

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 385**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2012 PCT/US2012/037964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12158704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2012 E 12722058 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2710035**

54 Título: **Agonistas de FGFR1 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

16.05.2011 US 201161486731 P
20.09.2011 US 201161536936 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

SONODA, JUNICHIRO y
WU, YAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 628 385 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

Agonistas de FGFR1 y procedimientos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCÓN

La presente invención se refiere a agonistas de FGFR1 y a procedimientos de uso de los mismos.

10 ANTECEDENTES

10 La incapacidad de controlar los niveles de glucosa en sangre subyace a diversas afecciones metabólicas. La diabetes es un síndrome hiperglucémico que resulta de un defecto en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (diabetes de tipo 1 y de tipo 2) y de una menor eficacia de la insulina en la estimulación de la captación de glucosa en el músculo esquelético y en la restricción de la producción de glucosa hepática (diabetes de tipo 2). La diabetes es una enfermedad altamente frecuente y, aunque hay opciones terapéuticas disponibles para algunos diabéticos, existe una urgente necesidad de tratamientos adicionales.

15 El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es un miembro de la subfamilia de los FGF endocrinos, que incluye FGF19 y FGF23, y se ha identificado como un posible agente modificador de la enfermedad para revertir la obesidad y la esteatosis hepática inducida por obesidad y la hiperglucemia (véase, por ejemplo, Kharitononkov y Larsen, *Trends Endocrinol. Metab.* 22(3):81-6 (2011); Kharitononkov et al., *J. Clin. Invest.* 115: 1627-35 (2005); documento WO 2010/042747). La proteína endocrina FGF21 se une a tres receptores de FGF (FGFR 1-3) y mejora la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2 por estos receptores, junto con su correceptor unido a membrana beta-Klotho. Sin embargo, su desarrollo se ha visto obstaculizado por su mala farmacocinética y la escasa comprensión del mecanismo biológico de acción. También se han propuesto anticuerpos antagonistas anti-FGFR1 para el tratamiento de la diabetes (documento WO 2005/037235). Sin embargo, no se ha descubierto cuál de los tres FGFR media la actividad metabólica beneficiosa de FGF21.

20 El documento WO 2005/066211 se refiere a anticuerpos agonistas y antagonistas dirigidos contra FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 para intervenciones terapéuticas.

El documento WO 2001/004160 describe anticuerpos anti-idiotípicos de la unión del FGF a FGFR1 que tienen actividad agonista.

25 Sun et al., *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, Vol. 292, n.º 3: E964-E976 (2007) describe el uso de anticuerpos antagonistas de FGFR1 para reducir la ingesta de alimentos y provocar pérdida de peso.

30 SUMARIO

La materia de la invención se define por las reivindicaciones.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la activación del FGFR1 mejora la diabetes. La invención proporciona anticuerpos anti-FGFR1 agonistas y procedimientos de uso de los mismos.

35 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección metabólica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agonista anti-receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1), en el que la enfermedad metabólica se selecciona del grupo que consiste en: el síndrome del ovario poliquístico (SOP), el síndrome metabólico (SM), la obesidad, la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la hiperlipidemia, la hipertensión, la diabetes de tipo 2, la diabetes no de tipo 2, la diabetes de tipo 1, la diabetes autoinmune latente (DAL) y la diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY por sus siglas en inglés). En algunos modos de realización, el agonista de FGFR1 no activa FGFR2 o FGFR3. El agonista de FGFR1 es un anticuerpo anti-FGFR1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-FGFR1 tiene dos sitios de unión a FGFR1, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento F(ab')₂. En algunos modos de realización, el anticuerpo se une al péptido n.º 26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) o al péptido n.º 28 FKPDHRIGGYKVRVY (SEQ ID NO: 29). En algunos modos de realización, el anticuerpo se une tanto al péptido n.º 26 como al péptido n.º 28. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-FGFR1 se une tanto a FGFR1b como a FGFR1c. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico también se une a beta-Klotho.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a FGFR1, en el que el anticuerpo es un agonista de la actividad del FGFR1. En algunos modos de realización, el anticuerpo no es un agonista de FGFR2 o de FGFR3. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que

- consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20), (b) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23) y (c) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en X1X2IX3PX4DGX5TX6YADSVKG, en la que X1 es A o G, X2 es D o E, X3 es D o Y, X4 es N o Y, X5 es A o D y X6 es D o Y (SEQ ID NO: 24) y X1IX2PX3DGX4TX5YADSVKG, en la que X1 es D o E, X2 es D o Y, X3 es N o Y, X4 es A o D y X5 es D o Y (SEQ ID NO: 25). En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFX1X2X3X4IX5, en la que X1 es S o T, X2 es N o S, X3 es N o T, X4 es W o Y, X5 es H o S (SEQ ID NO: 26), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en X1X2IX3PX4DGX5TX6YADSVKG, en la que X1 es A o G, X2 es D o E, X3 es D o Y, X4 es N o Y, X5 es A o D y X6 es D o Y (SEQ ID NO: 24) y X1IX2PX3DGX4TX5YADSVKG, en la que X1 es D o E, X2 es D o Y, X3 es N o Y, X4 es A o D y X5 es D o Y (SEQ ID NO: 25) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20). En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSTWIS (SEQ ID NO: 7), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GEIDPYDGDYADSVKG (SEQ ID NO: 10) y EIDPYDGDYADSVKG (SEQ ID NO: 11) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16) y SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17). En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSNNYIH (SEQ ID NO: 8), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ADIYPNDGDDYADSVKG (SEQ ID NO: 12) y DIYPNDGDDYADSVKG (SEQ ID NO: 13) y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos EHFDWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18). En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSNWIS (SEQ ID NO: 9), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AEIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 14) y EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 15) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20). En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende además (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 21), (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 22) y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23). En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende una secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 3 y 4. En algunos modos de realización, el anticuerpo comprende una secuencia VL de la SEQ ID NO: 6.
- 35 En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-FGFR1 tiene dos sitios de unión a FGFR1, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento F(ab')₂. En algunos modos de realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo multiespecífico. En algunos modos de realización, el anticuerpo también se une a beta-Klotho. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos modos de realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención. En algunos modos de realización, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico. En algunos modos de realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de modo que se produzca el anticuerpo. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.
- 45 En algunos modos de realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En algunos modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso como medicamento. En algunos modos de realización, el anticuerpo de la invención es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección metabólica seleccionada del grupo que consiste en: el síndrome del ovario poliquístico (SOP), el síndrome metabólico (SM), la obesidad, la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la hiperlipidemia, la hipertensión, la diabetes de tipo 2, la diabetes no de tipo 2, la diabetes de tipo 1, la diabetes autoinmune latente (DAL) y la diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY). En algunos modos de realización, el anticuerpo de la invención es para su uso en la sensibilización de un sujeto a la insulina.
- 55 En algunos modos de realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento. En algunos modos de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o afección metabólica seleccionada del grupo que consiste en: el síndrome del ovario poliquístico (SOP), el síndrome metabólico (SM), la obesidad, la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la hiperlipidemia, la hipertensión, la diabetes de tipo 2, la diabetes no de tipo 2, la diabetes de tipo 1, la diabetes autoinmune latente (DAL) y la diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY). En algunos modos de realización, el medicamento es para la sensibilización de un sujeto a la insulina.
- 65 En algunos modos de realización, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento de la diabetes en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. En algunos modos

de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto otro agente para tratar la diabetes, siempre que el otro agente no sea insulina. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto un agente para tratar enfermedades cardiovasculares.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A muestra un ELISA que mide la unión de los anticuerpos anti-FGFR1 a fragmentos ECD de FGFR purificados.

10 La figura 1B muestra las constantes de unión por resonancia de plasmón superficial para R1Mab1 y R1Mab2.

La figura 1C muestra un ensayo de luciferasa de GAL-Elk1 en células L6 de rata. Las células se cotransfectaron con un vector de expresión para la isoforma de FGFR indicada junto con GAL-Elk1, SV40-luciferasa de Renilla e indicador de luciferasa de luciérnaga sensible a Gal. Las células transfectadas se incubaron con medio que contenía concentraciones crecientes de R1Mab o FGF ácido (aFGF: control positivo) durante 6 horas antes de los ensayos de luciferasa. La activación transcripcional se evaluó por la actividad de luciferasa de luciérnaga relativa normalizada para la actividad de luciferasa de Renilla y se expresó como unidades relativas de luciferasa (URL).

20 La figura 1D muestra un experimento similar al 1C excepto porque las células L6 expresaban tanto FGFR1c como KLB.

La figura 1E muestra un experimento similar al 1C excepto porque se usaron células HEK293.

25 La figura 1F muestra el análisis por Western blot de adipocitos 3T3-L1 tratados con la proteína indicada a 0,5 µg/ml durante el tiempo indicado.

La figura 1G muestra WAT recogido de ratones C57BL/6 sin grasa en el momento indicado después de la inyección i.p. a 1 mpk de R1Mab (+) o IgG de control (-) y sometido a análisis por Western blot.

30 La figura 2A muestra el nivel de glucosa en sangre (a la izquierda) y el peso corporal (a la derecha) de ratones db/db después de una única inyección i.p. (flecha) de R1Mab1 o IgG de control a las dosis indicadas. Se observó significación estadística en la glucosa (frente a la IgG de control) entre los días 1 y 30 para todos los grupos y en el peso (frente a la IgG de control) en el día 8 para todos los grupos y entre los días 12 y 18 para el grupo de 50 mpk. N = 6~14, *p < 0,05, **p < 0,01.

35 La figura 2B muestra el nivel de glucosa en sangre en ratones alimentados al azar y en ayunas durante la noche (parte superior) y los niveles de insulina en suero después de ayuno durante la noche y 30 minutos después de la inyección i.p. de 1 g/kg de glucosa (parte inferior). N = 6~14, *p < 0,05, ***p < 0,01.

40 La figura 2C muestra el nivel de glucosa en sangre (a la izquierda) y el peso corporal (a la derecha) de ratones Ins2Akita después de una única inyección i.p. de R1Mab1 o IgG de control a 3 mpk. N = 10. *p < 0,01.

45 La figura 2D muestra la ingesta de alimentos (a la izquierda), el nivel de glucosa en sangre (en el centro) y el peso corporal (a la derecha) de ratones db/db después de una única inyección i.p. de R1Mab1 o IgG de control a dosis de 1 mpk. PF: alimentados en paralelo al grupo tratado con R1Mab. N = 7. #p < 0,001 (frente a IgG), *p < 0,001 (frente a PF-IgG).

50 La figura 2E muestra la cuantificación de área positiva a la insulina en secciones pancreáticas fijadas. Los tejidos se recogieron en el día 7 después de la inyección i.p. única de 3 mpk (a la izquierda) o 1 mpk (a la derecha) de R1Mab1 y se tiñeron para la insulina y el glucagón. N = 4~7. **p < 0,002. ***p < 0,001.

55 La figura 3A muestra la activación de la señalización de MAPK en tejidos de ratón. Los tejidos indicados se recogieron a los 15 minutos (25 µg/FGF21 de ratón: parte superior) o 1 hora (1 mpk de R1Mab1: parte inferior) después de la inyección i.p. a los ratones C57BL/6 sin grasa y se sometieron a análisis por Western blot. Se usó PBS (parte superior) e IgG de control (parte inferior) como control negativo.

60 Las figuras 3B-D muestran la tinción representativa con H y E del hígado (B), los lípidos hepáticos (C) y los lípidos en suero (D). Las muestras se recogieron en el día 7 después de la inyección i.p. única de 1 mpk de R1Mab1. Los ratones de control se alimentaron en paralelo para normalizar el peso corporal. N = 7, *p < 0,05, **p < 0,001.

65 La figura 3E muestra los parámetros metabólicos de ratones ob/ob o ap2-SREBP1c (srebp) transgénicos a los que se les inyectó 1 mpk de Ab. Los grupos de control se alimentaron en paralelo para normalizar el peso corporal (figura S7). El nivel de glucosa e insulina para el cálculo de HOMA-IR se midió en el día 3 después de 3 horas de ayuno. La PTG se llevó a cabo con inyección i.p. de glucosa a 1 g/kg en el día 4 después de ayuno durante la noche. El peso del tejido se midió en el día 5. N = 7, *p < 0,05, ***p < 0,01.

La figura 3F muestra los parámetros metabólicos de ratones ap2-SREBP a los que se les implantó por vía subcutánea una bomba osmótica para infundir FGF21 (12 ng/día). La PTI con inyección i.p. de insulina a 1 U/kg se llevó a cabo en el día 4. El suero se recogió en el día 6. N = 6~8.

5 La figura 4A muestra la expresión de ARNm (rojo: mayor expresión y azul: menor expresión) en BAT para los genes que pertenecen a la ruta de KEGG indicada. Las muestras se recogieron en el día 4 después de la inyección i.p. única de 1 mpk de R1Mab1 o de ratones alimentados en paralelo a los que se les inyectó IgG de control.

La figura 4B muestra la expresión de ARNm en BAT por qPCR. N = 6, *p < 0,05, **p < 0,001.

10 La figura 4C muestra un ensayo de luciferasa en células HEK293. El gráfico muestra que tanto FGF21 como R1Mab1 inducen la transcripción de un gen indicador de luciferasa dirigido por UAS en células HEK293 a través de CREB fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4 (GAL-CREB) (los dos paneles de la izquierda) o de un gen indicador de luciferasa dirigido por CRE (los dos paneles de la derecha), de una manera dependiente de la dosis. 15 Algunas células también se cotransfectaron para expresar FGFR1c y KLB (rojo; curva superior en los gráficos). Los resultados representan el promedio de los experimentos por triplicado para la actividad de luciferasa normalizada para la actividad de Renilla.

La figura 4D muestra WAT recogido 15 minutos después de inyección i.v. con 25 µg de FGF21 (+) o PBS (-) y sometido a análisis por Western blot.

La figura 4E muestra el análisis por Western blot de adipocitos humanos primarios diferenciados tratados con FGF21 a 1 µg/ml durante 30 minutos.

25 La figura 4F muestra un modelo para la ruta de señalización a través de la que FGF21 y R1Mab activan el programa de PGC-1alfa en los tejidos adiposos.

La figura 5 muestra la actividad agonista independiente de heparina y dependiente de FGFR1 de R1Mab1. Ensayo de luciferasa de GAL-Elk1 en células HEK293. Las células se cotransfectaron con o sin un vector de expresión para FGFR1c como se indica, junto con GAL-Elk1, SV40-luciferasa de Renilla e indicador de luciferasa de luciérnaga sensible a Gal. Las células transfectadas se incubaron en medio que contenía concentraciones crecientes de R1Mab1 con o sin 25 mg/l de heparina porcina como se indica durante 6 horas antes de los ensayos de luciferasa. La activación transcripcional se evaluó por la actividad de luciferasa de luciérnaga relativa normalizada para la actividad de luciferasa de Renilla y se expresó como unidades relativas de luciferasa (URL).

35 La figura 6A muestra la ingesta de alimentos (a la izquierda), el peso corporal (en el centro) y el nivel de glucosa en sangre (a la derecha) de ratones db/db después de una única inyección i.p. de R1Mab2 o IgG de control a dosis de 3 mpk en el día 0. Los ratones de control se alimentaron en paralelo (PF) para ajustar la ingesta de alimentos hasta el día 11. En el día 11, la ingesta de alimentos de los ratones tratados con R1Mab2 volvió a la normalidad y, por tanto, todos los ratones se alimentaron a demanda después del día 11 (AL). N = 7~12. p < 0,001.

La figura 6B muestra el nivel de glucosa en sangre de los ratones alimentados al azar usados en la figura S2A en el día 26.

45 La figura 6C muestra la PTG llevada a cabo usando los mismos ratones en el día 28.

La figura 6D muestra la PTI llevada a cabo usando los mismos ratones en el día 37.

La figura 7A muestra el nivel de glucosa en sangre (a la izquierda) y el peso corporal (a la derecha) de ratones ob/ob después de una única inyección i.p. de R1Mab1 o IgG de control a dosis de 1 mpk en el día 0. Los ratones de control se alimentaron en paralelo (PF) al grupo tratado con R1Mab. N = 7. *p < 0,05 (frente a PF-IgG).

La figura 7B muestra el nivel de glucosa en sangre (a la izquierda) y el peso corporal (a la derecha) de ratones C57BL/6 alimentados con HFD después de única inyección i.p. de R1Mab1 o IgG de control a 1 mpk en el día 0. N = 7~9. *p < 0,05.

La figura 7C muestra la PTG llevada a cabo en ratones alimentados con HFD usados en S3B en el día 8 después de la inyección de Ab. Lo ratones recibieron la inyección i.p. de 1 g/kg de glucosa después de ayuno durante la noche. Las medias de los pesos corporales fueron 28,6 +/- 0,6 (R1Mab1) y 32,1 +/- 0,8 (IgG de control) (p < 0,01). N = 7.

La figura 7D muestra el nivel de glucosa en sangre (a la izquierda) y el peso corporal (a la derecha) de ratones Ins2Akita en el día 5 después de la inyección i.p. única de R1Mab1 o IgG de control a 1 mpk. Los ratones de control se alimentaron en paralelo (PF-IgG) para normalizar el peso corporal. *p < 0,05.

65 La figura 8A muestra la tinción representativa de los islotes de Langerhans de los ratones db/db analizados en la figura 4E. Rojo: insulina, verde: glucagón, azul: núcleos. Debe observarse que R1Mab no afectó a la morfología

general de los islotes.

La figura 8B muestra la distribución del área positiva a la insulina (%) en cada islote de cada animal.

5 La figura 9A muestra una representación esquemática de la IgG y la IgG de un brazo (OA). Azul: cadena pesada, verde: cadena ligera. El asterisco rojo indica la posición aproximada de los restos mutados en el mutante DANA.

La figura 9B muestra un ensayo de luciferasa basado en GAL-Elk en células HEK293 que expresan FGFR1c para comparar R1MAb2 y el mutante de ADN de R1MAb2 (R1MAb2 DANA).

10 La figura 9C muestra el nivel de glucosa en sangre de ratones db/db antes (pre) y el día 7 después de la inyección i.p. del Ab indicado a 1 mpk. Los ratones de control se alimentaron en paralelo para normalizar el peso corporal.

15 La figura 9D muestra un ELISA que mide la unión del anticuerpo a fragmentos ECD de FGFR purificados. OA-R1MAb1: versión OA de R1MAb1.

La figura 9E muestra un ensayo de luciferasa basado en GAL-Elk similar a S5B.

20 La figura 9F muestra el análisis por Western blot de adipocitos 3T3-L1 tratados con la proteína indicada a 0,5 µg/ml durante el tiempo indicado.

25 La figura 9G muestra el nivel de glucosa en sangre (a la izquierda) y el peso corporal (a la derecha) de ratones db/db después de una única inyección i.p. del Ab indicado en el día 0 (flecha). N = 7. *p < 0,05 (IgG de control frente a 3 mpk de R1MAb1), **p < 0,0005 (IgG de control frente a 3 mpk de R1MAb1 e IgG de control frente a 1 mpk de R1MAb1).

La figura 9H muestra los lípidos hepáticos y séricos de muestras recogidas en el día 7 después de la inyección del Ab. N = 7. *p < 0,05, **p < 0,0005 (frente a la IgG de control).

30 La figura 10 muestra la expresión de ARNm de KLB y las isoformas de FGFR en el hígado y el WAT. Los ratones C57BL/6 alimentados con pienso y alimentados con HFD tenían 25 semanas de edad. Los ratones alimentados con HFD estuvieron con HFD durante 21 semanas. *p < 0,05 o **p < 0,001. N = 6.

35 La figura 11 muestra los requisitos para la función adiposa normal para la actividad de FGF21 y R1MAb. La ingesta de alimentos (a la izquierda), el nivel de glucosa en sangre (en el centro) y el peso corporal (a la derecha) de ratones ob/ob o ap2-srebp1c transgénicos después de una única inyección i.p. de R1Mab1 o IgG de control a dosis de 1 mpk en el día 0. Los mismos ratones descritos en la figura 3E. N = 7. #p < 0,001 (frente a IgG), *p < 0,001 (frente a PF-IgG). La medición posterior al tratamiento se hizo en el 1 día después de la inyección.

40 La figura 12A muestra un ensayo de luciferasa basado en células en HEK293. Las células se cotransfectaron con un vector de expresión para una de las proteínas de fusión con GAL indicadas, SV40-luciferasa de Renilla e indicador de luciferasa sensible a GAL. Algunas células también se cotransfectaron con el vector de expresión para KLB como se indica. Las células transfectadas se incubaron con medio que contenía medio acondicionado de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para FGF21 o vector vacío de control como se indica. Después de 6 horas de incubación, las células se sometieron a ensayos de luciferasa. La activación transcripcional se evaluó por la actividad de luciferasa de luciérnaga relativa normalizada para la actividad de luciferasa de Renilla y se expresó como inducción factorial.

50 La figura 12B muestra un ensayo de luciferasa similar en el que algunas células se cotrataron con el siguiente ligando de receptor nuclear: Wy14643 (PPARα) 1 mM, GW101516 (PPARβ) 5 nM, rosiglitazona (PPARγ) 50 nM, T0901317 (LXRα) 50 nM, T3 (TRβ) 5 nM, CDCA (FXR) 30 mM. Debe observarse que el FGF21 no afectaba a la actividad de ninguno de los receptores nucleares sometidos a prueba en esta ocasión con o sin tratamiento con ligando afín.

55 La figura 12C muestra el análisis por Western blot de células HEK293 tratadas con FGF21 a 5 µg/ml durante 10 minutos. Algunas células se pretrataron con un inhibidor de FGFR (PD173074 100 nM), mTOR (rapamicina 100 nM) MEK1/2 (U0126 10 µM), PI3K (wortmanina 1 µM) como se indica.

La figura 12D muestra los genes corriente abajo que participan en el metabolismo oxidativo en tejidos adiposos.

60 La figura 13 muestra el nivel de glucosa en sangre (parte superior) y el peso corporal (parte inferior) de ratones db/db después de una única inyección i.p. de R1MAb2 (marcado como 182.2), R1MAb3 (marcado como 182.5) o IgG de control (anti-Her2) a las dosis indicadas. N = 6, *p < 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,0005. El R1MAb3 comprende VH que comprende la SEQ ID NO: 6 y VH que comprende la SEQ ID NO: 4.

65 La figura 14A muestra la ingesta acumulativa de alimentos, el nivel de glucosa en sangre y el cambio del peso

corporal de ratones C57BL/6 sin grasa después de una única inyección intraperitoneal de R1MAb1 o IgG de control a 0,5 mpk. A los ratones también se les implantó por vía subcutánea una minibomba osmótica en el día 0 para infundir de forma continua (i.c.) FGF21 recombinante a 1,2 mpk/día o vehículo (PBS) como control. En el día 3, los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche para llevar a cabo la prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) en el día 4 (flecha).

La figura 14B muestra las pruebas de tolerancia a la glucosa llevadas a cabo con 2 g/kg de glucosa inyectada por vía intraperitoneal en el día 4 después de ayuno durante la noche.

La figura 14C muestra el análisis serológico de los ratones mostrados en las figuras 2C, S10A y S10B. Las muestras de suero se recogieron en el día 5 después de 4 h de ayuno. Los datos representan la media \pm EEM con n = 6 ratones por grupo; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 frente a PBS (i.c.) + IgG de control, por la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes (n.s. = no significativo).

La figura 15 muestra el análisis de la expresión génica usando ARNm aislado de tejido hepático de los ratones usados en las figuras 2C y S10. Las muestras de tejido se aislaron en el día 5 después de 4 h de ayuno. Los datos representan la media \pm EEM con n = 6 ratones por grupo; *p < 0,05, ***p < 0,001 frente a PBS (i.c.) + IgG de control, por la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes (n.s. = no significativo).

