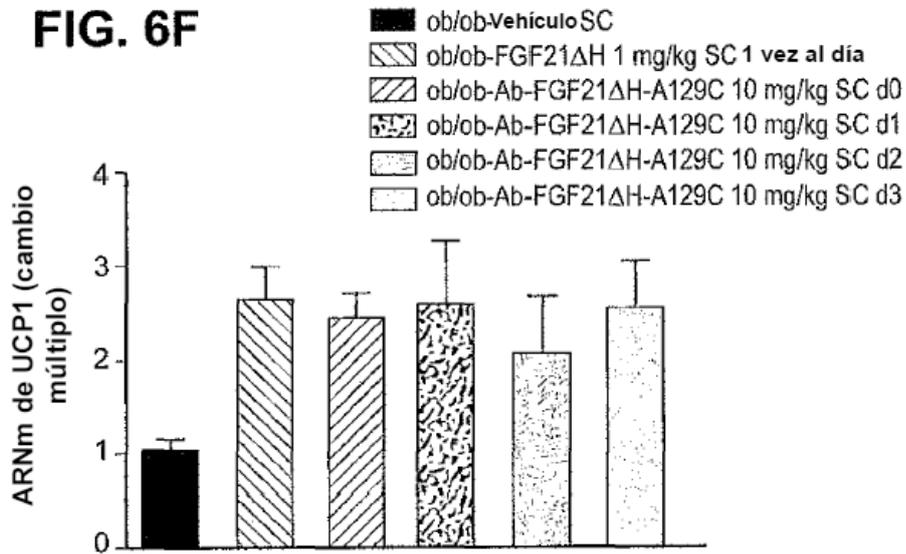
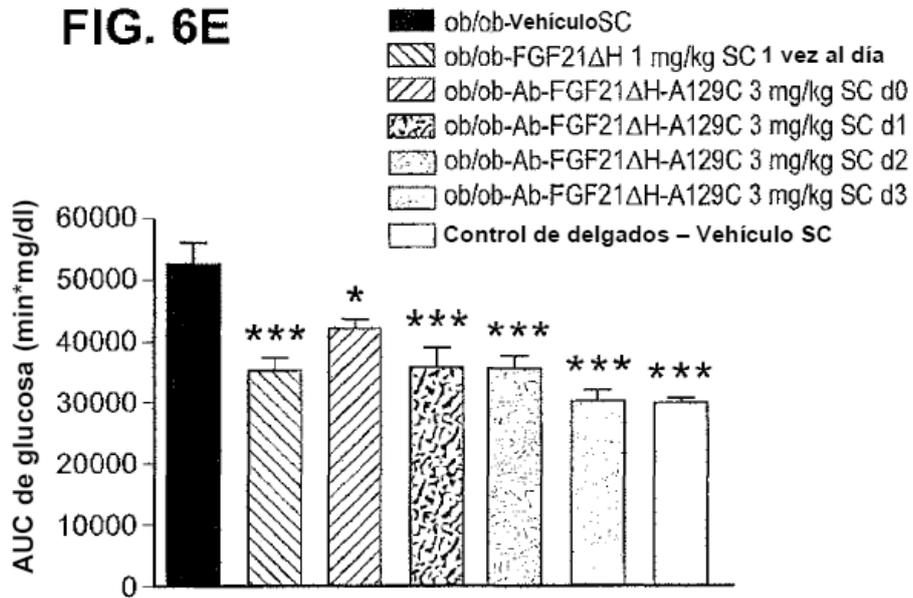


**FIG. 6C**

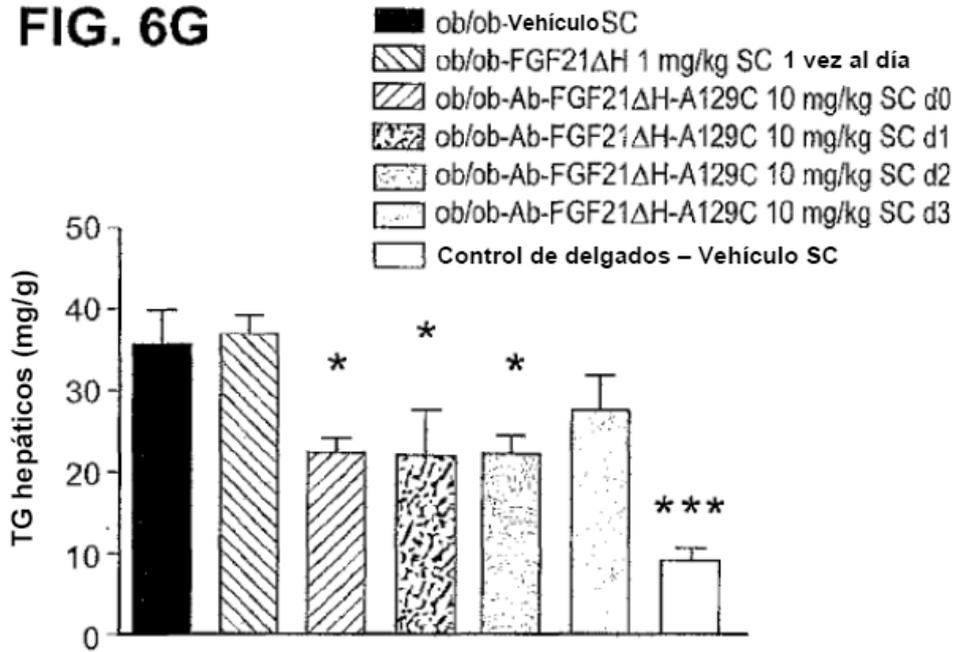


**FIG. 6D**

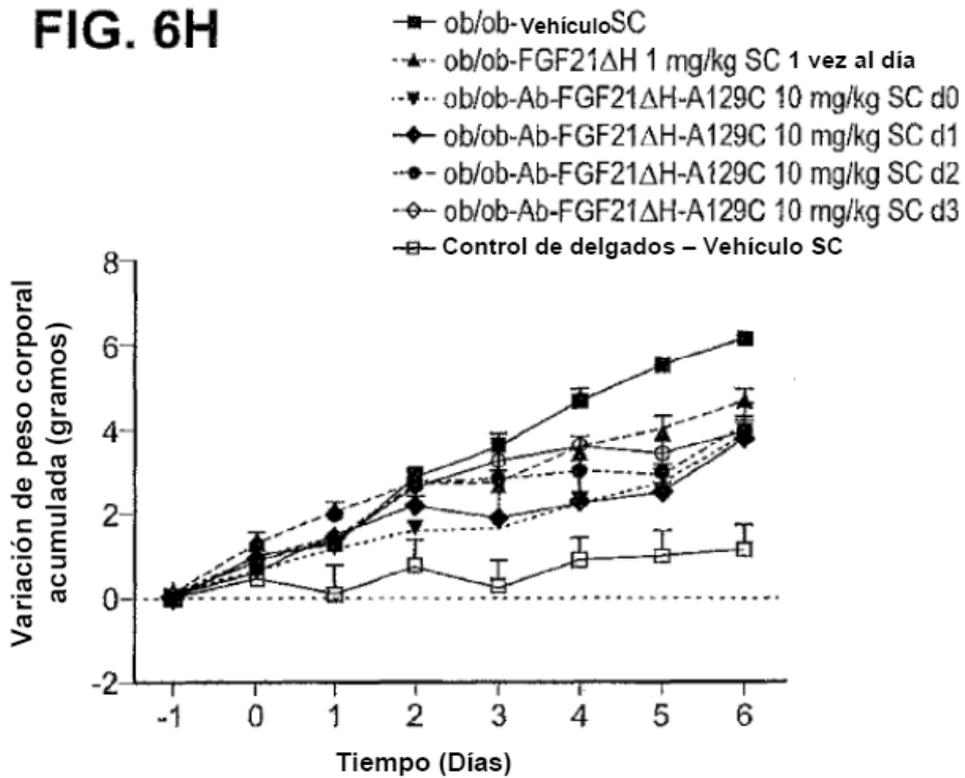