La figura 16 muestra el análisis de la expresión génica usando ARNm aislado de tejido adiposo pardo de los ratones usados en las figuras 2C, S10 y S11. Las muestras de tejido se aislaron en el día 5 después de 4 h de ayuno. Los datos representan la media \pm EEM con n = 6 ratones por grupo; *p < 0,05, ***p < 0,001 frente a PBS (i.c.) + IgG de control, por la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes (n.s. = no significativo).

La figura 17A muestra los resultados del ELISA que mide la unión del anticuerpo a fragmentos de péptidos biotinilados.

La figura 17B muestra las secuencias de aminoácidos de FGFR1 (aminoácidos 161-212; SEQ ID NO: 27), las secuencias de aminoácidos del péptido n.º 26 (SEQ ID NO: 28) y el péptido n.º 28 (SEQ ID NO: 29), junto con los aminoácidos correspondientes al péptido n.º 26 de FGFR2 (SEQ ID NO: 30), FGFR3 (SEQ ID NO: 31) y FGFR4 (SEQ ID NO: 32) y los aminoácidos correspondientes al péptido n.º 28 de FGFR2 (SEQ ID NO: 33), FGFR3 (SEQ ID NO: 34) y FGFR4 (SEQ ID NO: 35). Las diferencias entre las secuencias del péptido n.º 26 y el péptido n.º 28 en FGFR1 y la región correspondiente de FGFR2-4 están en un recuadro.

La figura 17C muestra los resultados del ELISA que mide la unión de FGFR1 marcado con His a la proteína FGF2 en presencia de diversas concentraciones de R1MAb1 o IgG de control. Los datos se expresan como % de unión de FGFR1-His y representan las medias \pm EEM (n = 3).

La figura 17D muestra la unión de FGF21 yodado a células HEK293 que expresan de forma estable tanto KLB como FGFR1c en presencia de diversas concentraciones de R1MAb1 no marcado o FGF21 (la reacción también contenía BSA (10 mg/ml) e IgG de control (350 mM) para bloquear la unión no específica. Los datos se expresan como % de FGF21 unido del total de FGF21 radiomarcado en la reacción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Una "secuencia estructural humana aceptora" para los fines del presente documento es una secuencia estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una secuencia estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una secuencia estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una secuencia estructural de la inmunoglobulina humana o una secuencia estructural consenso humana, como se define a continuación. Una secuencia estructural humana aceptora "derivada de" una secuencia estructural de inmunoglobulina humana o una secuencia estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácido es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la secuencia estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia estructural consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y, en general, se puede representar por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión

se describen a continuación.

La expresión "anticuerpo agonista anti-FGFR1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a FGFR1 con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente en la activación de FGFR1. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-FGFR1 a una proteína no relacionada distinta de FGFR1, es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a FGFR1 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos modos de realización, un anticuerpo que se une a FGFR1 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos incluyendo, pero no limitadas a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

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

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , β , ϵ , γ y μ , respectivamente.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B) y la activación de linfocitos B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una parte de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia nativa y regiones variantes Fc. En un modo de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácido en la región Fc o la región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, también llamado el índice de la UE, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Región estructural" o "FR" se refiere a restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR, en general, aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido el ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula precursora, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula originalmente transformada también se incluye en el presente

documento.

Un "anticuerpo humano" es el que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente que no es humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno que no son humanos.

Un "secuencia estructural consenso humana" es una secuencia estructural que representa los restos de aminoácido que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de la inmunoglobulina humana. En general, la selección de las secuencias VL o VH de la inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo HI como en Kabat et al., *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácido de HVR no humanas y restos de aminoácido de FR humanas. En ciertos modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, al menos uno y típicamente dos, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR son las de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, restos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), siendo las últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento del antígeno. Los bucles hipervariables ejemplares se encuentran en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se encuentran en los restos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción de la CDR1 de la VH, las CDR, en general, comprenden los restos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR comprenden también "restos determinantes de especificidad", o "SDR", que son los restos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas, o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los restos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).) A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, los restos FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertos modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica hasta más de un 95 % o 99 % de pureza determinada, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una recapitulación de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen normalmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-FGFR1" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha molécula o moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y dicha molécula o moléculas

de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones de una célula huésped.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman parte de la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones que se producen de forma natural o que surgen durante la producción de un anticuerpo monoclonal, que son variantes, en general, que están presentes en cantidades pequeñas. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante de un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por diversas técnicas incluyendo, pero no limitadas al procedimiento de hibridomas, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de la inmunoglobulina humana; dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales se describen en el presente documento.

"Anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina que se producen de forma natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas con enlaces disulfuro. Desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Asimismo, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, tratamiento de combinación, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de una secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido de la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas formas que pertenecen a la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible al público, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 lo creó Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la oficina de propiedad intelectual de EE. UU., Washington DC, 20559, en la que se ha registrado con el n.º de registro de propiedad intelectual de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede recopilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe recopilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias los establece el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B (que, de forma alternativa, puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o que comprende un cierto porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de restos de aminoácido valorados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa

informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma para ser eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

La expresión "receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos o FGFR1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier FGFR1 nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión engloba el FGFR1 no procesado "de longitud completa", así como cualquier forma del FGFR1 que resulta del procesamiento en la célula. La expresión también engloba variantes naturales de FGFR1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos del FGFR1b y el FGFR2b humanos ejemplares, respectivamente, se muestra a continuación:

NTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKYRYATWSHMDSVV
PSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGNSNVEFMCKVYSDPQPPIQWLKHIEVNGSKI
GPDNLPYVQILKHSGINSSDAEVLTLFNVTEAQSGEYVCKVSNYIGEANQSAWLTVTRPVAKALEERPAMVMS (SEQ
ID NO: 1); y

NTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVV
PSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGNSNVEFMCKVYSDPQPPIQWLKHIEVNGSKI
GPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHSAWLTVLEALEERPAMVMS (SEQ ID
NO: 5).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del sujeto que se está tratando, y que se puede realizar como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera del anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo, en general, tienen estructuras similares, donde cada dominio está compuesto por cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

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

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de anticuerpos agonistas anti-FGFR1 y la actividad terapéutica de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo la diabetes.

A. Anticuerpos anti-FGFR1 ejemplares

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a FGFR1. En ciertos modos de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 se une a FGFR1b y/o FGFR1c y actúa de agonista de la actividad de FGFR1.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 que comprende seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; (b) HVR-H2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunos modos de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 puede ser totalmente humano, humanizado o no humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 comprende las HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una secuencia estructural humana aceptora, por ejemplo, una secuencia estructural de inmunoglobulina humana o una secuencia estructural consenso humana.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR1 comprende la secuencia del dominio variable de la cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 2, 3 o 4 siguientes:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTWISWVPGKGLEWVGEIDPYDGDYADSVKGRFTISADTSKLNQ
 MNSLRAEDTAVYYCASSGYGGSDYAMDYWGQ (SEQ ID NO: 2),
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNYIHVWVPGKGLEWVADIYDNDGDYADSVKGRFTISADTSKLNQ
 MNSLRAEDTAVYYCAREHFDWVHYVMDYWGQ (SEQ ID NO: 3), y
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNWISWVPGKGLEWVAEIDPYDGATDY
 ADSVKGRFTISADTSKLNQMNSLRAEDTAVYYCATGTDVMDYWGQ (SEQ ID NO: 4). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR1 comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO: 2, 3 o 4, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 siguiente:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
 QPEDFATYYCQQSYTTPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 6). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR1 comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO: 6, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente, y un VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL de la SEQ ID NO: 2, 3 o 4 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-FGFR1 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-FGFR1 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, que se describen en las secciones 1-7 a continuación:

1. Afinidad de anticuerpos

En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En un modo de realización, la K_d se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de valoración de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina a un 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés entonces se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-

20@) a un 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan un 20 % o menos de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

5 De acuerdo con otro modo de realización, la Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un dispositivo BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, los chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensoactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a un 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y las tasas de disociación (koff) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) por ajuste de forma simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción de la fluorescencia que mide el incremento o la disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

30 En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una recapitulación de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una recapitulación de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden los restos del epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen semivida *in vivo* aumentada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

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

45 Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos modos de realización, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

50 Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar por diversas técnicas incluyendo, pero no limitadas a la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fagos), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

55 En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Algunos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que la clase o subclase se ha modificado con respecto a la del anticuerpo precursor. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

65 En ciertos modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para los seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano precursor. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un

anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante humana. En algunos modos de realización, algunos restos de la FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por los restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los restos de la HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

5 Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se recapitulan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) y se describen también, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); en las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "revestimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe la estrategia de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

15 Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims et al. *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de la regiones variables de la cadena ligera y pesada (véase, por ejemplo, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 21, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales
20 maduras (somáticamente mutadas) humanas o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

25 4. Anticuerpos humanos

En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversos procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74
30 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales típicamente contienen todo o una parte de los locus de las inmunoglobulinas humanas, que reemplazan a los locus de las inmunoglobulinas endógenas o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de las inmunoglobulinas endógenas en general se han inactivado. Para una recapitulación de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología KM Mouse® y publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

45 Los anticuerpos humanos también se pueden preparar por procedimientos basados en hibridomas. Se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boemer et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridomas de linfocitos B humanos también se describen en Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridomas) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) también se describe en Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

60 Los anticuerpos humanos también se pueden generar aislando las secuencias del dominio variable del clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fago derivadas de seres humanos. Dichas secuencias del dominio variable se pueden combinar entonces con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos se describen a continuación.

65 5. Anticuerpos derivados de bibliotecas

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar por cribado de bibliotecas combinatorias de anticuerpos con la

actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen diversos procedimientos en la técnica para generar bibliotecas de presentación en fagos y cribar dichas bibliotecas de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se recapitulan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen también, por ejemplo, en McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004).

En ciertos procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después se pueden cribar para los fagos que se unen a los antígenos como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. De forma alternativa, el repertorio virgen se puede clonar (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígeno no propios y también autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, las bibliotecas vírgenes también se pueden preparar de manera sintética clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen bibliotecas de anticuerpos humanos en fagos incluyen, por ejemplo: patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertos modos de realización, una de las especificidades de unión es para FGFR1 y la otra es para cualquier otro antígeno, por ejemplo, beta-Klotho. En ciertos modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de FGFR1. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), documento WO 93/08829 y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la tecnología de "botón en ojal" (knob-in-hole) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar modificando los efectos de orientación por interacción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); entrecruzando dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpo" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv (sFv) de cadena sencilla (véase, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos modificados con tres o más sitios de unión a antígenos funcionales, incluyendo "anticuerpos pulpo" también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al FGFR1, así como otro antígeno diferente, por ejemplo, klothoBeta (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de anticuerpos

En ciertos modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por

síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno.

5 a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En ciertos modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones conservativas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de los aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un anticuerpo de interés y los productos se pueden cribar para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 1

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

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

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

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

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para su estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) respecto al anticuerpo precursor y/o habrán conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo precursor. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos tales como las descritas en el presente

documento. Brevemente, uno o más restos de la HVR se mutan y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Las alteraciones (por ejemplo, sustituciones) se pueden hacer en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden hacer en "puntos calientes" de la HVR, es decir, los restos codificados por codones que se someten a mutación de alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) y/o las SDR (a-CDR), con el VH o VL variante resultante cuya afinidad de unión se está analizando. La maduración de la afinidad construyendo y volviendo a seleccionar bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ (2001)). En algunos modos de realización de maduración de la afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de diversos procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Se crea entonces una segunda biblioteca. La biblioteca se criba a continuación para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a HVR, en las que varios restos de la HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez) se introducen aleatoriamente. Los restos de la HVR implicados en la unión al antígeno se pueden identificar específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelado. A menudo se actúa en particular sobre la CDR-H3 y la CDR-L3.

En ciertos modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones en una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o las SDR. En ciertos modos de realización de las secuencias VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácido.

Un procedimiento útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden ser dianas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, se analiza una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes pueden ser la diana o se pueden eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si presentan las propiedades deseadas.

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

b) Variantes de glucosilación

En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o disminuir el grado de glucosilación del anticuerpo. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se crea o se elimina uno o más sitios de glucosilación.

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

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras de manosa complejas, híbridas y de alto contenido) que se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe

en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración de la UE de los restos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también puede estar situada aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosilados" o "deficitarios en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con inactivaciones génicas, tales como células CHO con inactivación del gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y documento WO 2003/085107).

A las variantes de anticuerpos además se les pueden proporcionar oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairé et al.); patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana et al.); y documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Variantes de la región Fc

En ciertos modos de realización, se puede introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En ciertos modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, que hacen que sea un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, sin embargo, ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por tanto es probable que carezca de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan Fc y RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc y RI, Fc y RII y Fc y RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA) y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WISCONSIN)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). La unión a FcRn y las determinaciones de aclaramiento *in vivo*/semivida se pueden realizar también usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen los que tienen sustitución de uno o más de los restos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (patente de EE.UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327,

incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los restos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

5 Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; documento WO 2004/056312 y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

10 En ciertos modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran la ADCC, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de restos de la UE).

15 En algunos modos de realización, las alteraciones se hacen en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) modificadas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, documento WO 99/51642 e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

20 Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor neonatal de Fc (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en el documento US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del resto 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

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

d) Variantes de anticuerpo modificadas con cisteína

30 En ciertos modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, "tioMAB", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen con restos de cisteína. En modos de realización particulares, los restos sustituidos están en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan de este modo en los sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de fármaco enlazadores, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertos modos de realización, uno cualquiera o más de los siguientes restos se puede sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de la UE) de la cadena pesada; y S400 (numeración de la UE) de la región Fc de la cadena pesada.

40 Los anticuerpos modificados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

45 En ciertos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos.

55 El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones del anticuerpo particular a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

60 En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que se puede calentar de forma selectiva por la exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se eliminan las células proximales al

anticuerpo-resto no proteico.

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

5 Los anticuerpos se pueden producir por procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-FGFR1 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo). En otro modo de realización se proporciona uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped contiene (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de obtención de un anticuerpo anti-FGFR1, en el que dicho procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, proporcionado previamente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o del medio de cultivo de las células huésped).

25 Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-FGFR1, se aísla un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

30 Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos y polipéptidos de anticuerpo en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede seguir purificando.

40 Además de los procariotas, los microbios eucariotas, por ejemplo, los hongos filamentosos y las levaduras, son huéspedes adecuados de clonación o expresión para vectores que codifican el anticuerpo, incluyendo cepas de hongos y levaduras, cuyas rutas de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

45 Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar en combinación con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

50 Los cultivos de células de plantas también se pueden usar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

55 Las células de vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Pueden ser útiles, por ejemplo, líneas celulares de mamífero que están adaptadas a crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59, (1977)); las células de riñón de cría de hámster (BHK); las células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, (1980)); las células de riñón de mono (CV1); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76); las células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); las células de riñón canino (MDCK); las células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); las células de pulmón humano (W138); las células de hígado humano (Hep G2); las células de tumor de mama murino (MMT 060562); las células TRI como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); las células MRC5 y las células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una recapitulación de algunas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para

la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pág. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-FGFR1 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se analiza para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos tales como ELISA, Western blot, etc.

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-FGFR1 que tienen actividad agonista. Por ejemplo, la actividad biológica puede incluir la capacidad de activar la transducción de señales de rutas particulares que se pueden medir, por ejemplo, determinando los niveles de fosfo-FRS2a, fosfo-MEK, fosfo-ERK/MAPK, fosfo-STAT3 o usando los ensayos de luciferasa basados en GAL-Elk1 descritos en el presente documento (véase también, por ejemplo, Wu et al. *J. Biol. Chem.* 5; 282 (40):29069-72 (2007) y Wu et al. *PLoS One* 18;6(3):e17868 (2011)). También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-FGFR1 del presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteína, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos) o isótopos radiactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) en el que un anticuerpo está conjugado a uno o más fármacos, incluyendo pero no limitados a, un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos del fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véase la patente de EE. UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298.); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véase la patente de EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4.336-4343 (2002) y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero no limitada a, la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPE y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Están disponibles diversos isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centellografía, por ejemplo, Tc99m o I123, o un marcador de espín para las pruebas de imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de

ricina se puede preparar como se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador inestable en medio ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotoinestable, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC del presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertos modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de FGFR1 en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertos modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido adiposo pardo, tejido pancreático, tejido hepático, tejido adiposo blanco y tejido tumoral.

En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de FGFR1 en una muestra biológica. En ciertos modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-FGFR1 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-FGFR1 a FGFR1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FGFR1 y FGFR1. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 se usa para seleccionar los sujetos elegibles para tratamiento con un anticuerpo anti-FGFR1, por ejemplo, cuando el FGFR1 es un biomarcador para la selección de pacientes.

En ciertos modos de realización, se proporcionan anticuerpos anti-FGFR1 marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodensos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-FGFR1 como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares del presente documento incluyen, además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina

con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar, además, un análogo de glp-1, una amilina sintética, un antagonista del receptor de glucagón (por ejemplo, un anticuerpo anti-GCGR) o leptina. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* en general son estériles. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Procedimientos y composiciones terapéuticas

Cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas proporcionados en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para su uso en el tratamiento de una enfermedad metabólica. En ciertos modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para su uso en un procedimiento de tratamiento. En ciertos modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad metabólica, que comprende administrar al sujeto de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-FGFR1. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un análogo de glp-1, una amilina sintética, un antagonista del receptor de glucagón (por ejemplo, un anticuerpo anti-GCGR) o leptina. Un "sujeto" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-FGFR1 agonista en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad metabólica. En un modo de realización adicional, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad metabólica, que comprende administrar a un sujeto que tiene la enfermedad una cantidad eficaz del medicamento. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. Un "sujeto" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad metabólica. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un sujeto que tiene dicha enfermedad metabólica una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGFR1 agonista. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. Un "sujeto" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En ciertos modos de realización, un agente terapéutico adicional es un análogo de glp-1, una amilina sintética, un antagonista del receptor de glucagón (por ejemplo, un anticuerpo anti-GCGR) o leptina.

Dichos tratamientos de combinación indicados anteriormente abarcan la administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente y/o adyuvante terapéutico adicional.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación se puede realizar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan varios programas de dosificación incluyendo, pero no limitados a, administraciones individuales o múltiples en varios puntos temporales, la administración en bolo y la infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no lo necesita, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosis y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o de aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la historia clínica del paciente y de su respuesta al anticuerpo y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendrá, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico con otro modo de acción. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma

alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Generación y caracterización de anticuerpos agonistas anti-FGFR1.

Se generaron anticuerpos monoclonales específicos para FGFR1 usando la tecnología de presentación en fagos e IgD2-D3 marcada con His de FGFR1b y c humanos como antígenos. Se usaron bibliotecas de anticuerpos humanos en fagos con diversidad de síntesis en las regiones determinantes de complementariedad seleccionadas (H1, H2, H3, L3), que imitan la diversidad natural del repertorio de IgG humana para la selección. Los fragmentos Fab se presentaron bivalentemente en la superficie de partículas del bacteriófago M13 (Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284:119-32 (2004)). El protocolo de selección se ha descrito anteriormente (Liang et al., *J. Mol. Biol.* 366:815-29 (2007)). Después de cribar muchos clones de múltiples bibliotecas, se identificaron anticuerpos únicos y específicos de los fagos que se unen a ambas isoformas b y c de FGFR1 por ELISA de fagos. Para analizar la unión de los anticuerpos a los FGFR humanos, se empleó el protocolo de ELISA convencional usando 2 µg/ml de proteínas quiméricas ECD de FGFR1-Fc humano.

También se midieron las afinidades de unión de los anticuerpos anti-FGFR1 a FGFR1 por Biacore/SPR usando un instrumento BIAcore™ T100 como se ha descrito (Liang et al., *supra*) con las siguientes modificaciones. En primer lugar, el anticuerpo de ratón anti-Fc humano se recubrió sobre un chip CM5 de dextrano carboximetilado BIAcore™ usando acoplamiento directo para liberar los grupos amino siguiendo un procedimiento descrito por el fabricante. A continuación, el anticuerpo se capturó en los chips biosensores CM5 para conseguir aproximadamente 200 unidades de respuesta (UR). Las mediciones de unión se realizaron usando un tampón de migración compuesto de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,005 % (tampón HBS-P). Se inyectó una serie de diluciones de factor 2 de la proteína ECD de FGFR1-His en un intervalo de 1,550 nM en tampón HBS-P a un caudal de 30 µl/minuto a 25 °C. Las tasas de asociación (Kon, por mol/s) y las tasas de disociación (Koff, por s) se calcularon usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIAcore™ versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción koff/kon.

Dos de los anticuerpos anti-FGFR1 que se identificaron como se describe anteriormente en experimentos independientes (denominados en este caso R1MAb1 y R1MAb2) se unen a FGFR1b y FGFR1c con una afinidad similar, pero no a ninguna otra isoforma de FGFR (figura 1A y B). Su actividad de señalización se sometió a prueba usando un ensayo de luciferasa basado Gal-Eik1 en células L6 de rata que carecen de FGFR endógenos, pero se han transfectado para que expresen cada isoforma de FGFR (y KLB según lo necesario). Estos anticuerpos eran agonistas inesperadamente potentes: ambos R1MAb inducían actividad de luciferasa de una manera dependiente de la dosis, pero solamente cuando las células expresan FGFR1b o FGFR1c recombinante, lo que indica que los R1MAb actúan como agonistas específicos para FGFR1 (figura 1C). En este formato de ensayo, los R1MAb no afectaban de forma apreciable la actividad de FGF básico (bFGF), un ligando clásico de FGFR1 (figura 1D). Sin embargo, los R1MAb y el FGF21 mostraron un efecto aditivo cuando las células expresaban FGFR1c y KLB (figura 1D). El fragmento F(ab)², pero no el Fab de R1MAb2 mostró actividad agonista dependiente de FGFR1, lo que sugiere que los R1MAb ejercen su actividad agonista promoviendo la homodimerización de FGFR1 (figura 1E). Previamente, se había informado de un agonista artificial de la dimerización de FGFR que contiene un péptido de unión a FGFR1 y el dominio de cremallera de leucina de c-jun. Esta molécula llamada C19jun también se une a la heparina a través del dominio c-jun y requiere heparina para la activación de FGFR1 (Ballinger et al., *Nature Biotechnol.* 17: 1199-1204 (1999)). Por el contrario, la heparina no afectó a la actividad agonista de R1MAb1 en el ensayo de luciferasa (figura 5). La actividad agonista independiente de heparina del R1MAb1 se confirmó además examinando la fosforilación de ERK y MEK1/2, componentes de señalización corriente abajo de FGFR, en adipocitos 3T3-L1 murinos cultivados (figura 1F) o en WAT de ratones C57BL/6 a los que se les había inyectado por vía intraperitoneal R1MAb (figura 1G).