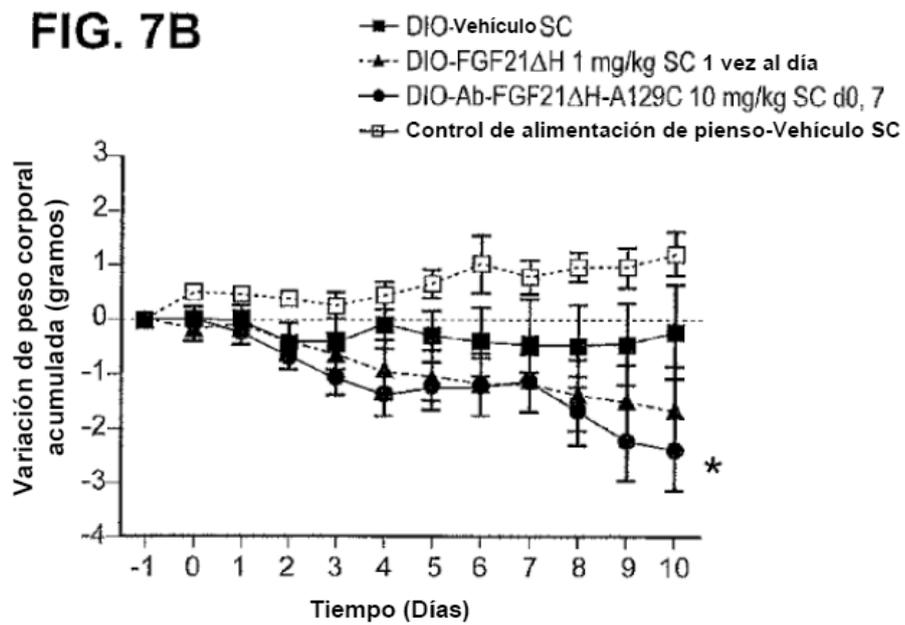
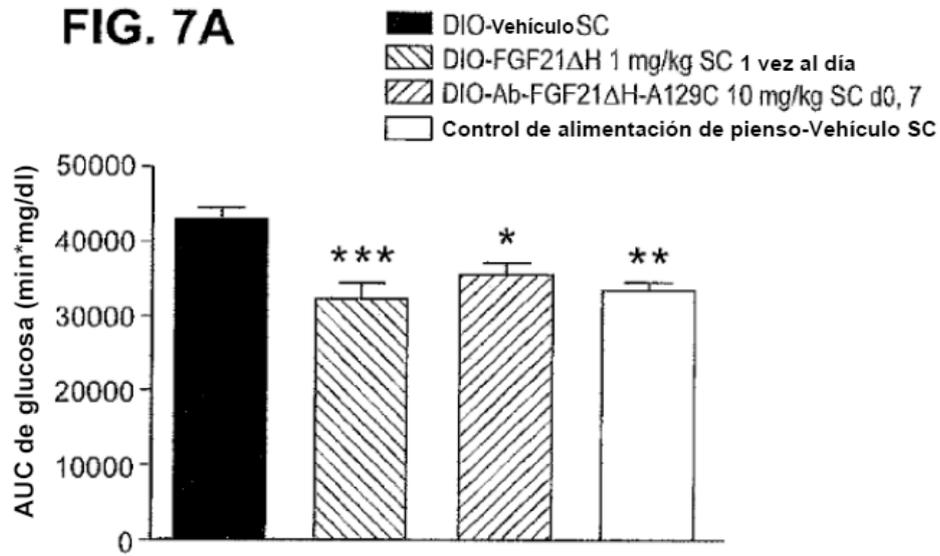