Se han realizado experimentos para localizar el epítipo FGFR1 al que se unen R1MAb1 y R1MAb2. Se sintetizaron 30 partes representadas de los péptidos de la secuencia de FGFR1 con una marca de biotina amino-terminal y se usaron para los ensayos de unión ELISA. Estas secuencias de los péptidos fueron las siguientes: n.^o 1: SSSEKEDTNTKPNPVAPY (SEQ ID NO: 36); n.^o 2: PVAPYWTSPEKMEKLLHAV (SEQ ID NO: 37); n.^o 3: KLHAVPAAKTVKFKCPSSG (SEQ ID NO: 38); n.^o 4: CPSSGTPNPTLRWLKNGKE (SEQ ID NO: 39); n.^o 5: KNGKEFKPDHRIGGKVKVRY (SEQ ID NO: 40); n.^o 6: YKVRYATWSIIMDSVVPSP (SEQ ID NO: 41); n.^o 7: VVPSDKGNYTCIVENEYGS (SEQ ID NO: 42); n.^o 8: NEYGSINHTYQLDVVERSP (SEQ ID NO: 43); n.^o 9: VVSPHRPILQAGLPANKT (SEQ ID NO: 44); n.^o 10: PANKTVALGNSNVEFMCKVY (SEQ ID NO: 45); n.^o 11: MCKVYSDPQPHIQWLKHIE (SEQ ID NO: 46); n.^o 12: LKHIEVNGSKIGPDNLPYV (SEQ ID NO: 47); n.^o 13:

NLPYVQILKTAGVNTTKE (SEQ ID NO: 48); n.º 14: TTDKEMEVLHLRNVSFEDA (SEQ ID NO: 49); n.º 15: SFEDAGEYTCLAGNSIGLS (SEQ ID NO: 50); n.º 16: SIGLSHHSAWLTVLEALEE (SEQ ID NO: 51); n.º 17: YWTSPEKMEKLLHAVPAAK (SEQ ID NO: 52); n.º 18: EKMEKLLHAVPAAKTVKFK (SEQ ID NO: 53); n.º 19: PAAKTVKFKCPSSGTPNP (SEQ ID NO: 54); n.º 20: KFKCPSSGTPNPTRLWLKN (SEQ ID NO: 55); n.º 21: GTPNPTRLWLKNGKEFKPD (SEQ ID NO: 56); n.º 22: TRLWLKNGKEFKPDHRIGG (SEQ ID NO: 57); n.º 23: FKPDHRIGGYKVRYATWSI (SEQ ID NO: 58); n.º 24: HRIGGYKVRYATWSHMDS (SEQ ID NO: 59); n.º 25: LHAVPAAKTVKFKCPSS (SEQ ID NO: 60); n.º 26: KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28); n.º 27: AVPAAKTVKFKCPSSG (SEQ ID NO: 61); n.º 28: FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29); n.º 29: KPDHRIGGYKVR (SEQ ID NO: 62); n.º 30: GTPNPTRLWLKN (SEQ ID NO: 63). Como se muestra en la figura 17A, tanto para R1MAb1 como para R1MAb2 los péptidos más cortos que demostraron una unión significativa fueron los péptidos n.º 26 y n.º 28.

Ejemplo 2. Los R1MAb demuestran actividad antidiabética sostenida.

Se analizó si los anticuerpos anti-FGFR1 de la invención tendrían actividad antidiabética usando modelos de ratón de diabetes. Todos los ratones se adquirieron de Jackson Laboratory y se mantuvieron en una instalación para animales libre de patógenos a 21 °C en un ciclo estándar de 12 horas de luz/12 h de oscuridad con acceso al pienso (un pienso estándar para roedores (LabDiet 5010, 12,7 % de calorías procedentes de la grasa) o una dieta de alto contenido de grasa, alto contenido de carbohidratos (Harlan Teklad TD.03584, 58,4 % de calorías procedentes de la grasa) y agua *ad libitum*. Los ratones db/db en el fondo C57BLKS/J eran hembras y otros ratones eran todos machos. Todos los ratones inyectados tenían aproximadamente 9-11 semanas de edad, excepto los ratones AP2-SREBP1c que tenían 8 meses (figura 3E) o 4 meses (figura 3F). Para la infusión continua de proteína FGF21, se implantó por vía subcutánea una bomba osmótica (Alzet® 2001). Los niveles de glucosa se midieron usando el glucómetro OneTouch® Ultra®. Para el análisis de lípidos hepáticos, el lípido se extrajo de acuerdo con el procedimiento de Folch y se resuspendió en PBS que contenía Triton X-100 al 5 %. Se determinó el colesterol total, los triglicéridos, el β-hidroxibutirato (Thermo DMA) y los ácidos grasos no esterificados (Roche) usando reacciones enzimáticas. Los niveles de insulina en suero se determinaron por ELISA (Crystal Chem).

Se analizó la actividad agonista de los R1MAb *in vitro* e *in vivo*, inyectando a ratones db/db resistentes a la leptina e hiperglucemiantes 3, 10 y 50 mg/kg (mpk) de R1MAb1. Se observó que los niveles de glucosa en sangre se normalizaron durante más de una semana a las tres dosis, y el efecto reductor de la glucosa observado fue inesperadamente fuerte y duradero, permaneciendo los niveles de glucosa inferiores a los de los ratones de control durante más de 30 días después de una única inyección (figura 2A). Esto se asoció con una disminución transitoria, pero significativa en el peso corporal (figura 2A). El efecto de disminución de la glucosa probablemente se debió a una mejora en la sensibilidad a la insulina, ya que el nivel de insulina en suero también se redujo drásticamente al inyectar el R1MAb1 (figura 2B). Se observó una reducción inducida por R1MAb similar en los niveles de glucosa en sangre con R1MAb2 (figura 6) y en tres modelos adicionales de ratón con una resistencia a la insulina pronunciada, los ratones ob/ob deficientes en leptina, los ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) y los ratones Ins2Akita (Hong et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E1687-96 (2007)) (figura 2C y 7). Los experimentos de alimentación paralela mostraron que la pérdida de peso inducida por R1MAb en ratones db/db e Ins2Akita se debe a una reducción en la ingesta de alimentos; sin embargo, la reducción observada en la glucosa en sangre es en gran medida independiente de la ingesta de alimentos (figura 2D y 6-7). En el páncreas, la inyección de R1MAb1 aumentó el área positiva a insulina por cada islote en comparación con los ratones de control alimentados o no en paralelo (figura 2E y 8). El FGFR1 se expresa en células β pancreáticas (Hart et al., *Nature* 408:864-68 (2000)) y FGF21 promueve la función de las células β *ex vivo* (Wente et al., *Diabetes* 55: 2470-78 (2006)); por tanto, la activación de FGFR1 en las células β podría contribuir directamente a un aumento del nivel de insulina pancreática. Estos datos demuestran que la activación de FGFR1 (pero no de FGFR2 o FGFR3) es suficiente para recapitular las actividades antidiabéticas y antilipidémicas de FGF21 recombinante.

Para analizar la importancia de las funcionalidades de IgG para las actividades de los R1MAb, se utilizaron dos tipos de modificaciones. Una mutación doble (D265A/N297A; DANA) en la región Fc anula la unión a los Fc y R y el reclutamiento de células efectoras inmunitarias por una molécula de IgG (Gong et al., 2005). Ni la actividad agonista ni la antidiabética de R1MAb2 se vio afectada por la introducción de las mutaciones DANA; por lo tanto, la función efectora no desempeña una función en la actividad antidiabética de R1MAb2 (figura 9A-C). Sin embargo, una versión modificada de un brazo (OA) de R1MAb1 (Atwell et al., *J. Mol. Biol.* 270:26-35 (1997)), que carece de uno de los fragmentos Fab (OA-R1MAb1) (figura 9A y D) mostró actividad agonista disminuida (figura 9E y F) y no pudo reducir el nivel de glucosa en sangre, el peso corporal ni los niveles en hígado y en suero de los lípidos en ratones db/db (figura 9G y H), lo que indica que tanto las actividades agonistas como las antidiabéticas de los R1MAb dependen de la bivalencia del Ab (aunque también se sometieron a prueba anticuerpos biespecíficos con un brazo anti-FGFR1 solamente (por ejemplo, con un brazo anti-beta-Klotho) y confirman que conservan los atributos beneficiosos de los R1MAb anti-FGFR1 bivalentes). Estas correlaciones sugieren firmemente que la activación inducida por R1MAb de la ruta de señalización corriente abajo de FGFR1 probablemente media sus efectos antidiabéticos.

Los mAb han surgido como una poderosa modalidad terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades humanas. La demostración de las potentes actividades antihiperglucemiantes e hipolipemiantes del MAb agonista

anti-FGFR1 abre un nuevo camino hacia el desarrollo de mAb terapéuticos dirigidos a FGFR1 o el complejo receptor que contiene FGFR 1 para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 y otros trastornos crónicos relacionadas con la obesidad. Actuar sobre FGFR1 con MAb ofrece varias propiedades favorables con respecto al tratamiento con FGF21 recombinante. En primer lugar, por su naturaleza, los MAb proporcionan una farmacocinética predecible, modulable y muy superior a la del FGF21 o cualquier otra proteína terapéutica que no sea un anticuerpo. De hecho, se ha demostrado que una única inyección i.p. a 1-3 mpk de R1MAb1 o R1MAb2 en ratones db/db da lugar a una mejora notablemente sostenida de la hiperglucemia durante más de 30 días (figura 2 y 5). Nunca se ha publicado un efecto glucémico de tan larga duración para ninguno de los agentes antidiabéticos descritos previamente.

10 Ejemplo 3. Importancia de los tejidos adiposos en la acción diabética de R1MAb y FGF21.

Se ha sugerido el FGF21 recombinante para mejorar la sensibilidad a la insulina a través de los tejidos adiposos y el hígado (Berglund et al., *Endocrinology* 150:4084-93 (2009); Li et al., *FEBS Letters* 583:3230-34 (2009)). La inyección de FGF21 en ratones inducía fosforilación de MEK y ERK en cuatro tipos de tejido que expresan KLB, el hígado, el tejido adiposo blanco (WAT), el tejido adiposo pardo (BAT) y el páncreas, como se informó previamente (figura 3A, parte superior) (Kurosu et al., *J. Biol. Chem.* 282: 26687-95 (2007); Xu et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(5): E1105-14 (2009)). Por el contrario, la inyección de R1MAb1 da lugar a la fosforilación de los mismos efectores corriente abajo en los tejidos adiposos y el páncreas, pero no en el hígado (figura 4A, parte inferior), de forma coherente con la muy baja expresión del ARNm de FGFR1 en el hígado (figura 10) (Fon Tacer et al., *Mol. Endocrinol.* 24(10): 2050-64 (2010)). De hecho, una comparación paralela de la expresión génica hepática reveló que la expresión de dos genes diana de FGF21 identificados previamente (receptor de leptina (LepR) y el supresor de la señalización de citocinas 2 (SOCS2); Coskun et al., *Endocrinology* 149:6018-27 (2008), Inagaki et al., *Cell Metabolism.* 8:77-83 (2008)) se inducía con FGF21 pero no con R1MAb1 (figura 15). Por otra parte, la expresión hepática de los genes regulados por la insulina conocidos (acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), ácido graso sintasa (FAS), elongasa de ácidos grasos de cadena larga de la familia 6 (ELOVL6), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (IGFBP)-1, fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK)) se alteró de manera similar tanto con FGF21 como con R1MAb1, lo que sugiere que estos genes podrían estar regulados indirectamente a través de cambios hormonales (por ejemplo, insulina) o metabólicos. El R1MAb1 disminuyó notablemente los niveles de lípidos hepáticos y en suero cuando se inyectó a ratones db/db en el día 7 después de la inyección única, presumiblemente debido a efectos de reparto de los lípidos por los tejidos adiposos (figura 3B-D). La inyección de R1MAb1 no indujo fosforilación de MEK o ERK en el pulmón y la próstata (figura 3A), dos tipos de tejidos que expresan FGFR1, propensos al cáncer. Estas observaciones, en conjunto, sugieren que los tejidos adiposos, pero no el hígado, son fundamentales para la actividad metabólica común de R1MAb y FGF21.

Para investigar más este punto, se usaron ratones transgénicos ap2-srebp1c lipoatróficos, que presentan resistencia a la insulina severa, deficiencia de leptina y hepatomegalia, debido a la ausencia de tejido adiposo blanco y la función comprometida del tejido adiposo pardo (figura 3E, 11) (Shimomura et al., *Genes Dev.* 12:3182-94 (1998); Shimomura et al., *Nature* 401:73-76 (1999)). En consonancia con la idea de que se requiere una función normal del tejido adiposo para la actividad metabólica de R1MAb1, una única inyección i.p. a 1 mpk mejoró la HOMA-IR y la tolerancia a la glucosa solamente en los ratones ob/ob de control, pero no en los ratones ap2-srebp1c (figura 3E). La ingesta de alimentos se redujo por inyección de R1MAb1 tanto en ratones ob/ob como en ratones transgénicos ap2-srebp1c, en comparación con los ratones alimentados en paralelo a los que se les inyectó la IgG de control (figura 3E). Además, la infusión continua de FGF21 recombinante tampoco logró mejorar la tolerancia a la insulina en ratones ap2-srebp1c, aunque se observó un aumento significativo en el β -hidroxibutirato en suero (es decir, cuerpos cetónicos) y una disminución del colesterol (figura 3F).

50 Ejemplo 4. Activación de PGC1-alfa en tejido adiposo pardo por R1MAb.

Se ha sugerido recientemente que el FGF21 activa la proteína del receptor nuclear coactivador transcripcional PGC-1 α en los tejidos adiposos y el hígado para inducir la expresión de los genes corriente abajo asociados con el metabolismo oxidativo (Chau et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 107:12553-58 (2010); Hondares et al., *Cell Metabolism* 11:206-12 (2010); Potthoff et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 30;106(26): 10853-8 (2009)). De hecho, cuando se inyectó en ratones ob/ob, el R1MAb1 aumentó significativamente la expresión en el BAT de genes implicados en la fosforilación oxidativa y el metabolismo de ácidos grasos según lo revelado por el análisis de micromatriz de ADN, seguido de un análisis de enriquecimiento para un gen establecido (figura 4A). El R1MAb1 (y FGF21) también aumento la expresión de PGC-1 α , PGC-1 β y sus dianas principales CIDEA y UCP1 en los tejidos adiposos pardos (medida por qPCR; figuras 4B y 16).

La transcripción de PGC-1 α se regula a través de elementos de respuesta a AMPc (CRE) en la región promotora y el factor de transcripción CREB que se une a los CRE (Herzig et al., *Nature* 413:179-83 (2001); Karamitri et al., *J. Biol. Chem.* 284:20738-52 (2009); Muraoka et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296:E1430-39 (2009); Shi et al., *J. Biol. Chem.* (2005)). En un cribado para identificar factores de transcripción relacionados con el metabolismo que puede activar FGF21 en células HEK293 que expresan KLB, se descubrió que la proteína de fusión GAL-CREB se puede activar por FGF21 (figura S8A-B). Posteriormente, se descubrió que tanto FGF21 como R1MAb1 pueden activar el indicador GAL-CREB, así como el indicador CRE-luciferasa de una manera dependiente de la dosis en células HEK293 (figura 4C). En consonancia con la idea de que CREB funciona como un efector corriente abajo,

5 FGF21 aumentó la fosforilación de CREB y p90RSK, una cinasa de CREB anterior regulada por ERK, en los tejidos adiposos blancos de ratón (figura 4D), adipocitos primarios humanos diferenciados (figura 4E) y células HEK293 (figura 12C). Por tanto, la activación de CREB por FGF21 y R1Mab probablemente contribuye a la inducción de PGC-1 α y un conjunto de genes corriente abajo implicados en el metabolismo oxidativo en los tejidos adiposos (figura 4F y 12D). Además de la regulación transcripcional sugerida, se ha informado de que FGF21 activa PGC-1 α de forma postraducciona

10 Ejemplo 5. Prueba de anticuerpos biespecíficos anti-FGFR1/anti-beta-Klotho

15 Otra diferencia importante entre los R1Mab y el FGF21 es la especificidad del receptor diana. FGF21 puede actuar sobre FGFR1c, 2c y 3c, pero sus efectos probablemente están limitados a tejidos que expresan KLB (es decir, hígado, tejido adiposo y páncreas) (Fon Tacer et al., supra, Kurosu et al., *J. Biol. Chem.* 282:26687-95 (2007); Ogawa et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 104:7432-37 (2007)). Por el contrario, los tejidos diana de los presentes R1Mab están determinados por la expresión de FGFR1 y la distribución tisular de la molécula de anticuerpo, pero es poco probable que estén limitados por la expresión de KLB. De hecho, se observó hipofosfatemia leve en los ratones tratados con R1Mab1, lo que sugiere la activación de la ruta de FGF23/Klotho en el riñón. En consecuencia, se generaron anticuerpos biespecíficos anti-KLB/FGFR1 usando la presentación en fagos o la tecnología de hibridoma (ratones BALBc inmunizados con células HEK293 que expresan FGFR1c y KLB) para generar distintos anticuerpos anti-KLB y la tecnología de botón en ojal (Merchant et al. *Nature Biotechnol.* 16(7): 677-81 (1998)). Se analizó la capacidad de estos anticuerpos biespecíficos de activar la expresión de GAL-Elk1 y se confirmó que estos anticuerpos dependen de la presencia tanto de beta-Klotho como de FGFR1 para la activación de las señales corriente abajo. También se confirmó que uno de los anticuerpos podría aumentar la fosforilación de los intermedios de señalización corriente abajo, MEK y ERK $\frac{1}{2}$ en adipocitos humanos primarios diferenciados. Uno de los anticuerpos biespecíficos reacciona de forma cruzada con las proteínas murinas y se usó este anticuerpo para someter a prueba la actividad *in vivo* de un anticuerpo biespecífico. Se ha observado que este anticuerpo biespecífico reduce los niveles de glucosa en sangre sin elevar el nivel de FGF23 en suero, mientras que el anticuerpo de control anti-FGFR1 (monoespecífico) correspondiente reduce los niveles de glucosa en sangre en un grado similar, pero eleva los niveles de FGF23 en suero significativamente.

35 A continuación se sometió a prueba la capacidad de estos anticuerpos biespecíficos de proporcionar los beneficios metabólicos de los anticuerpos agonistas anti-FGFR1. Se generaron ratones transgénicos que expresaban beta-Klotho humano (el R1Mab1 y el R1Mab2 reconocen cada uno el FGFR1 murino) y se confirmó que los anticuerpos biespecíficos anti-KLB/FGFR1 descritos anteriormente mejoran la tolerancia a la glucosa en modelos de ratón, por ejemplo, ratones transgénicos hKLB alimentados con dieta alta en grasas. También se generaron anticuerpos anti-beta-Klotho que reaccionan con la proteína en otros modelos de animales (por ejemplo rata, conejo, macaco cangrejero y macaco Rhesus) y se analizó de manera similar la capacidad de los anticuerpos biespecíficos construidos con estos y los anticuerpos anti-FGFR1 de proporcionar beneficios metabólicos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> GENENTECH, INC. ET AL.
- <120> AGONISTAS DE FGFR1 Y PROCEDIMIENTOS DE USO
- <130> P4653R1WO
- 10 <140>
- <141>
- <150> 61/536.936
- <151> 20-09-2011
- 15 <150> 61/486.731
- <151> 11-05-2011
- <160> 63
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 229
- 25 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

```

Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys
 1           5           10           15

Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe
          20           25           30

Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys
          35           40           45

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val
 50           55           60

Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp
 65           70           75           80

Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn
          85           90           95

His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile
          100          105          110

Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn
          115          120          125

Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln
 130          135          140
    
```

30

ES 2 628 385 T3

Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn
145 150 155 160

Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asp
165 170 175

Ala Glu Val Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Gln Ser Gly Glu
180 185 190

Tyr Val Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Glu Ala Asn Gln Ser Ala
195 200 205

Trp Leu Thr Val Thr Arg Pro Val Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Pro
210 215 220

Ala Val Met Thr Ser
225

<210> 2
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 2

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 Thr Ser Thr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile
35 40 45

Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

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

Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105

15 <210> 3
<211> 109

ES 2 628 385 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 3

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

10

<210> 4
<211> 102
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

20

<400> 4

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 Thr Ser Asn
20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile
35 40 45
Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg

ES 2 628 385 T3

50

55

60

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Thr Asp Val
85 90 95

Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

ES 2 628 385 T3

Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys
1 5 10 15

Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe
20 25 30

Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys
35 40 45

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val
50 55 60

Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp
65 70 75 80

Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn
85 90 95

His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile
100 105 110

Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn
115 120 125

Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln
130 135 140

Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn
145 150 155 160

Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp
165 170 175

Lys Glu Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala
180 185 190

Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His
195 200 205

Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val
210 215 220

Met Thr Ser
225

- <210> 6
- 5 <211> 108
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 628 385 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

5 <400> 6

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

10 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 7

20 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Trp Ile Ser
 1 5 10

25 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 8

35 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Tyr Ile His
 1 5 10

35 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 628 385 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 13

Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 **Gly**

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 14

Ala Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

25 <210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 15

35 **Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

40 <210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 16

Ser Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

50

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 17

Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 20 <400> 18

Glu His Phe Asp Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10
 25
 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 35 <400> 19

Thr Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr
1 5
 40
 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 20

Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr
1 5
 55
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

5 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 22

15 **Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser**
1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 23

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

30 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar="Gly"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar="Glu"

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /nota="Los restos indicados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las anotaciones para dichas posiciones"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar="Tyr"

60 <220>
 <221> misc_feature

<222> (4)..(4)
 <223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar="Tyr"

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar="Asp"

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar="Tyr"

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"

35 <400> 24
Ala Asp Ile Asp Pro Asn Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

40 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar="Glu"

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar="Tyr"

ES 2 628 385 T3

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"
5
<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Tyr"
10
<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"
15
<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Asp"
20
<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"
25
<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Tyr"
30
<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"
35
<400> 25

Asp Ile Asp Pro Asn Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5           10           15

Gly

40 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<220>
50 <221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Thr"