**FIG. 6G**

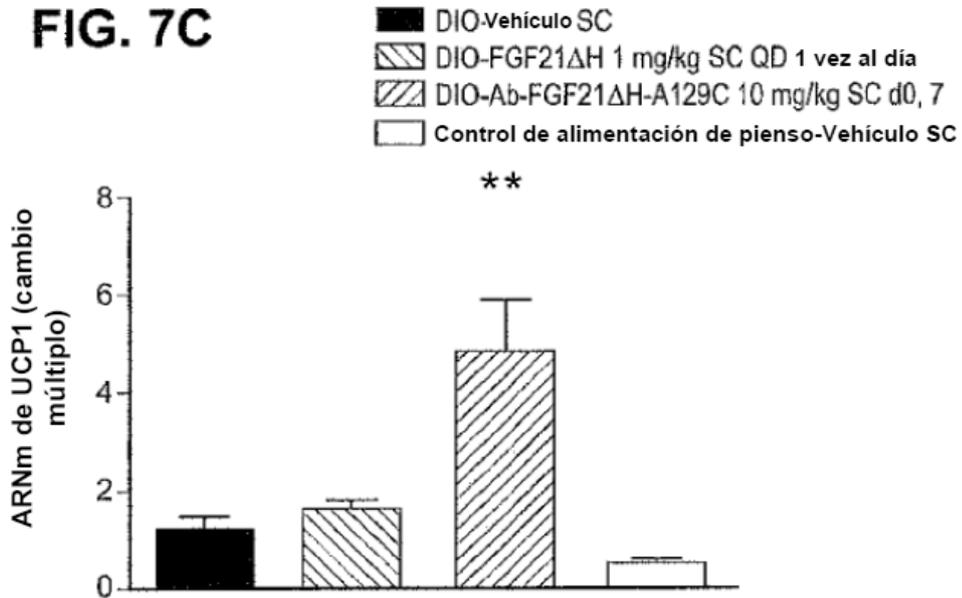


**FIG. 6H**

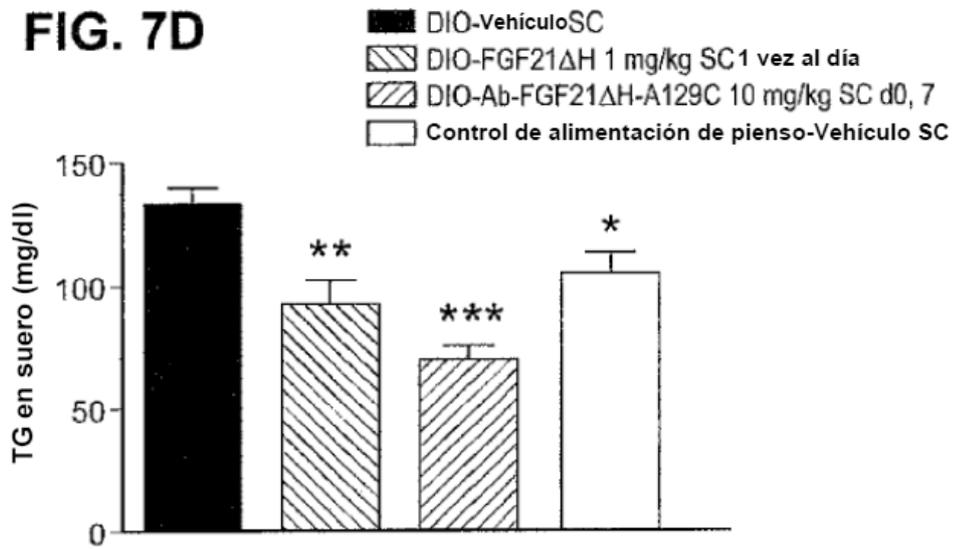




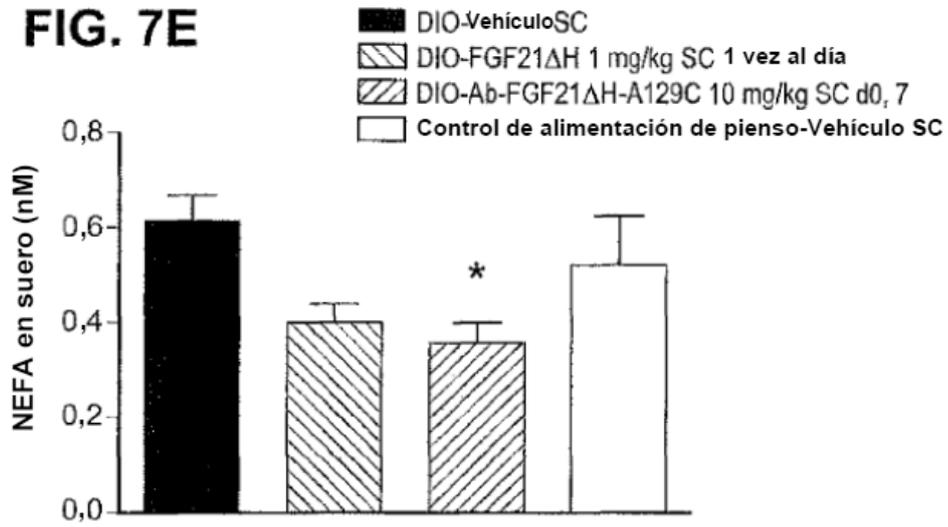