<220>
55 <221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
60 <221> VARIANTE
<222> (7)..(7)

```

<223> /reemplazar="Thr"

<220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar="Tyr"

<220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (5)..(8)
 <223> /nota="Los restos indicados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar="Ser"

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (10)..(10)
 <223> /nota="El resto indicado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 26
 25
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Trp Ile His
 1 5 10

<210> 27
 <211> 53
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27
Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys
 20 25 30

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val
 35 40 45

Arg Tyr Ala Thr Trp
 35 50

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 45

<400> 28
Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 29

Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
1 5 10

 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 20
 <400> 30

Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro
1 5 10 15
 25
 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 35
 <400> 31

Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro
1 5 10 15
 40
 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 32
 50
Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro
1 5 10 15

 <210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 60

<400> 33

Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn
1 5 10

5 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 34

15 **Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His**
1 5 10

20 <210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 35

Phe His Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His
1 5 10

30 <210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 36

Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val
1 5 10 15

Ala Pro Tyr

45 <210> 37
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 37

Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu
 1 5 10 15

His Ala Val

5 <210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 38

Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro
 1 5 10 15

Ser Ser Gly

15 <210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 39

Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 Gly Lys Glu

30 <210> 40
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 40

Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
 1 5 10 15

Val Arg Tyr

45 <210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 41

Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val
 1 5 10 15

Pro Ser Asp

5

<210> 42
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 42

Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu
 1 5 10 15

Tyr Gly Ser

20

<210> 43
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 43

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu
 1 5 10 15

30

Arg Ser Pro

<210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 44

Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Asn Lys Thr

45

<210> 45
 <211> 19
 <212> PRT

ES 2 628 385 T3

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

Asp Lys Glu

5 <210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 49

Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe
1 5 10 15

Glu Asp Ala

15

20 <210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 50

Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ser

30 <210> 51
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 51

Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Glu Glu

45 <210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 628 385 T3

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

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 56

10 **Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe**
1 5 10 15

Lys Pro Asp

<210> 57
<211> 19
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 57

Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg
1 5 10 15

Ile Gly Gly

25 <210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 58

Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr
1 5 10 15

Trp Ser Ile

40 <210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 59

ES 2 628 385 T3

His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile
1 5 10 15

Met Asp Ser

5 <210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 60

Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser
1 5 10 15

Ser

15 <210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 61

Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly
1 5 10 15

30 <210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 62

Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg
40 1 5 10

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 63

Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo agonista anti-receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) que se une al péptido n.º 26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) o al péptido n.º 28 FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo no es un agonista de FGFR2 o de FGFR3.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 4. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
5. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-4, que es un anticuerpo IgG1.
- 15 6. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-5, en el que anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFX1X2X3X4IX5, en la que X1 es S o T, X2 es N o S, X3 es N o T, X4 es W o Y, X5 es H o S (SEQ ID NO: 26), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en X1X2IX3PX4DGX5TX6YADSVKG, en la que X1 es A o G, X2 es D o E, X3 es D o Y, X4 es N o Y, X5 es A o D y X6 es D o Y (SEQ ID NO: 24) y X1IX2PX3DGX4TX5YADSVKG, en la que X1 es D o E, X2 es D o Y, X3 es N o Y, X4 es A o D y X5 es D o Y (SEQ ID NO: 25), (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDAWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20), (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 21), (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 22) y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23).
- 20 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSTWIS (SEQ ID NO: 7), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GEIDPYDGDYADSVKG (SEQ ID NO: 10) y EIDPYDGDYADSVKG (SEQ ID NO: 11) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16) y SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17).
- 30 8. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSNNYIH (SEQ ID NO: 8), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ADIYPNDGDYADSVKG (SEQ ID NO: 12) y DIYPNDGDYADSVKG (SEQ ID NO: 13) y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos EHFDAWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18).
- 35 9. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSNWIS (SEQ ID NO: 9), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AEIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 14) y EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 15) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20).
- 40 10. El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 3 y 4; y una secuencia VL de la SEQ ID NO: 6.
- 45 11. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-10, en el que el anticuerpo anti-FGFR1 se une tanto a FGFR1b como a FGFR1c.
- 50 12. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
13. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
- 55 14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo también se une a beta-Klotho.
15. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de las reivindicaciones 1-14.
- 60 16. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.