**FIG. 7C**



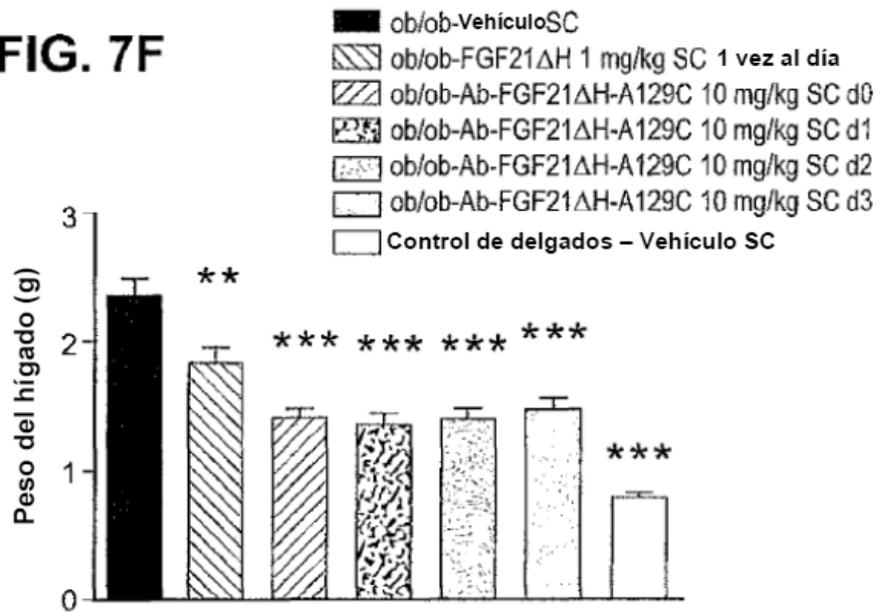
**FIG. 7D**



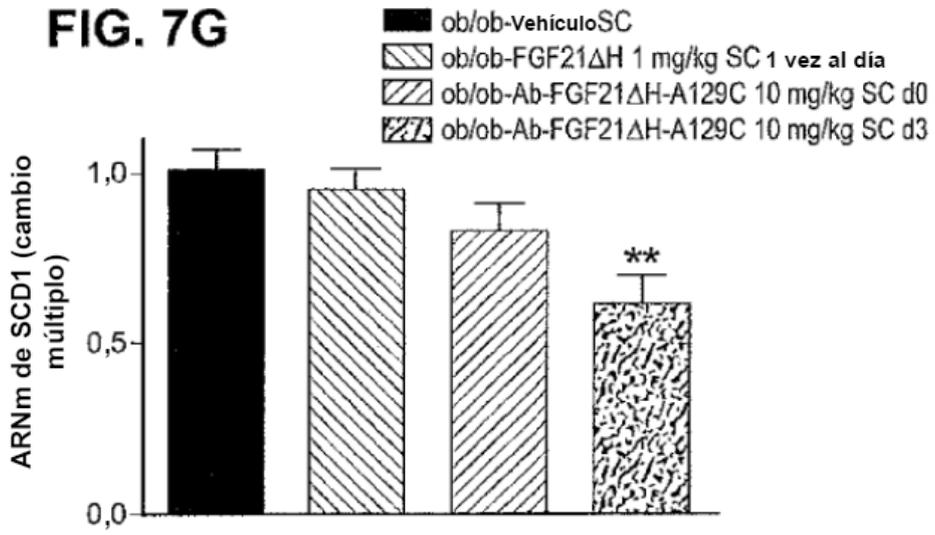
**FIG. 7E**