17. Un procedimiento de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 de modo que se produzca el anticuerpo.
- 65 18. El procedimiento de la reivindicación 17, que comprende además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.

19. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de las reivindicaciones 1-14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 20. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-14 para su uso como medicamento.

21. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-14, donde el anticuerpo se administra con otro agente para tratar la diabetes, siempre que el otro agente no sea insulina.

10 22. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-14, donde el anticuerpo se administra con un agente para tratar enfermedades cardiovasculares.

15 23. El anticuerpo agonista contra FGFR1 de las reivindicaciones 1-14 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección metabólica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo agonista, en el que la enfermedad metabólica se selecciona del grupo que consiste en: el síndrome del ovario poliquístico (SOP), el síndrome metabólico (SM), la obesidad, la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la hiperlipidemia, la hipertensión, la diabetes de tipo 2, la diabetes no de tipo 2, la diabetes de tipo 1, la diabetes autoinmune latente (DAL) y la diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY), en el que el anticuerpo agonista contra FGFR1 no activa FGFR2 o FGFR3.

20

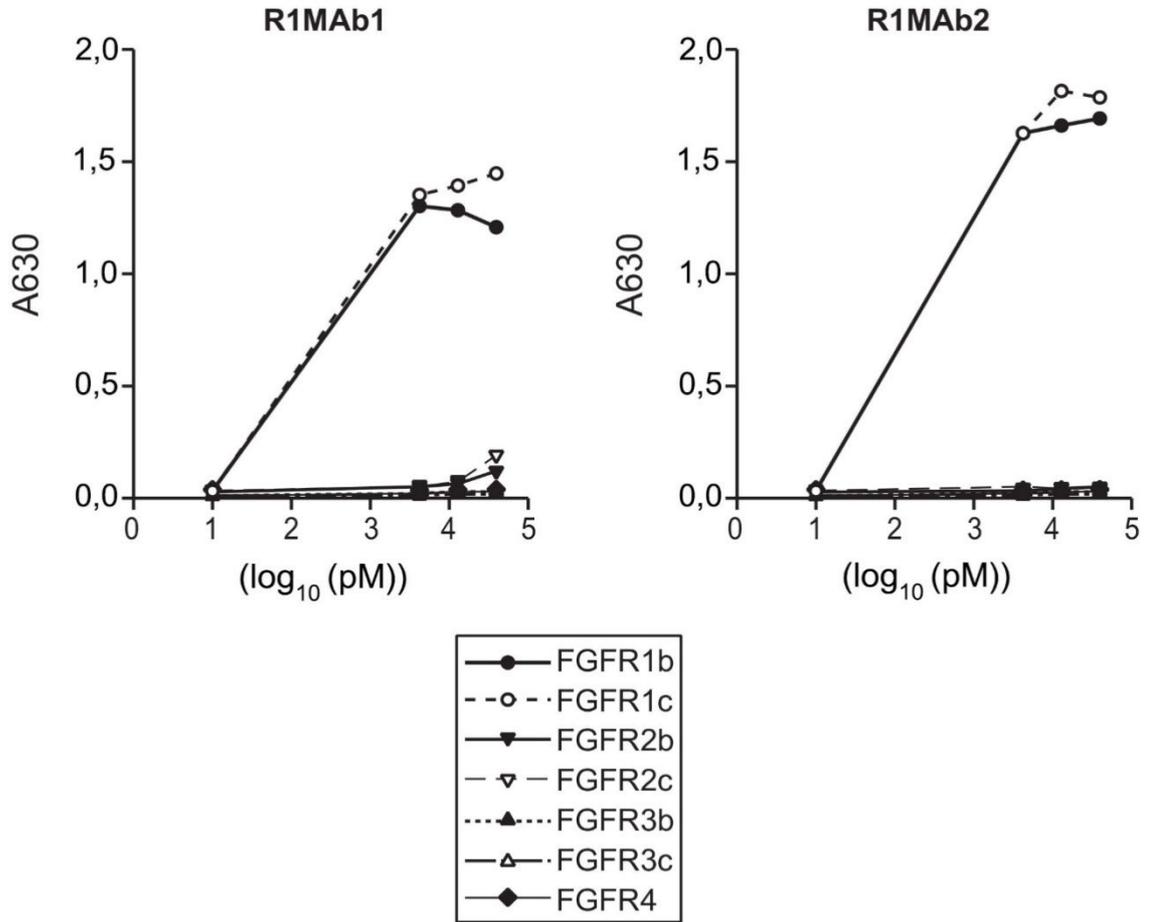


FIG. 1A

		k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	KD (M)
R1MAb1	FGFR1b	$2,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-10}$
	FGFR1c	$3,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-10}$
R1MAb2	FGFR1b	$1,9 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-10}$
	FGFR1c	$1,9 \times 10^6$	$8,7 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-10}$

FIG. 1B

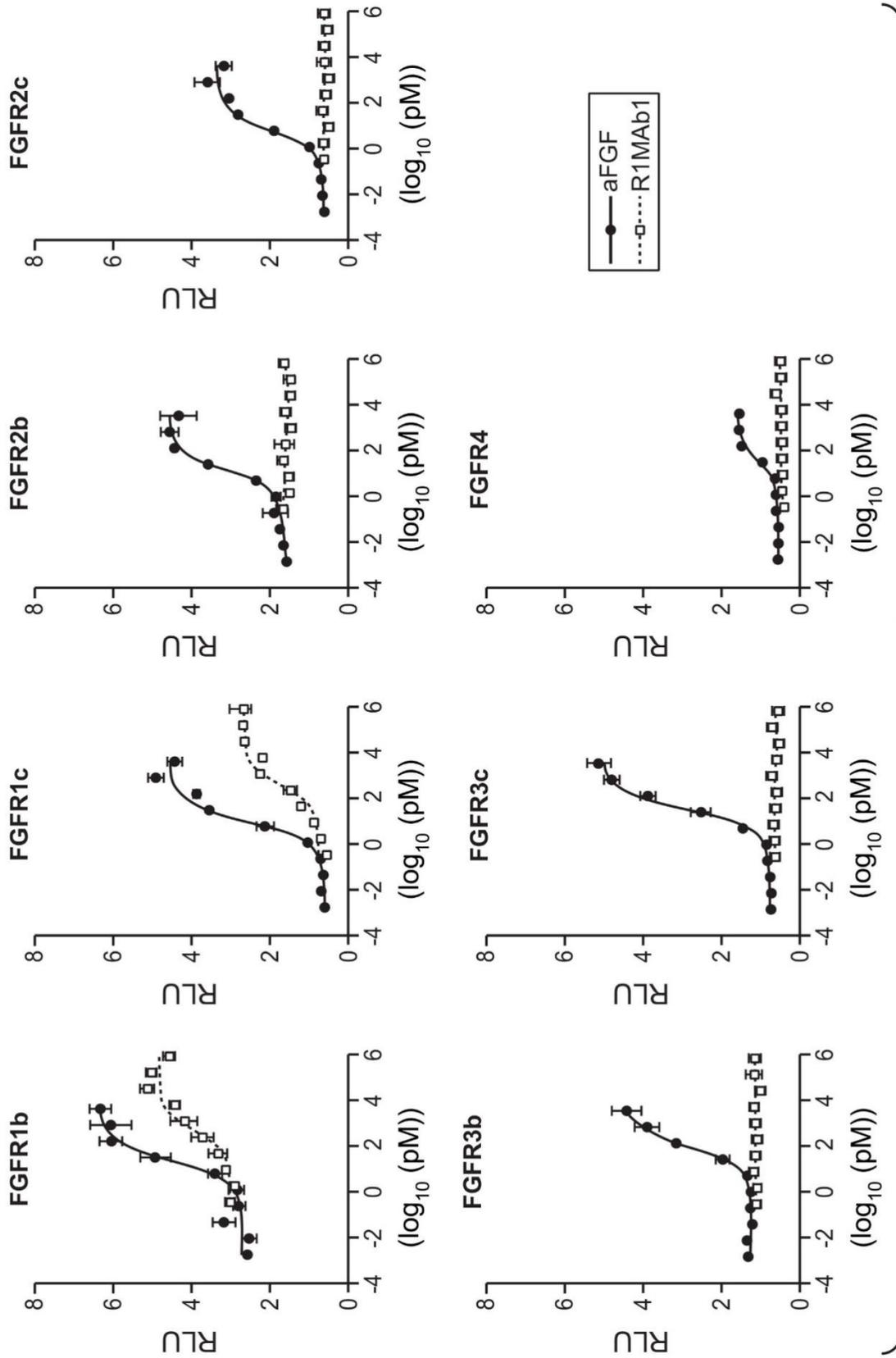


FIG. 1C-1

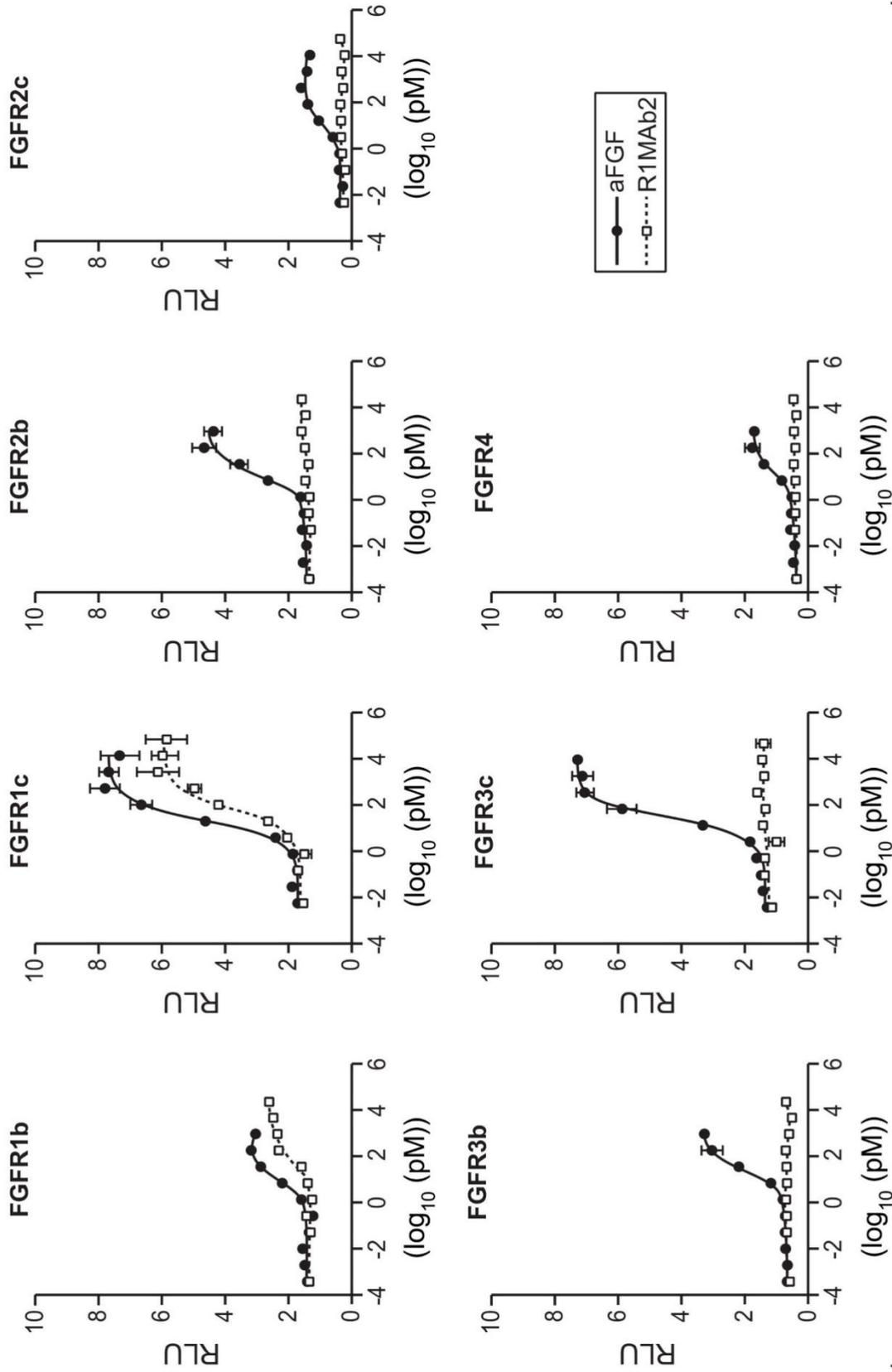
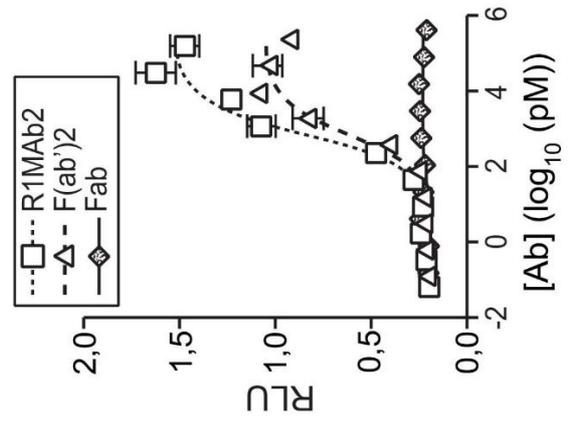
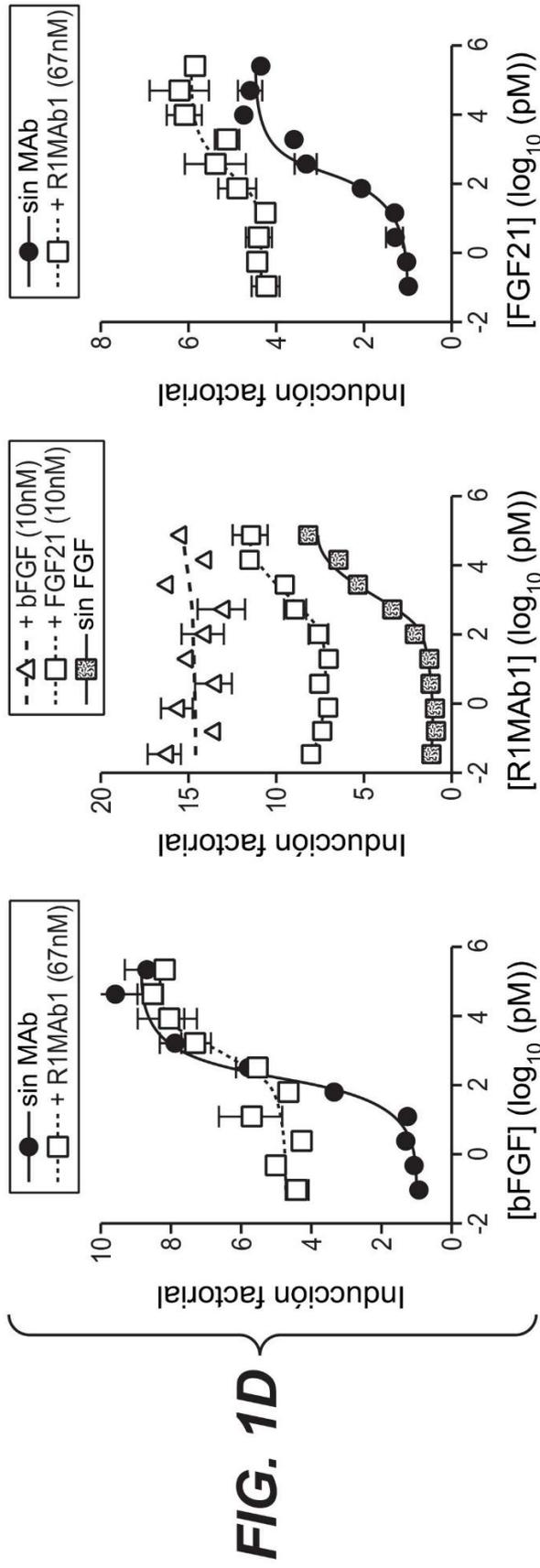


FIG. 1C-2



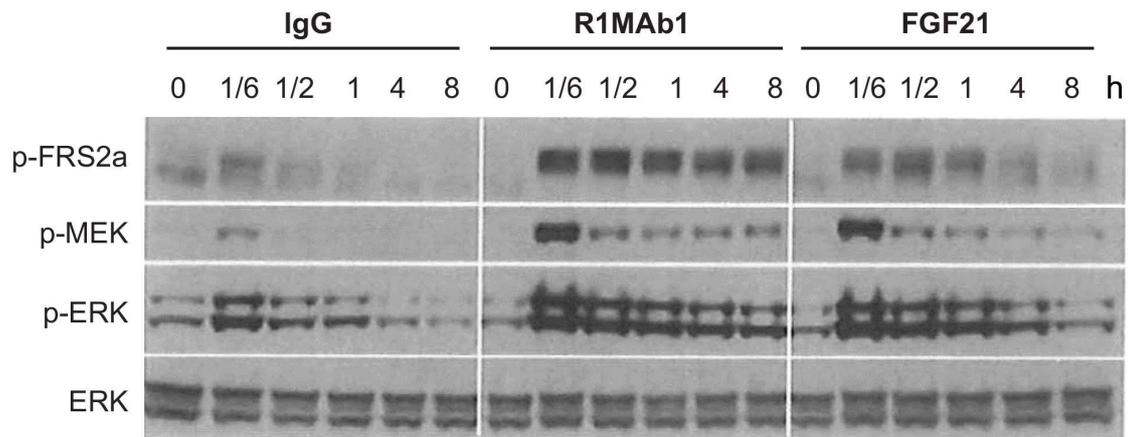


FIG. 1F

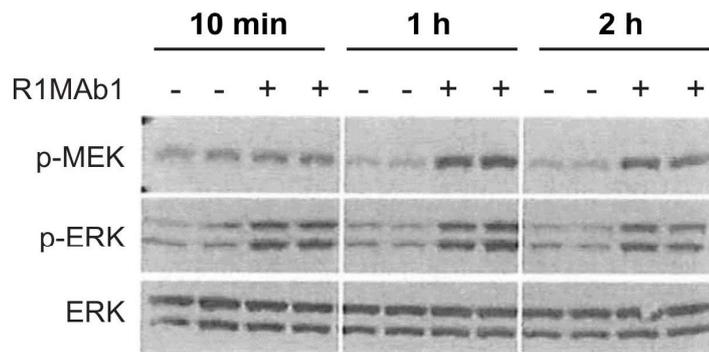
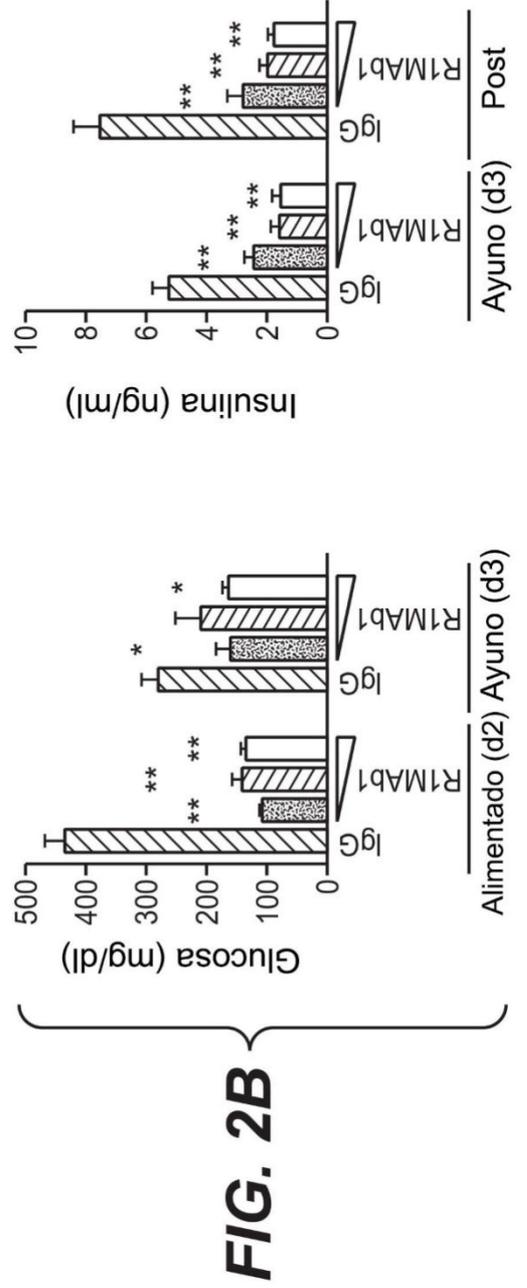
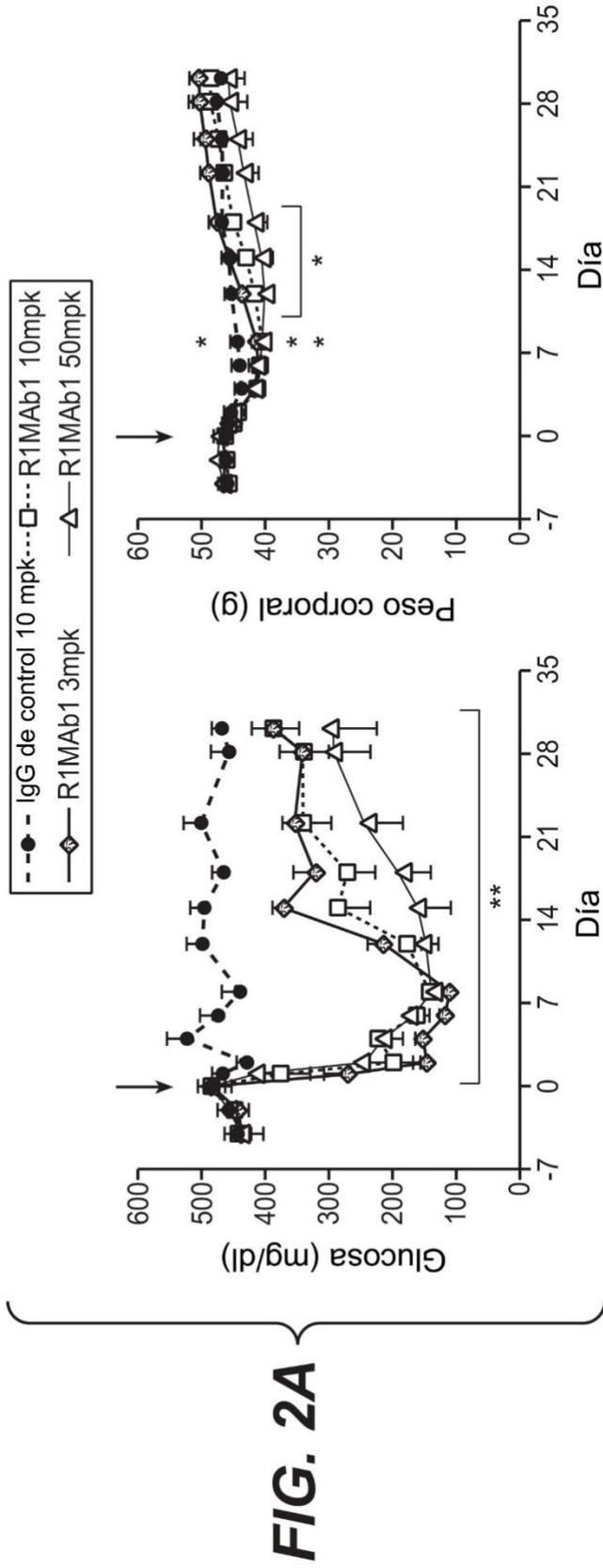


FIG. 1G



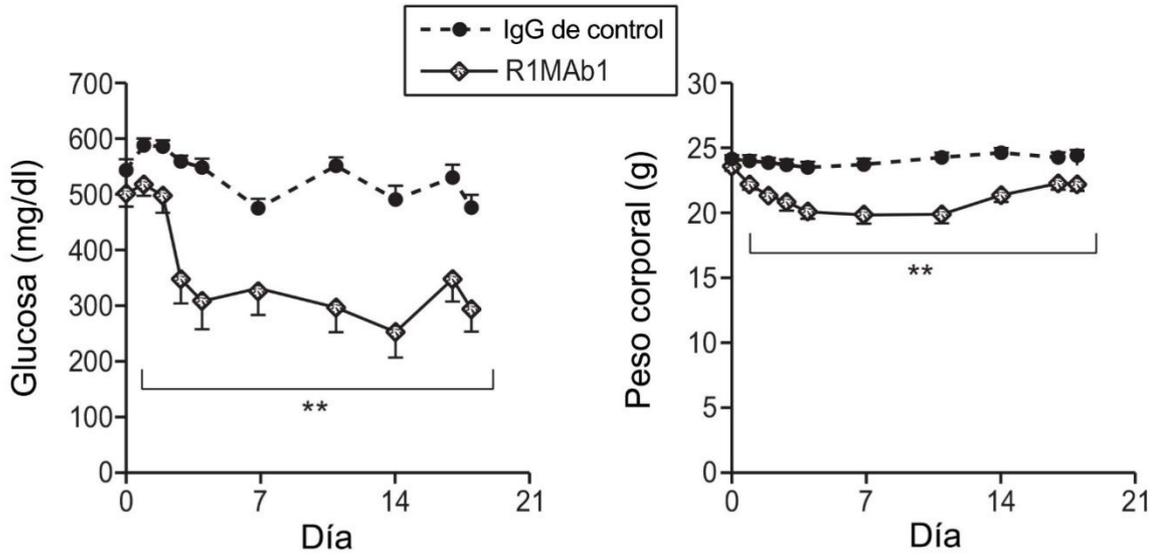


FIG. 2C

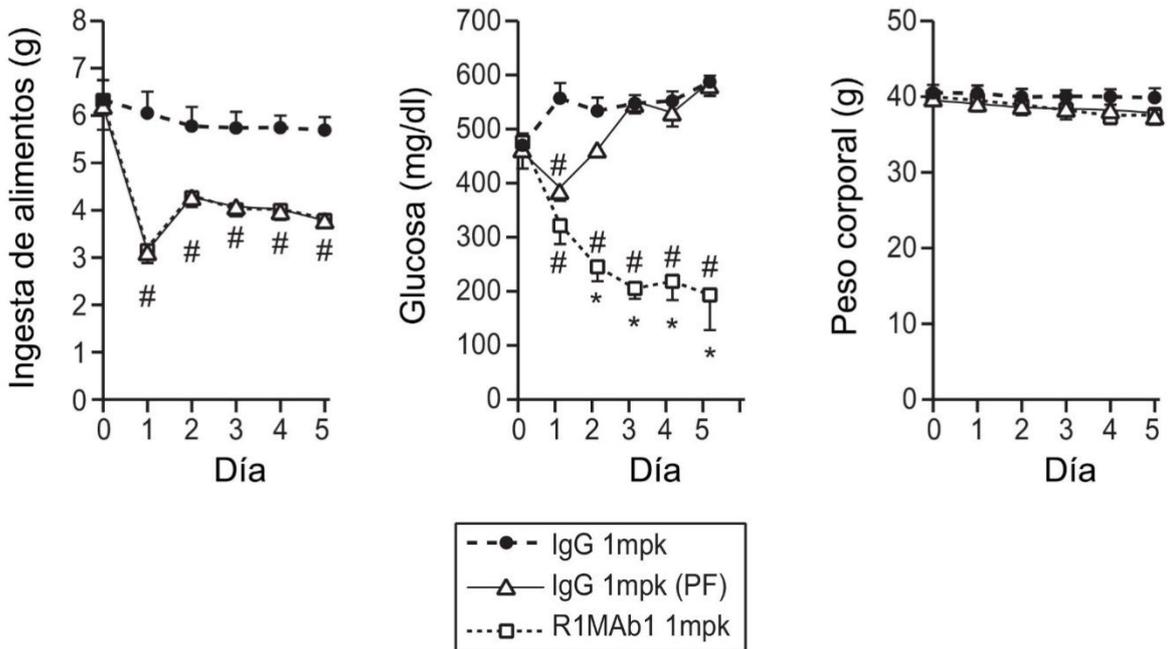


FIG. 2D

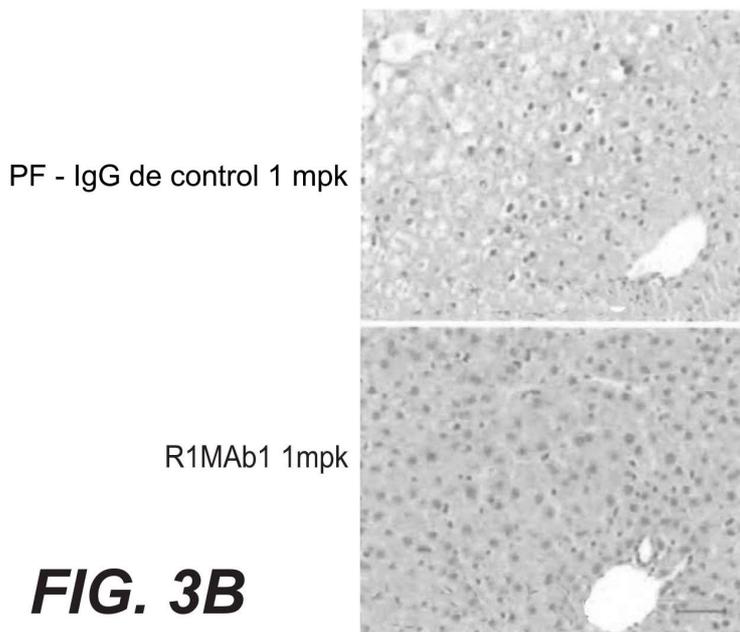
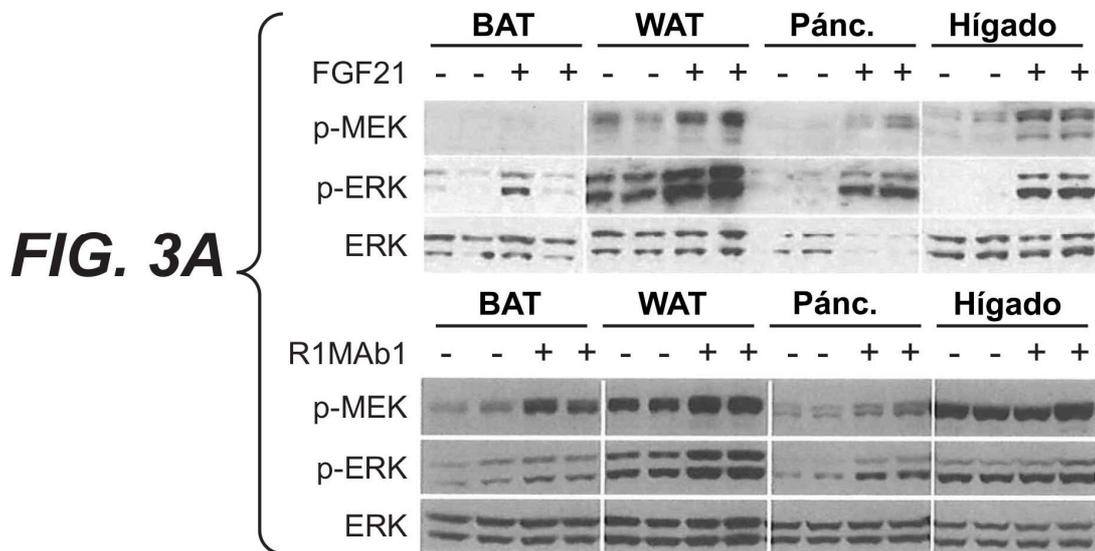
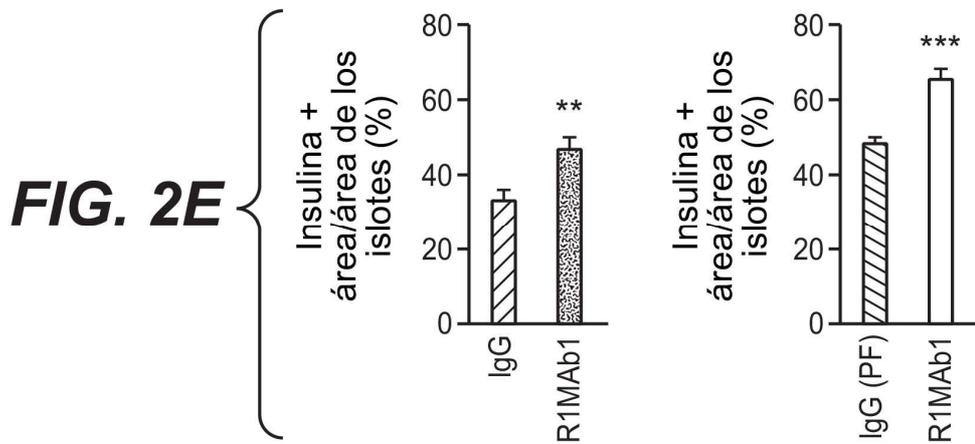


FIG. 3C