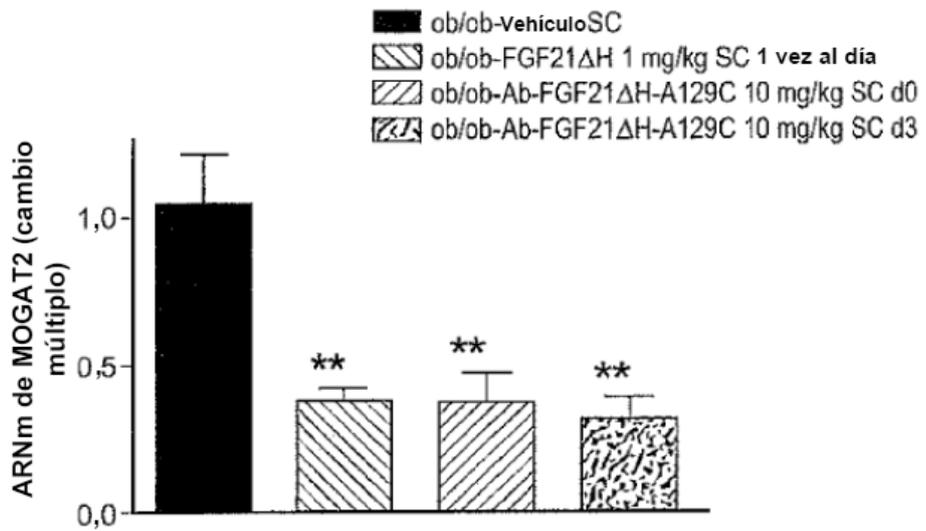
**FIG. 7F**



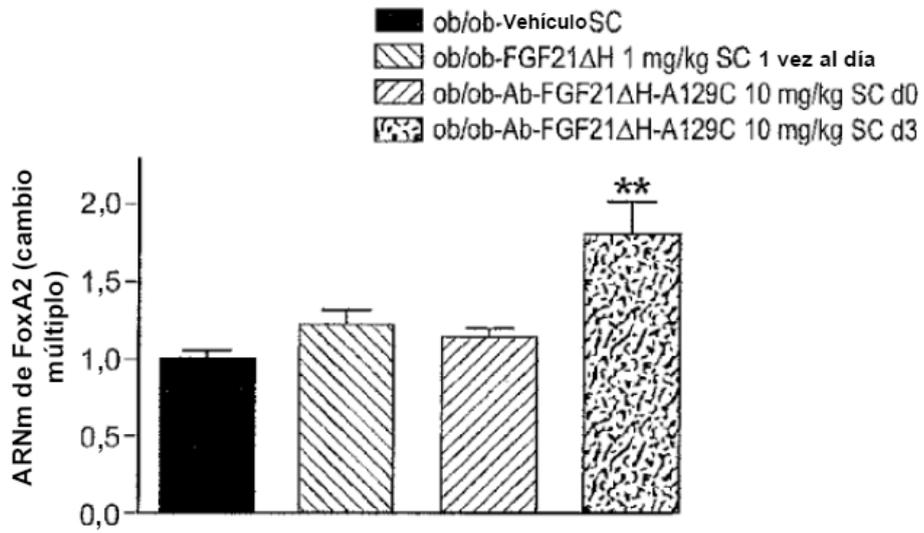
**FIG. 7G**



**FIG. 7H**



**FIG. 7I**



**FIG. 8**