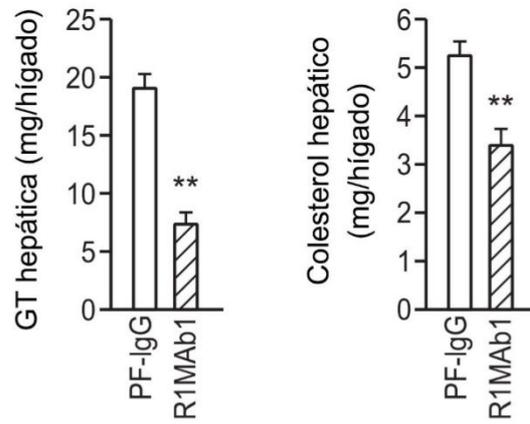


FIG. 3D

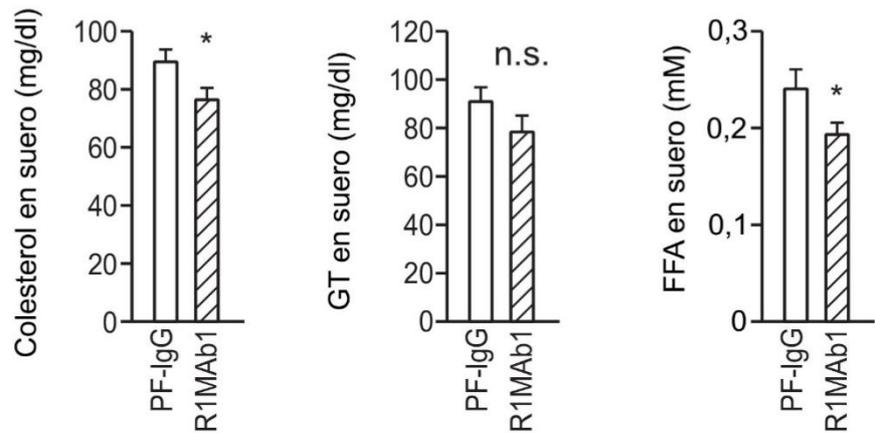
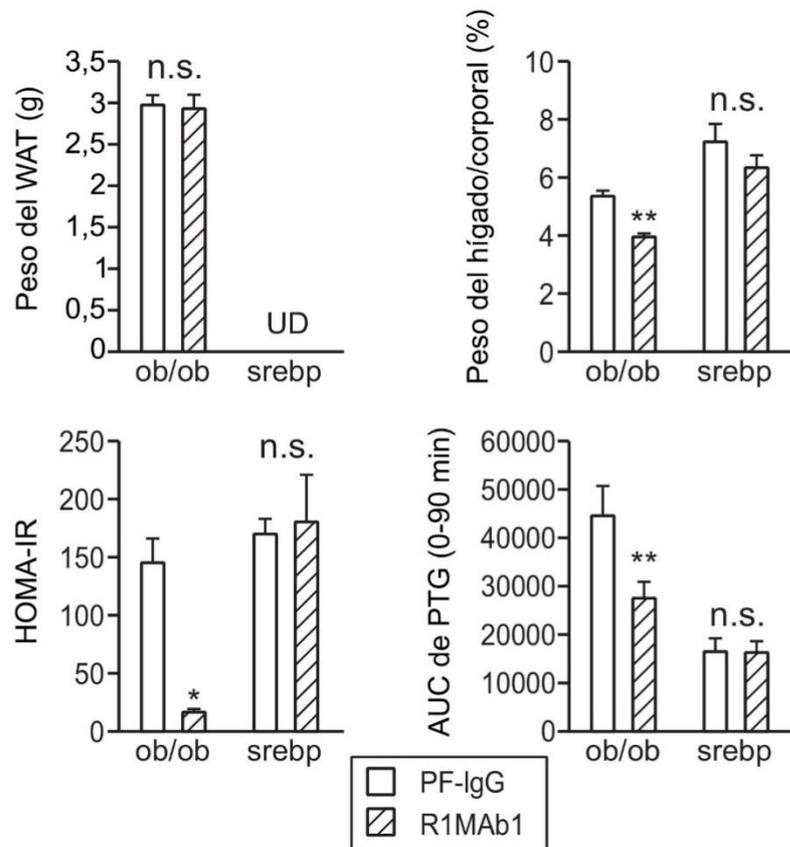


FIG. 3E



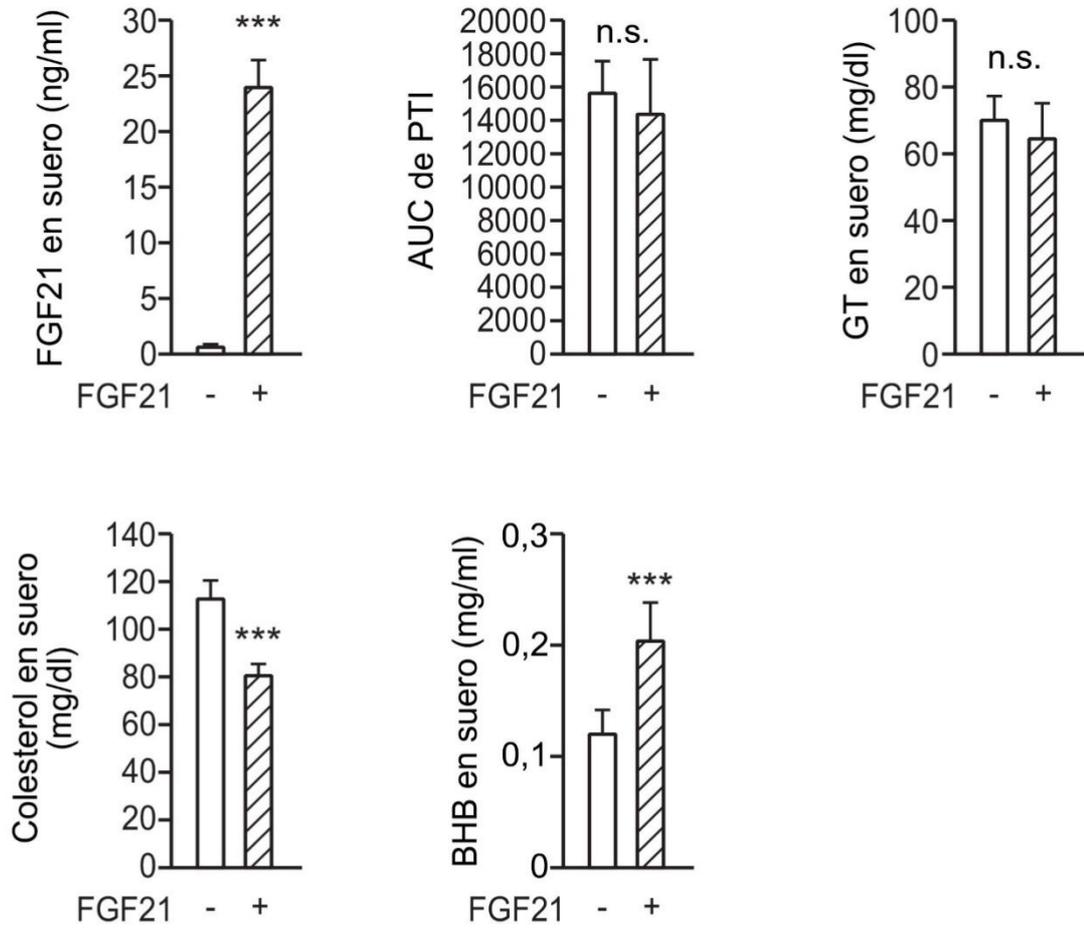
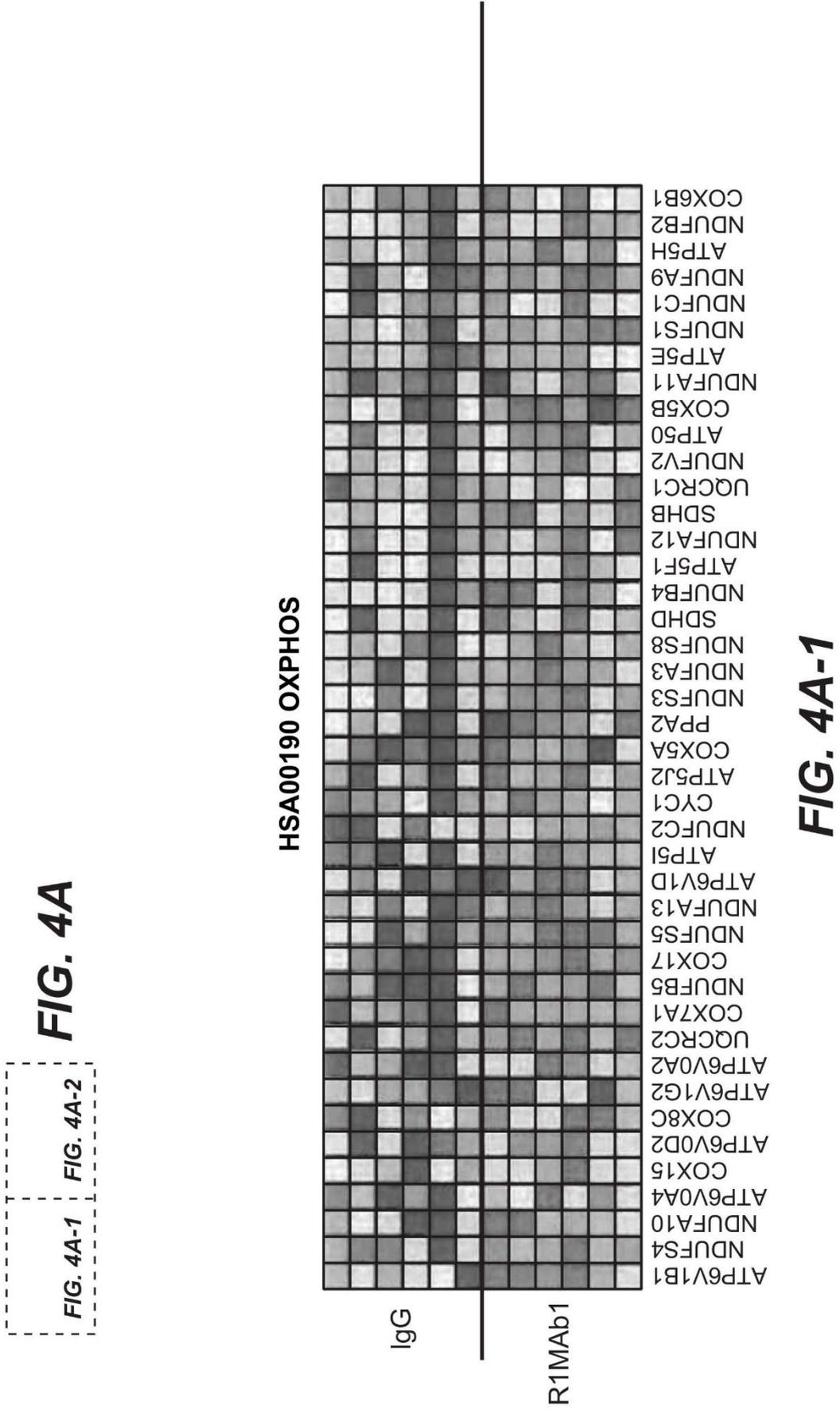


FIG. 3F



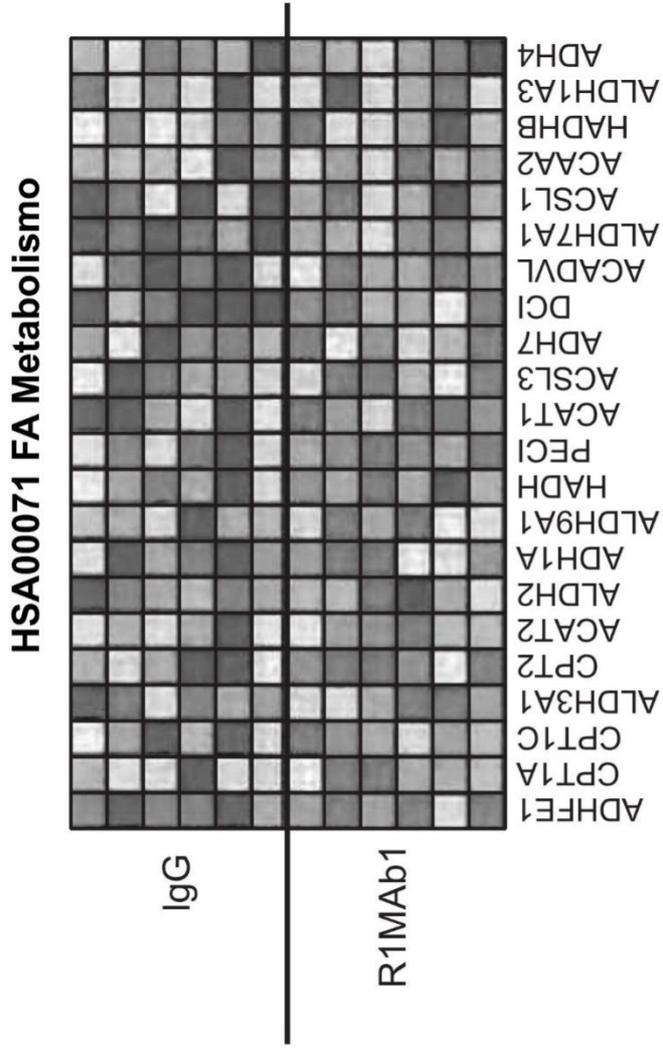


FIG. 4A-2

FIG. 4B

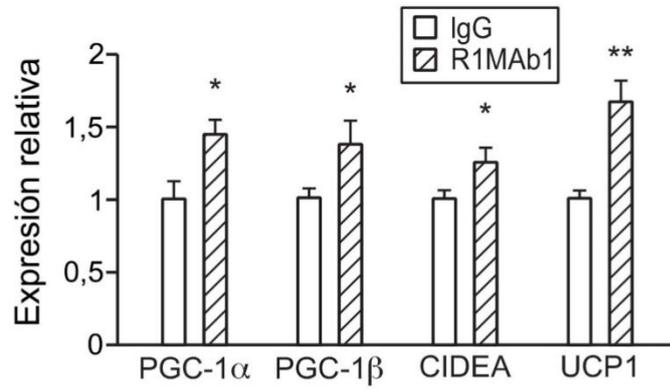
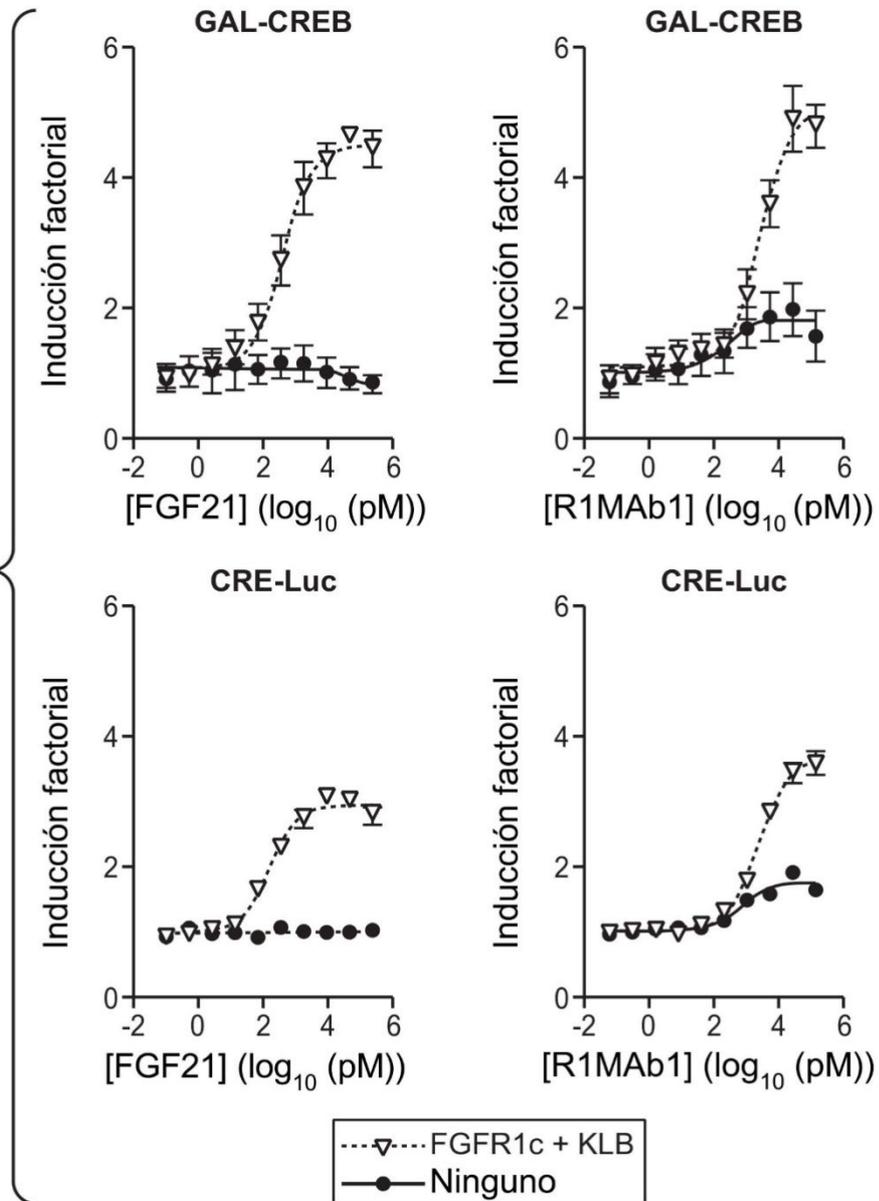


FIG. 4C



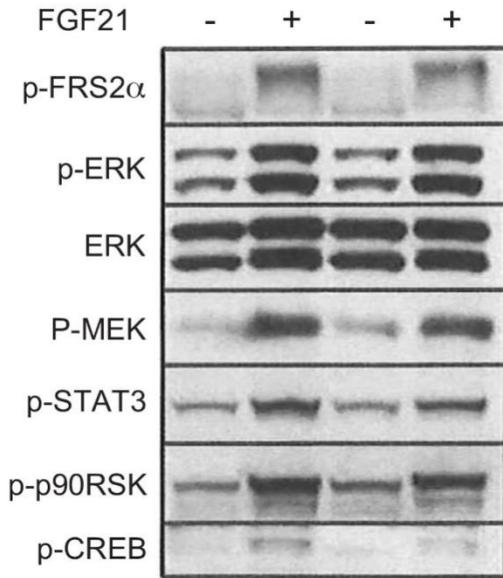


FIG. 4D

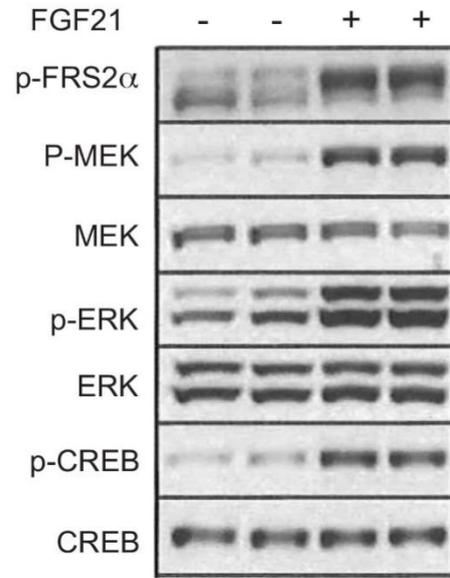


FIG. 4E

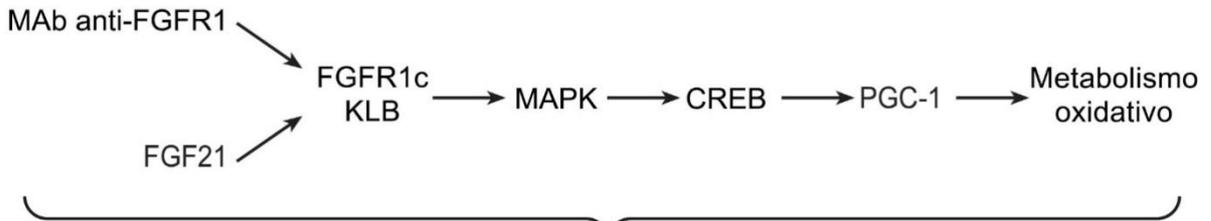


FIG. 4F

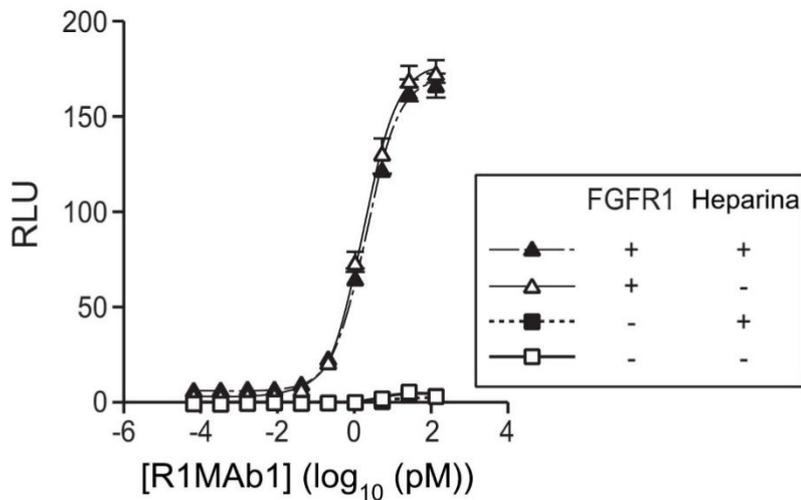
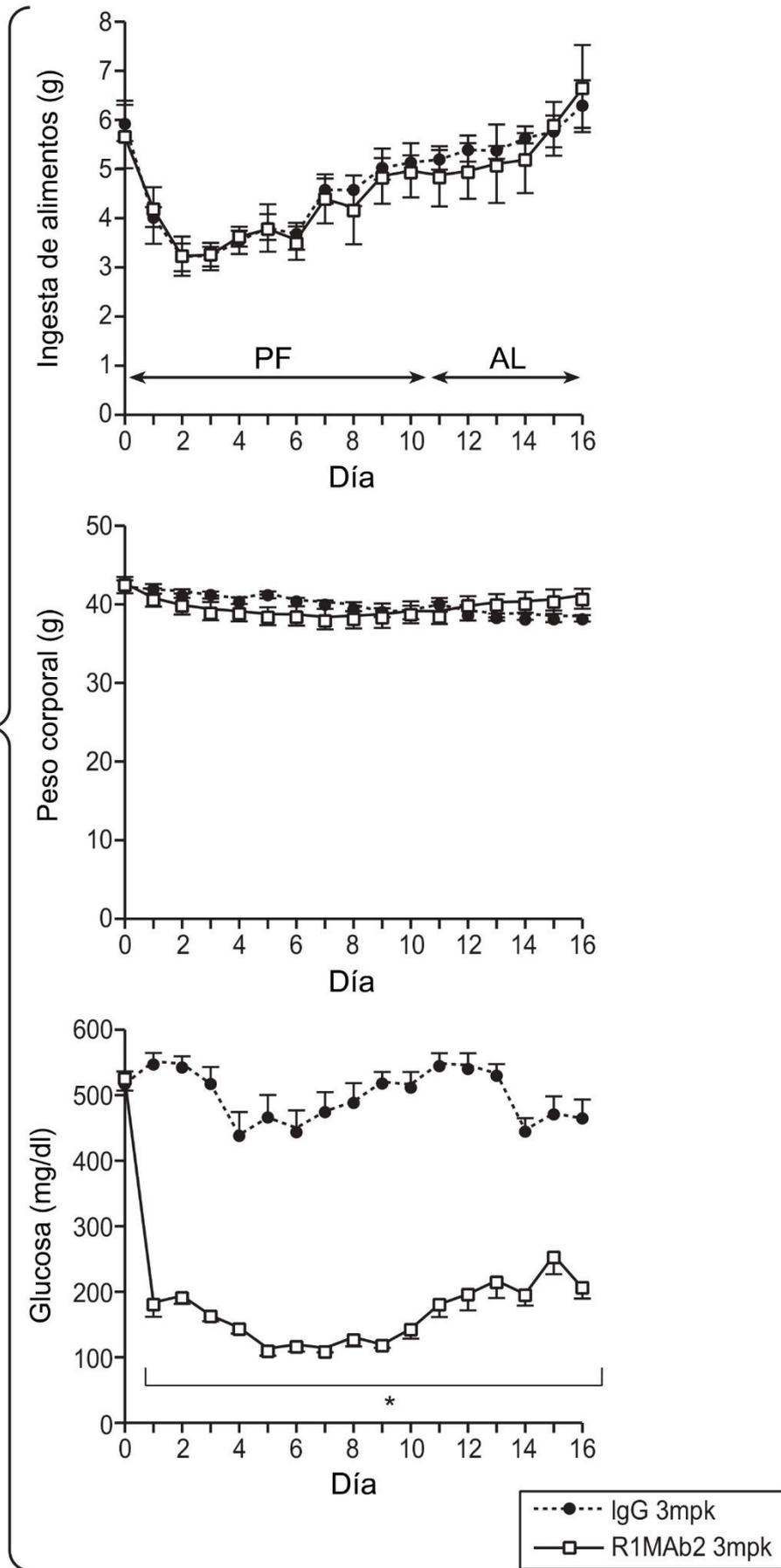


FIG. 5

FIG. 6A



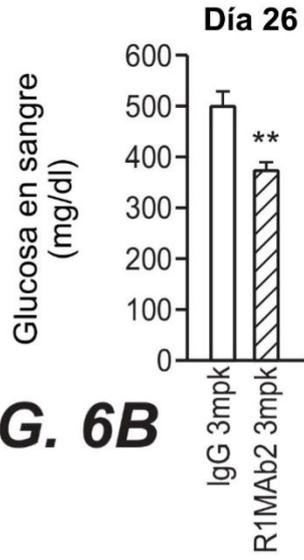


FIG. 6B

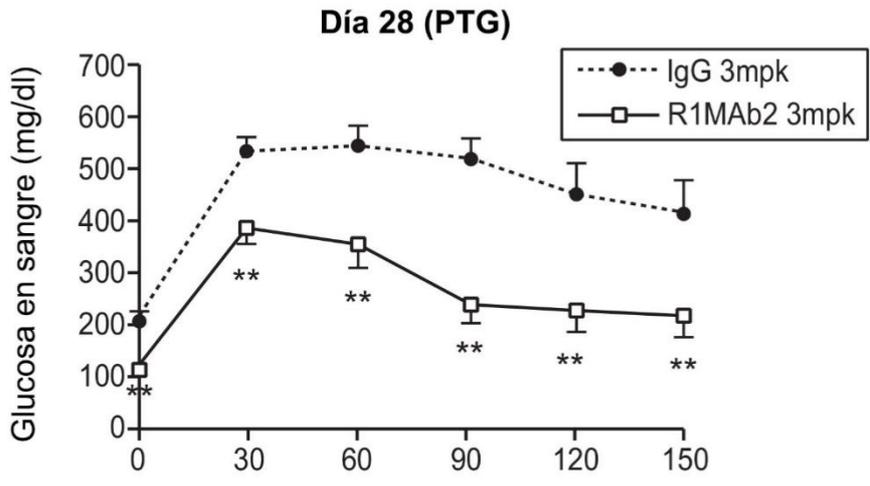


FIG. 6C

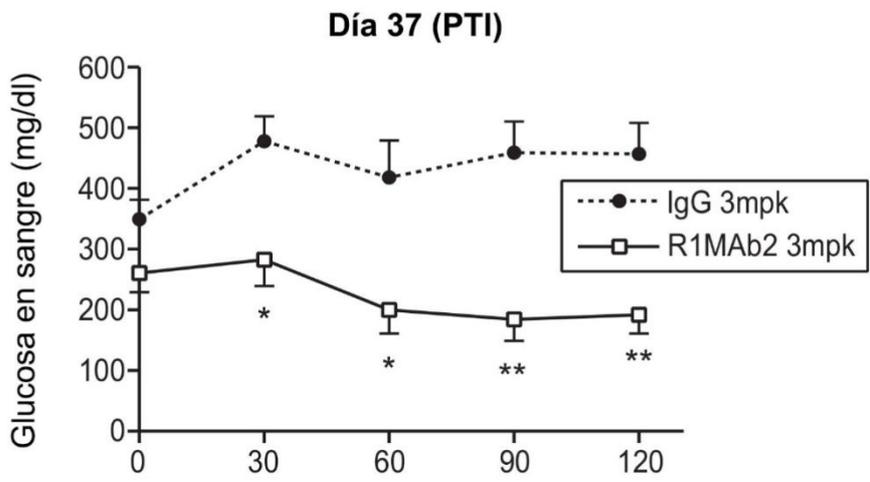


FIG. 6D

FIG. 7A

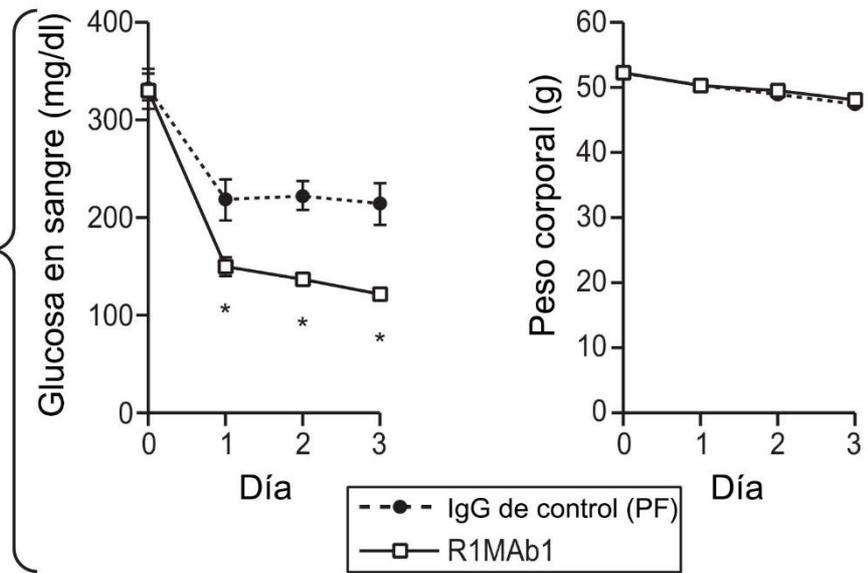


FIG. 7B

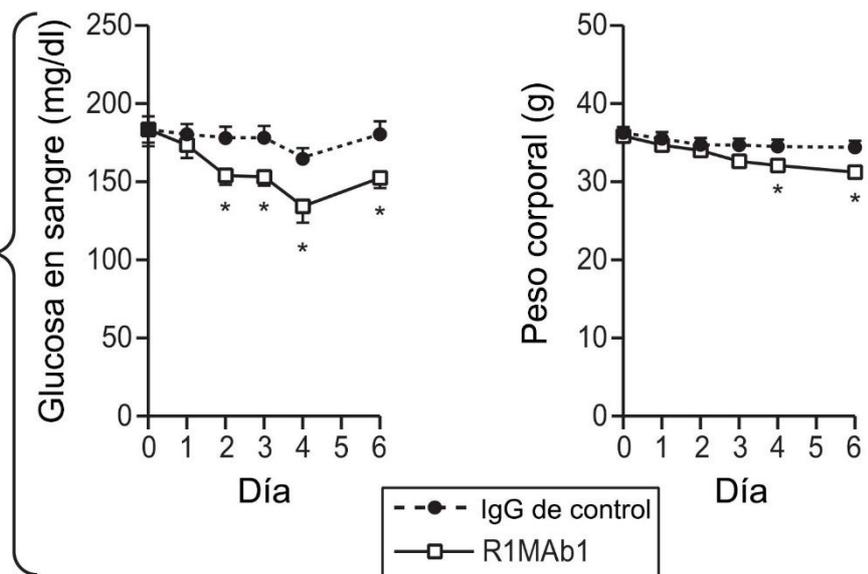
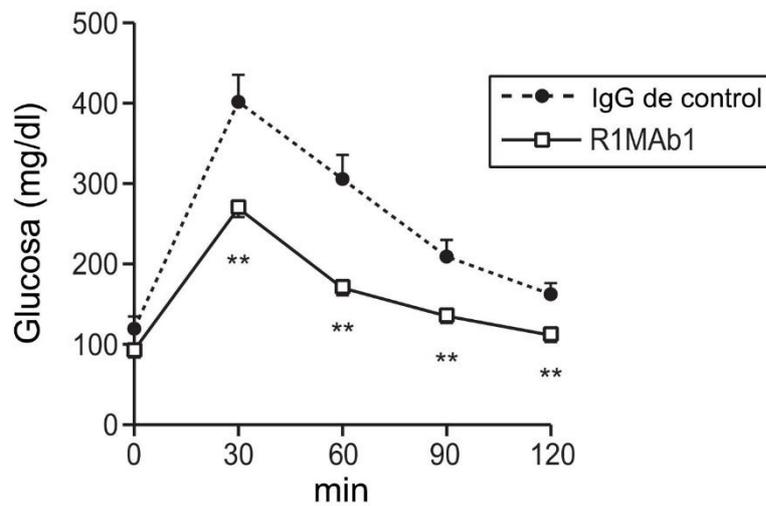
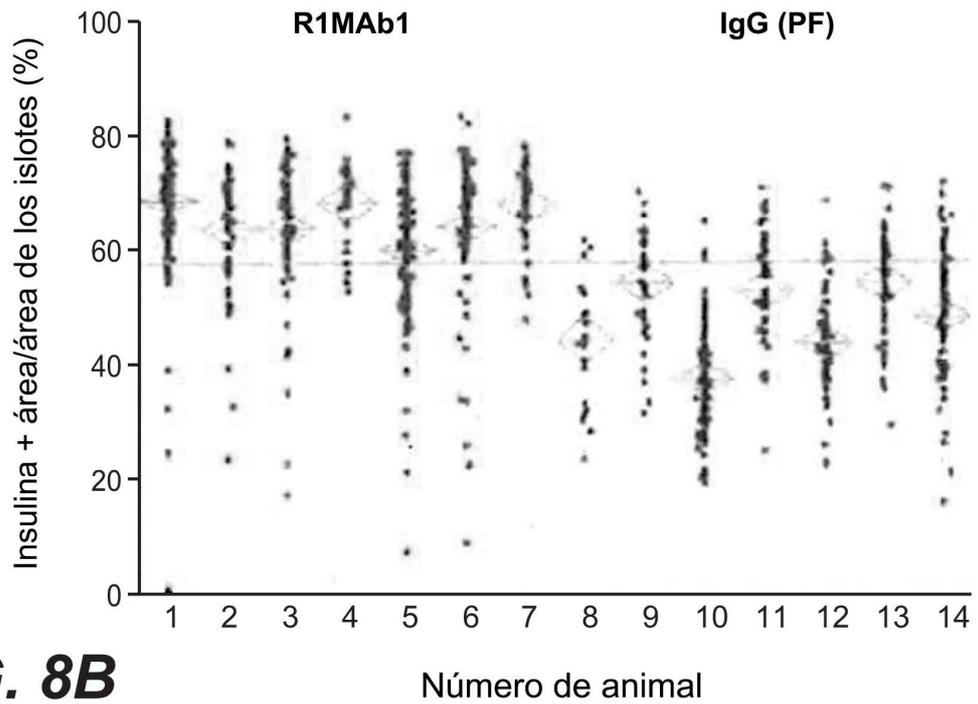
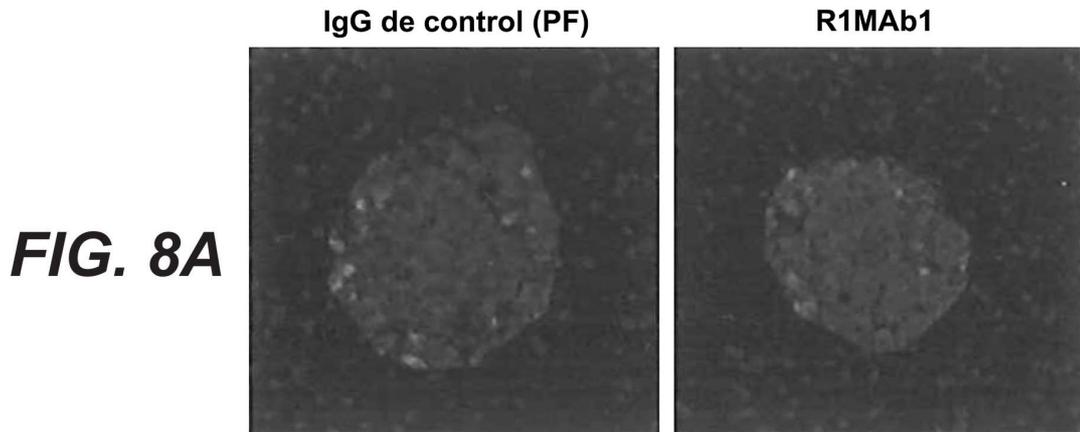
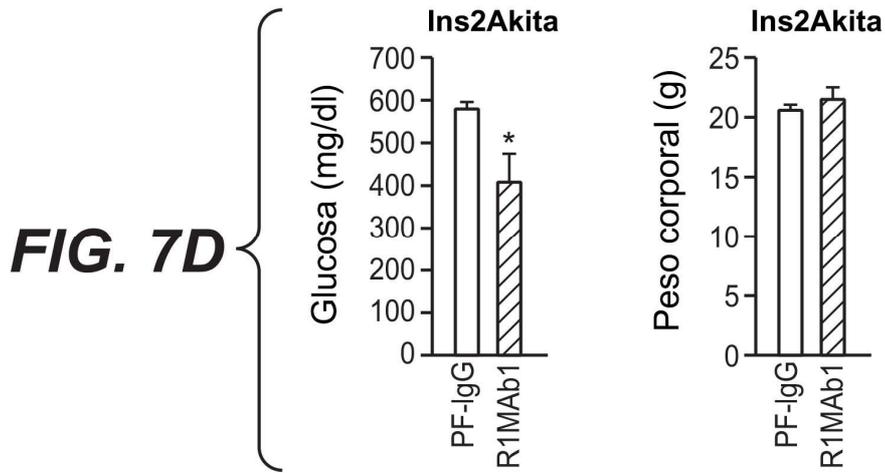


FIG. 7C





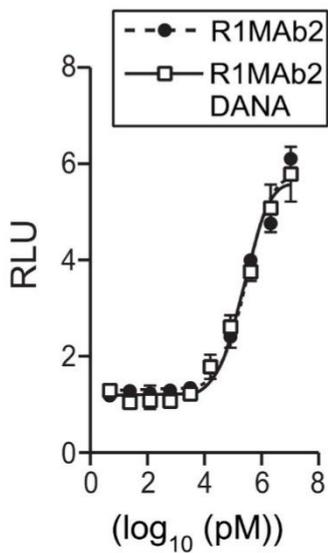


FIG. 9B

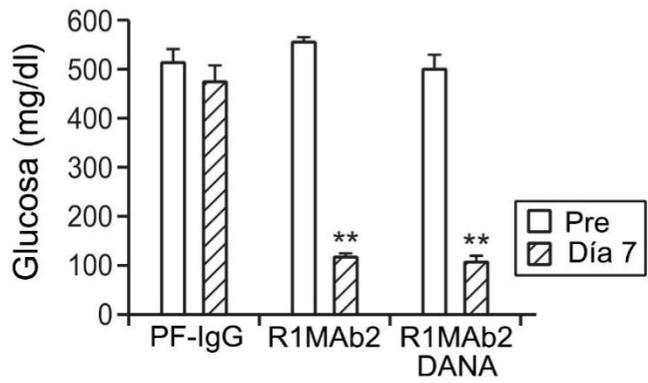


FIG. 9C

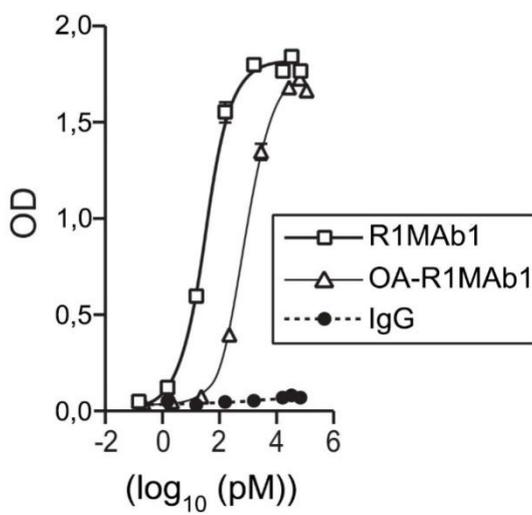


FIG. 9D

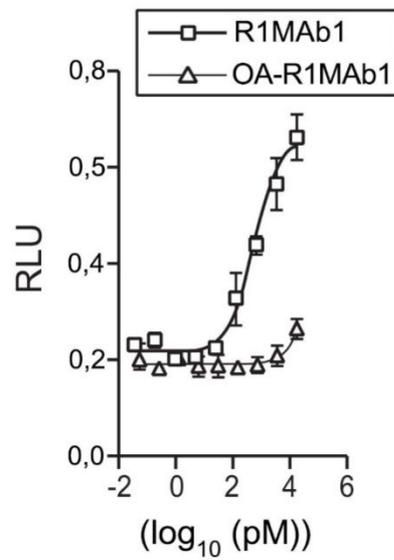


FIG. 9E

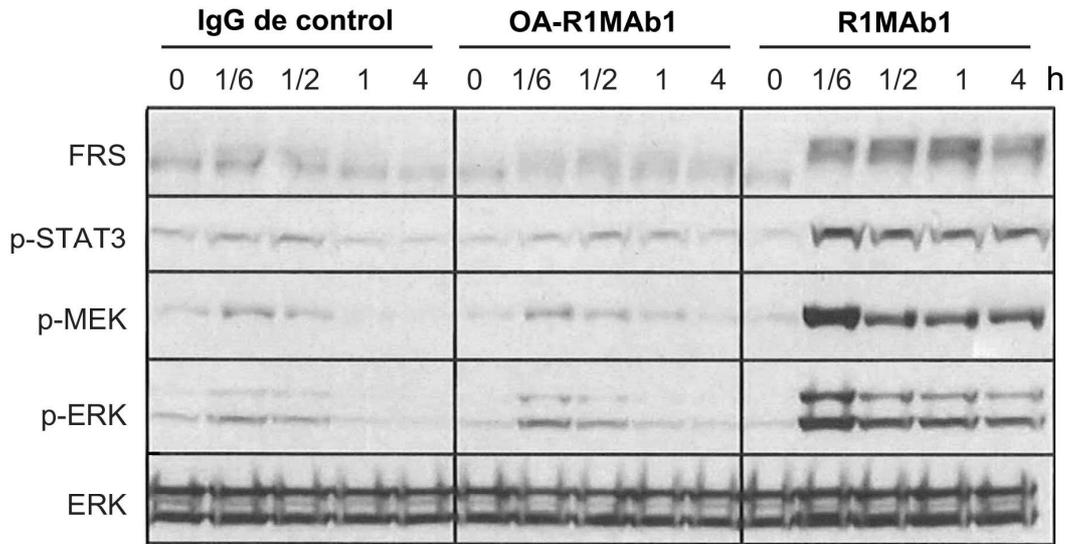


FIG. 9F

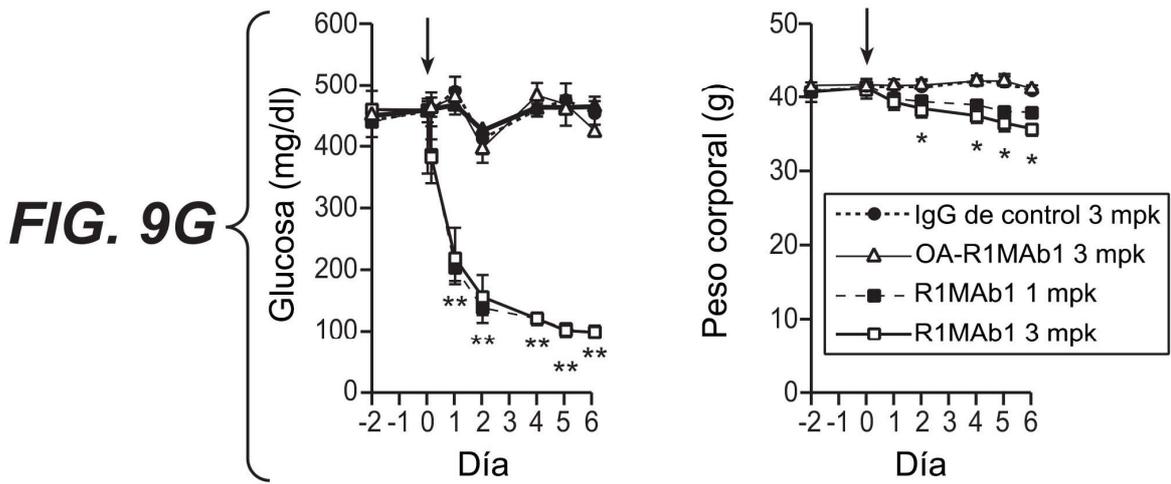


FIG. 9G

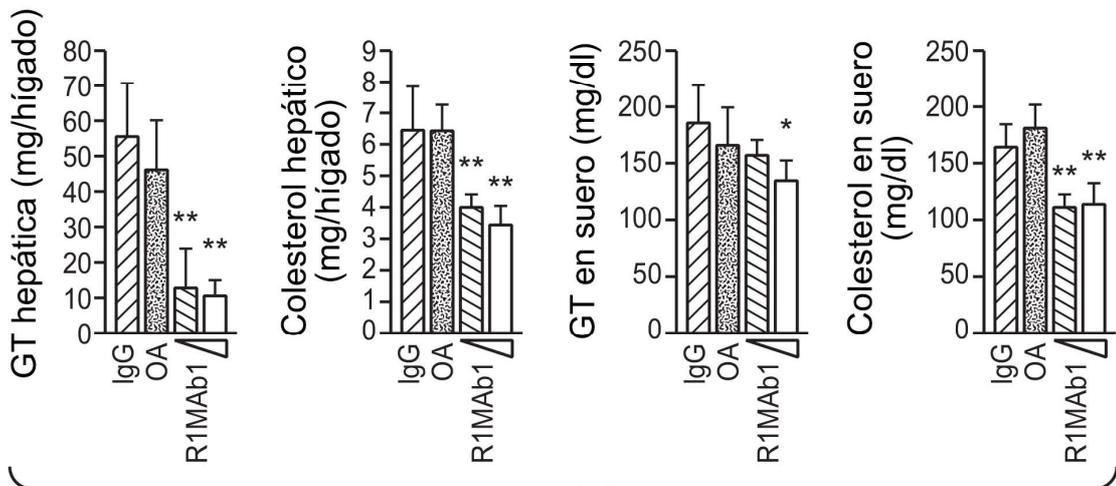


FIG. 9H

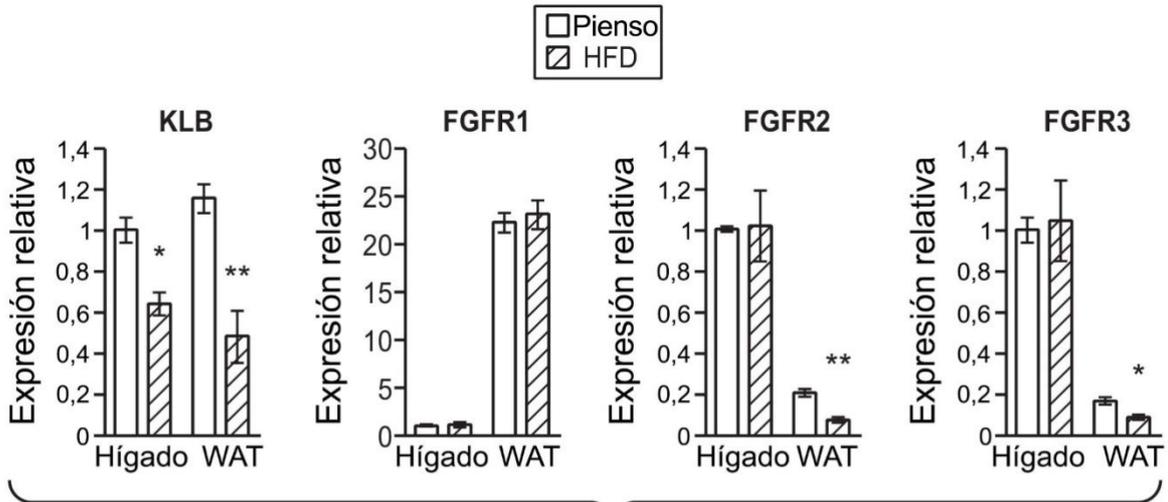


FIG. 10

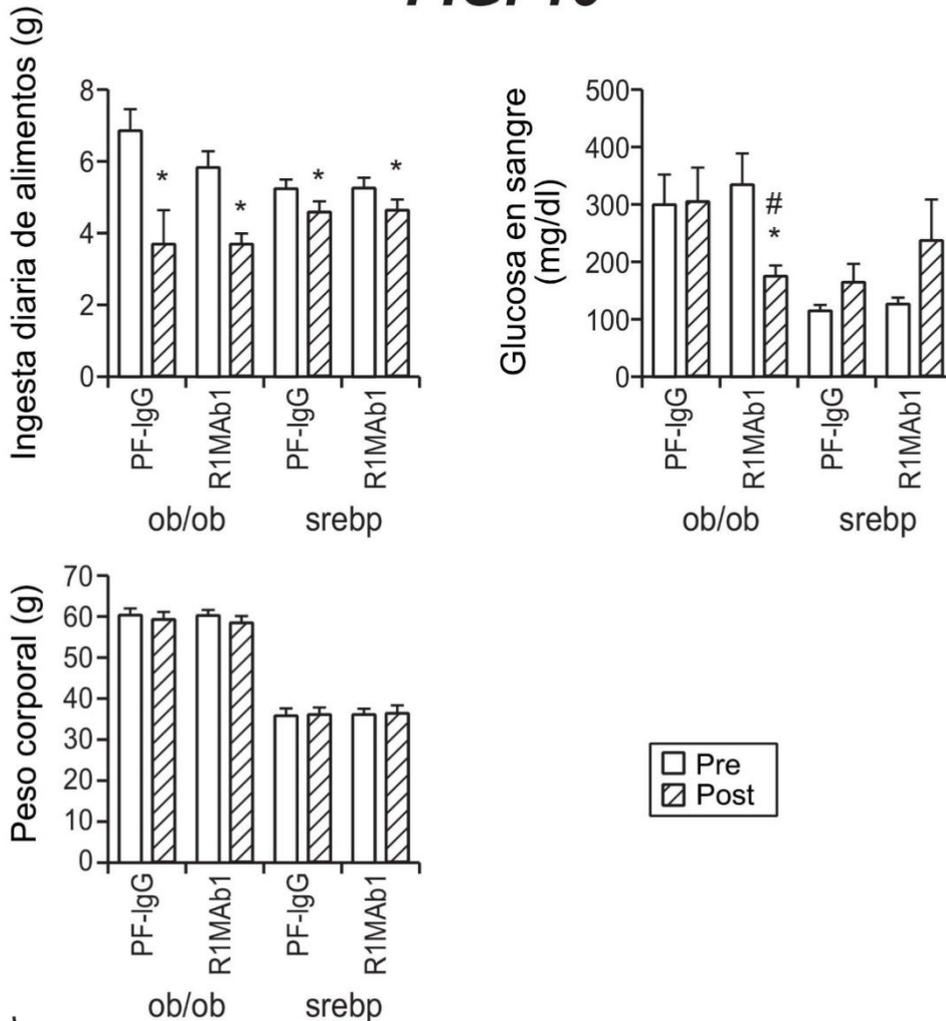


FIG. 11

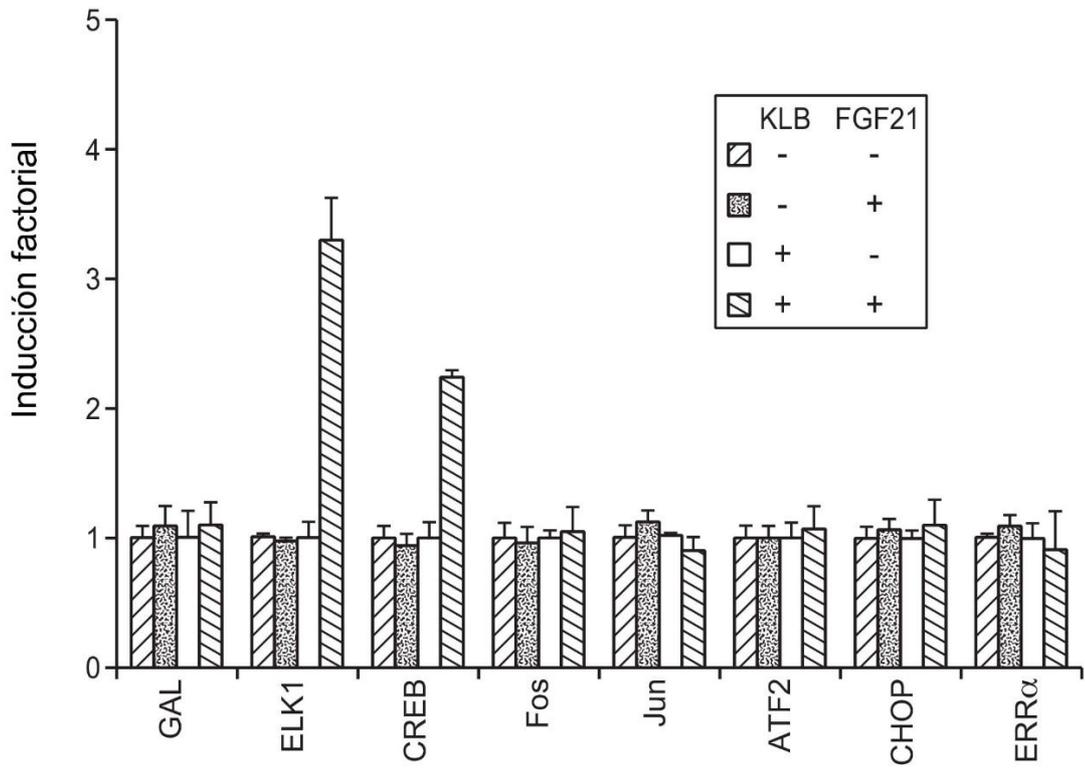


FIG. 12A

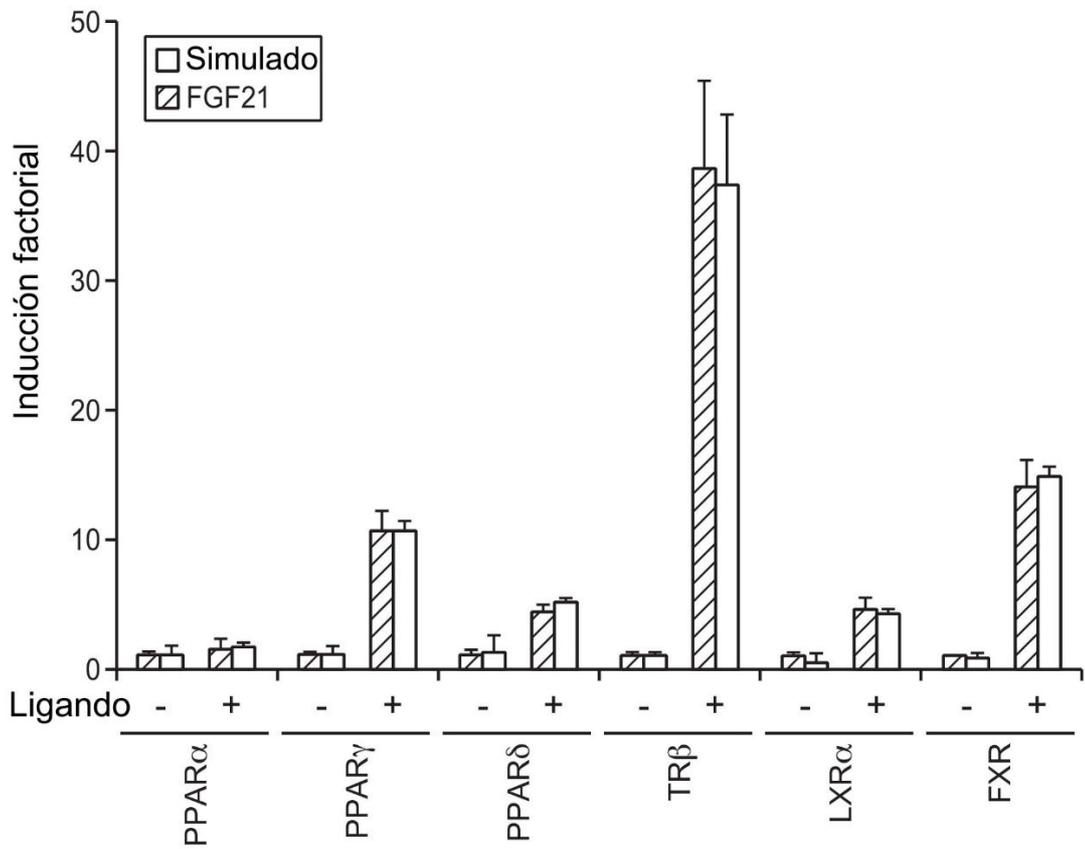


FIG. 12B

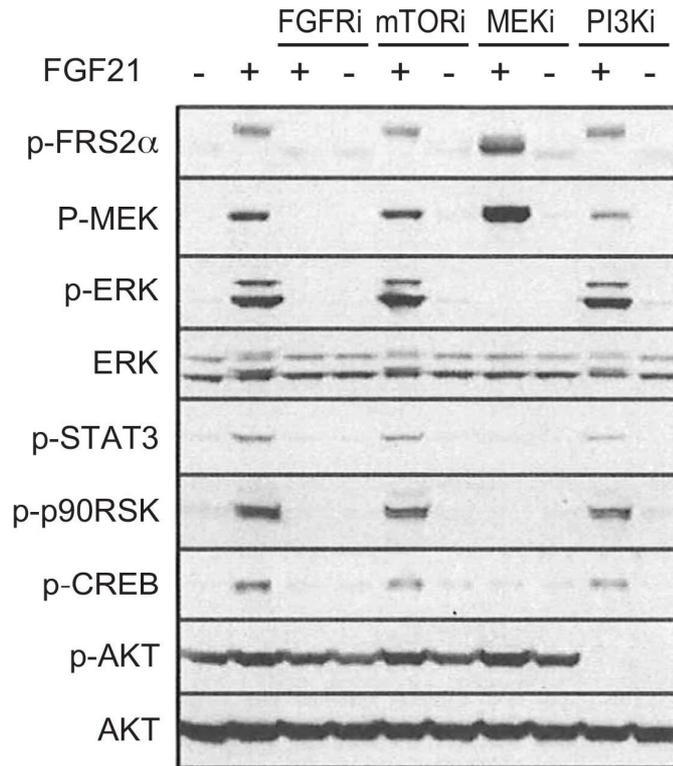


FIG. 12C

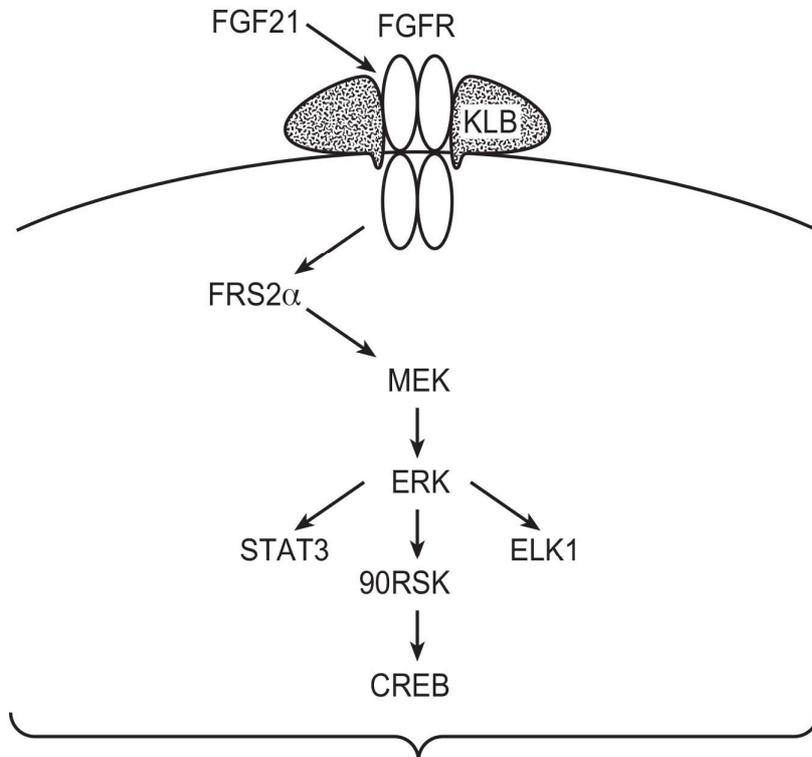
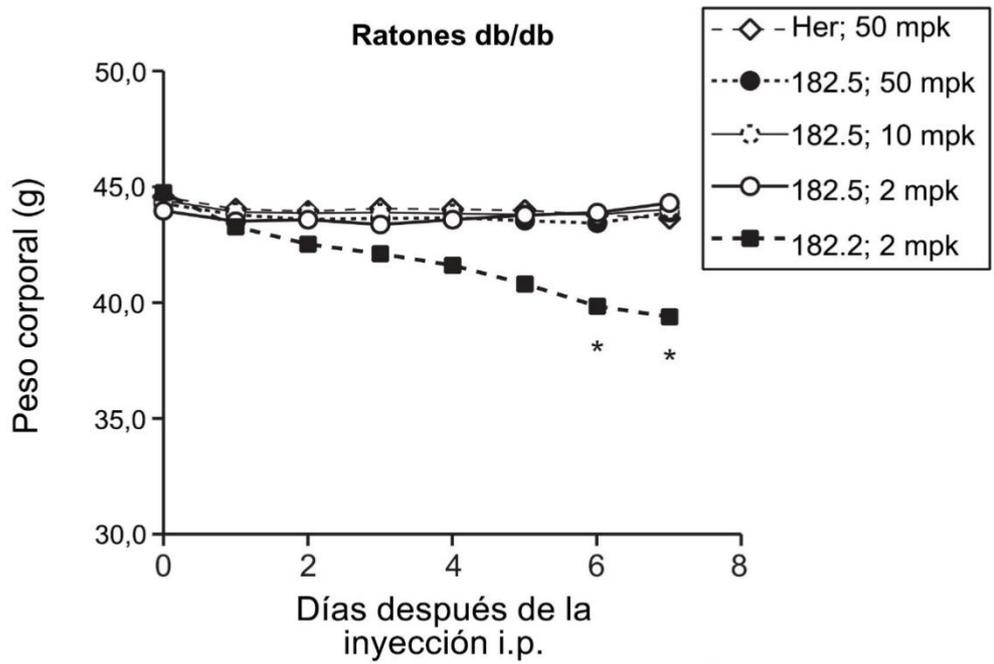
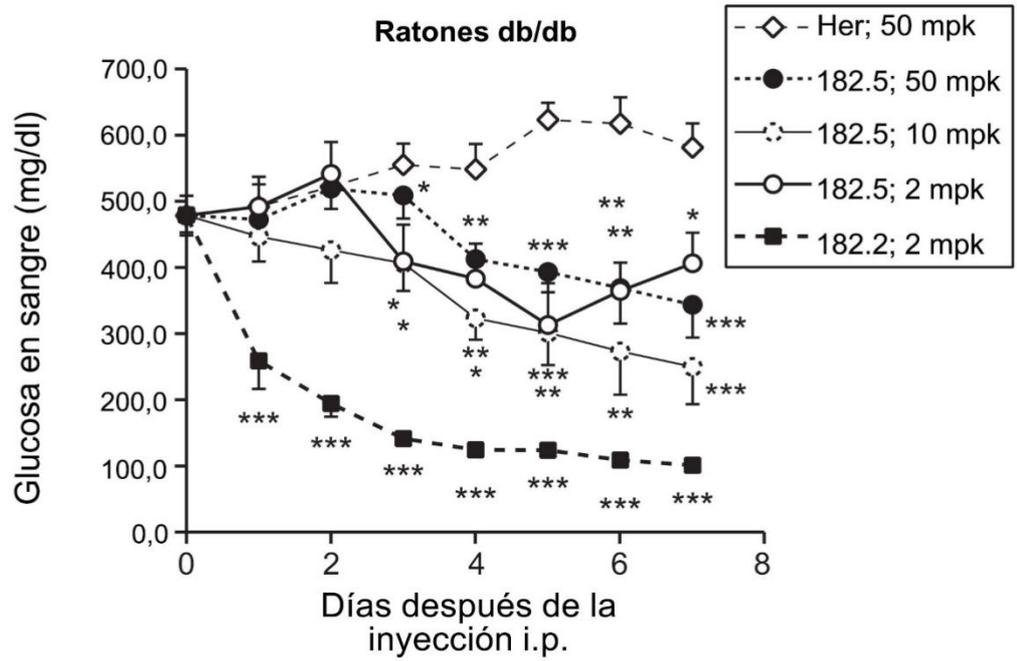


FIG. 12D



* p < 0,05
 ** p < 0,005
 *** p < 0,0005

FIG. 13

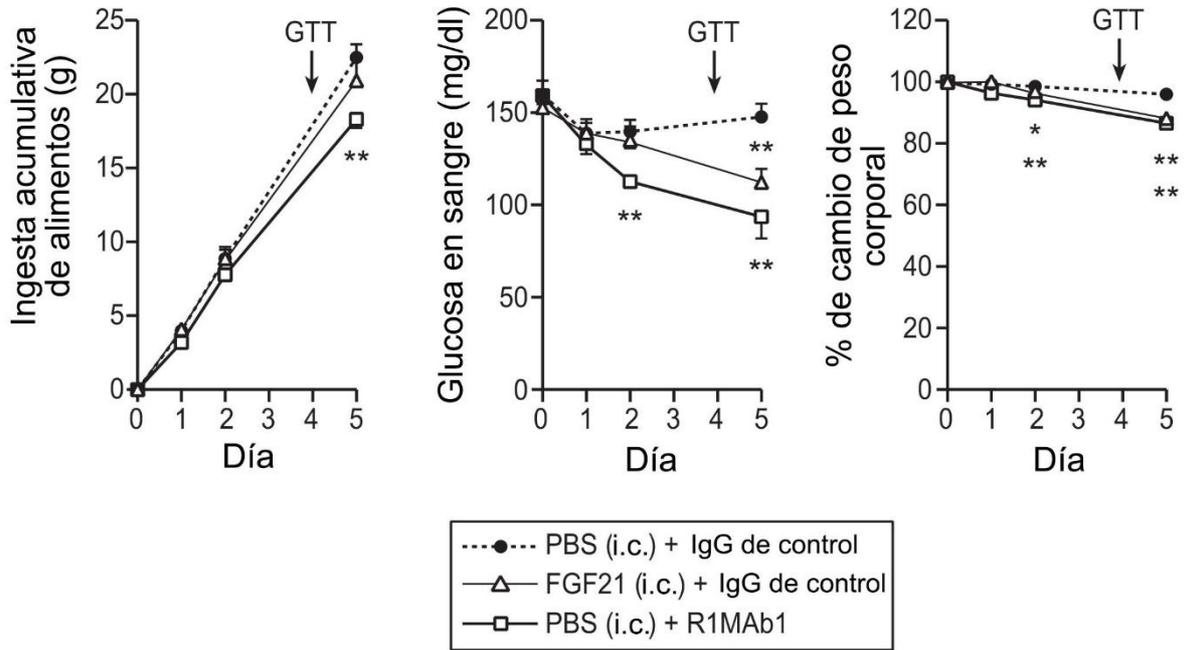


FIG. 14A

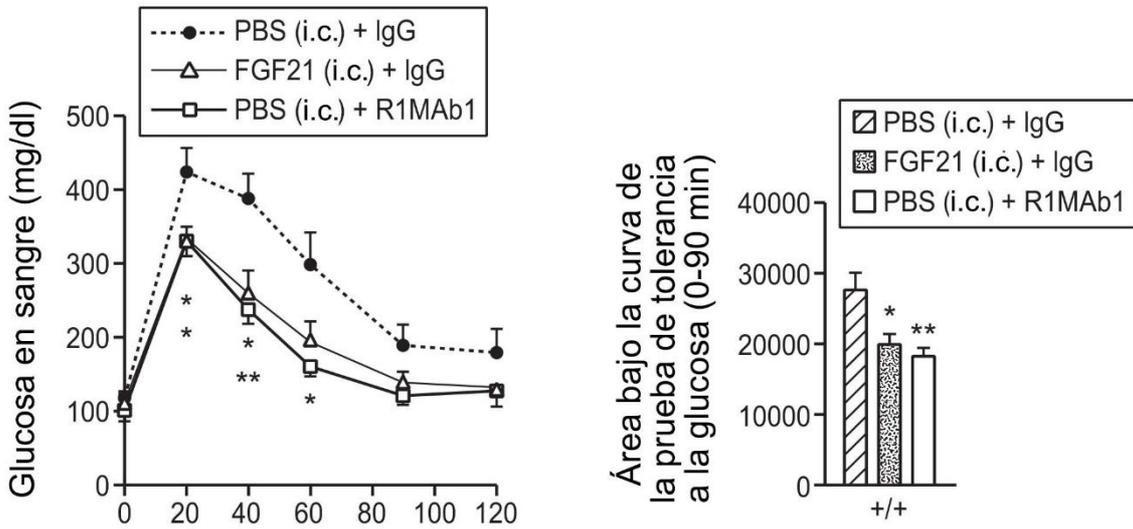


FIG. 14B

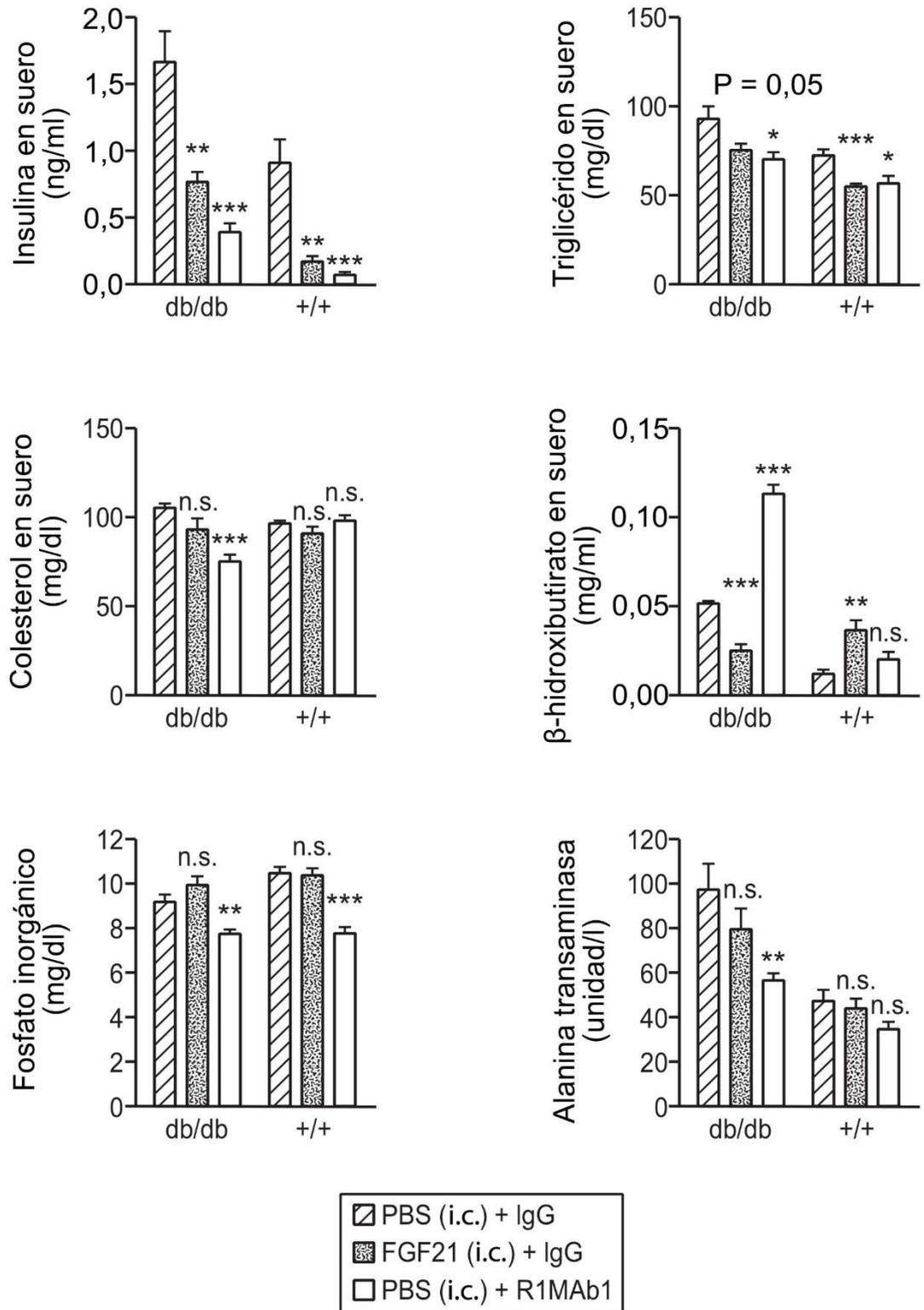


FIG. 14C

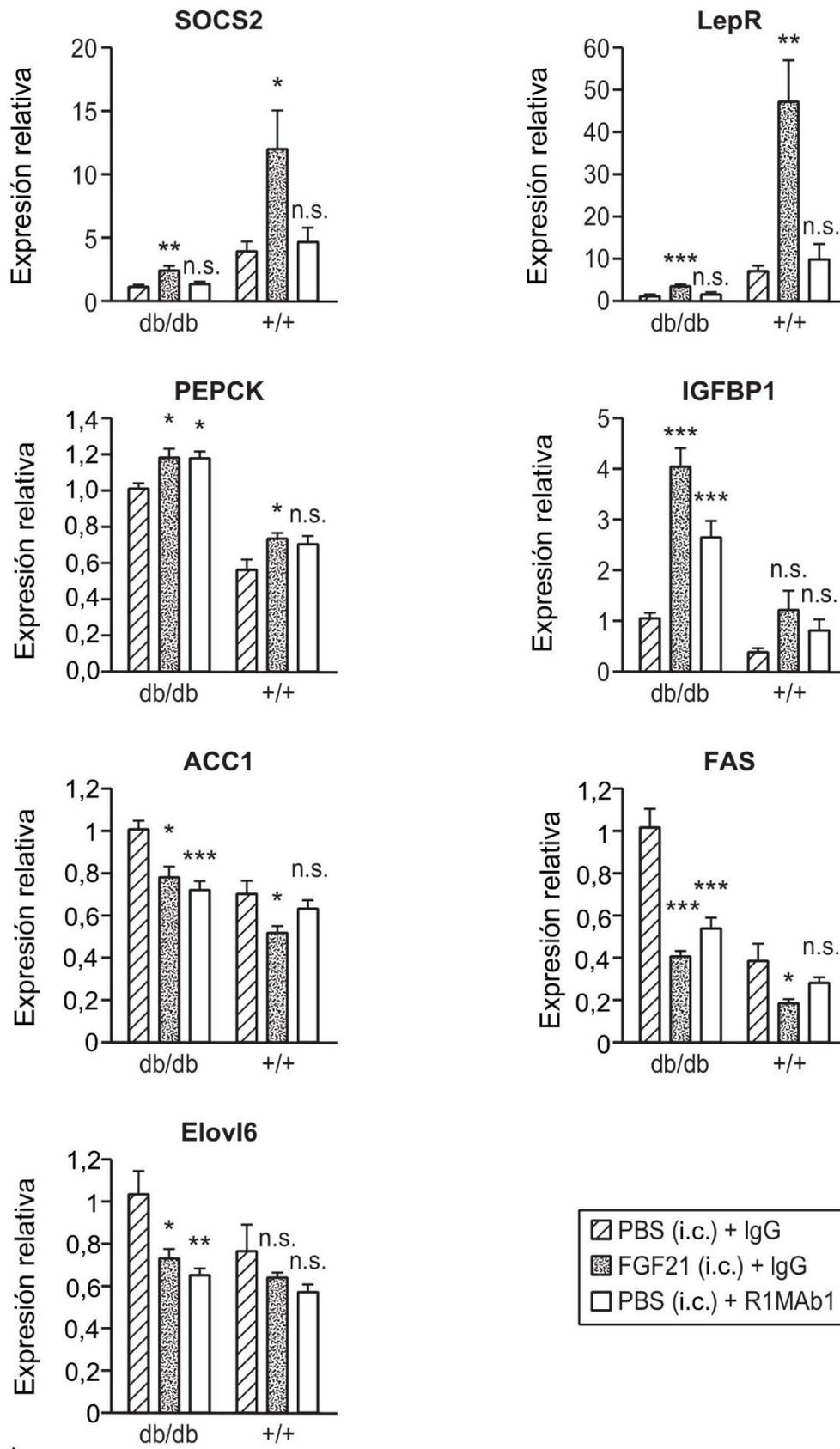


FIG. 15

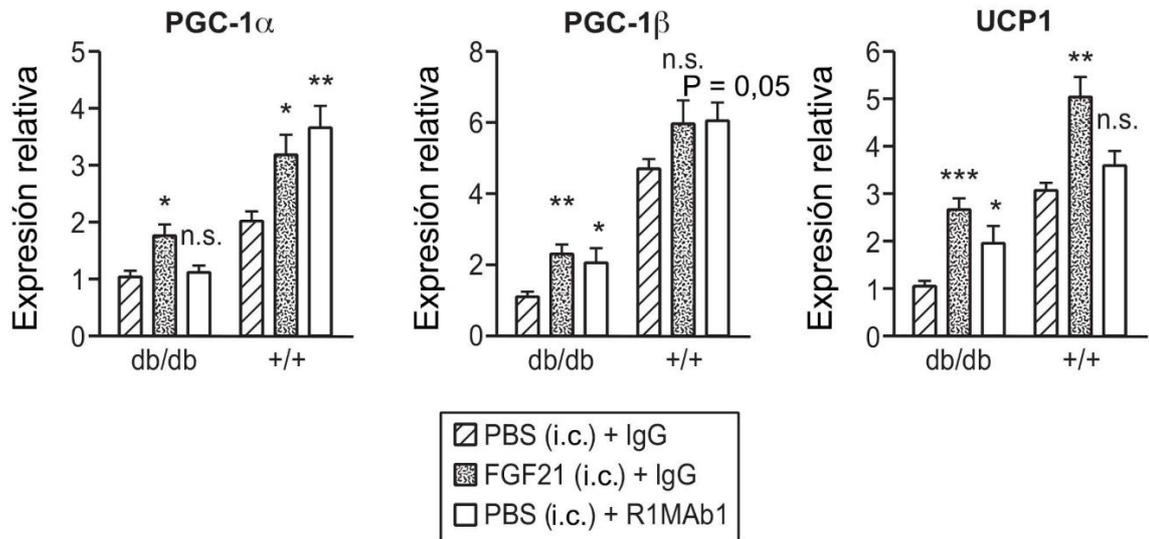


FIG. 16

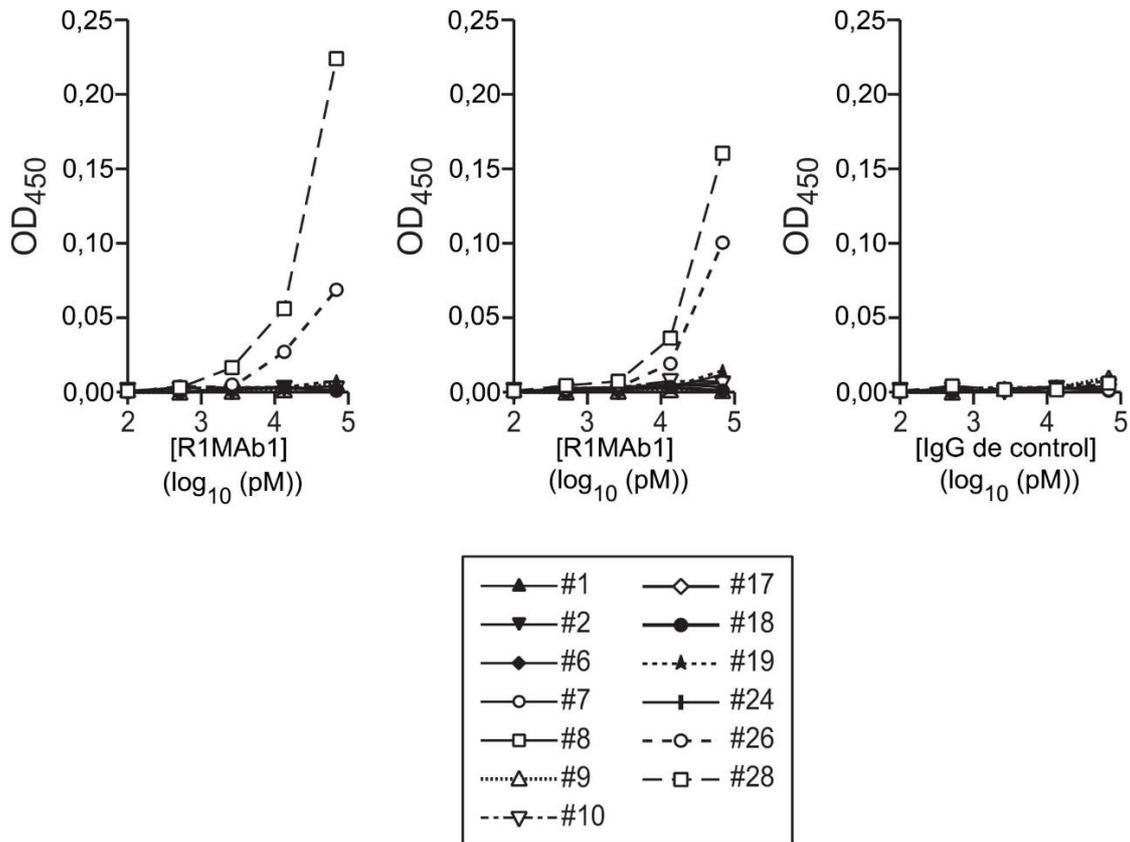


FIG. 17A

161 212
 ...MEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATW...
 FGFR1: KLHAVPAAKTVKFKCP (#26) FKPDHRIGGYKVRY (#28)
 FGFR2: RLHAVPAANTVKFRCP FKQEHRRIGGYKVRN
 FGFR3: KLLAVPAANTVRFRCF FRGEHRRIGGIKLRH
 FGFR4: KLHAVPAGNTVKFRCP FHGENRIGGIQLRH

FIG. 17B

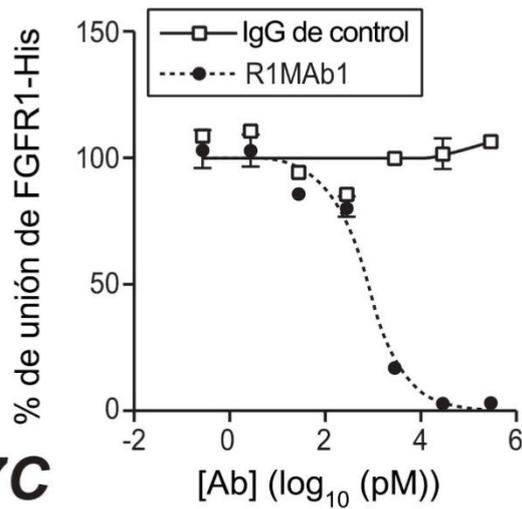


FIG. 17C

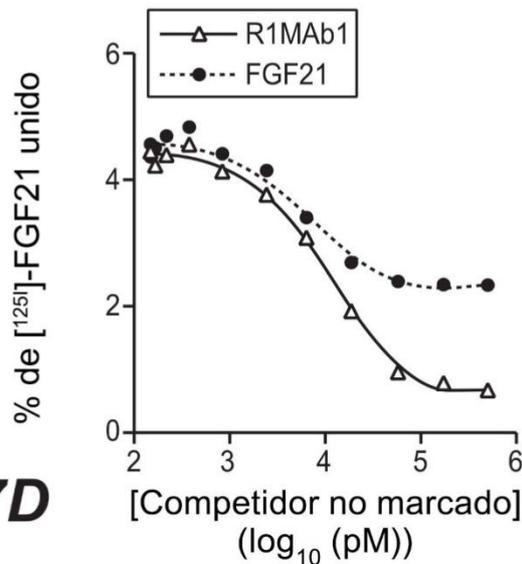


FIG. 17D