

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 340**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015 PCT/US2015/012731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015 E 15740600 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3097122**

54 Título: **Anticuerpos que se unen al dominio de beta klotho 2 y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

24.01.2014 US 201461931531 P

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

26.02.2021

73 Titular/es:

**NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
333 Oyster Point Blvd.
South San Francisco CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MONDAL, KALYANI;
LI, BETTY CHAN;
CHEN, YU;
ARORA, TARUNA;
MATERN, HUGO y
SHEN, WENYAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 808 340 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen al dominio de beta klotho 2 y procedimientos de uso de los mismos

5 CAMPO

La presente descripción se refiere en general a proteínas de unión, tales como anticuerpos, que se unen a beta klotho, incluyendo beta klotho humano, y los procedimientos de su uso.

10 ANTECEDENTES

Beta klotho, que pertenece a la familia de Klotho, es una proteína de membrana tipo I de un solo paso. Beta klotho tiene un dominio extracelular que consiste en dos repeticiones internas que comparten homología con miembros de la familia 1 glicosidasas pero carecen de actividad catalítica glucosidasa. La expresión de beta klotho se detecta principalmente en el hígado, el páncreas y el tejido adiposo. Ito y sus compañeros informaron que los ratones con deficiencia de beta klotho (KLB^{-/-}) tienen niveles elevados de ARNm de CYP7A1 y CY8B1 y presentan una mayor síntesis y excreción de ácido biliar (Ito y col, 2005, J Clin Invest 115: 2202-2208). Beta klotho forma un complejo con los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y funciona como una co-receptor para los FGF, incluyendo FGF19 y FGF21.

Se han identificado 22 miembros de la familia FGF humana y se han identificado cuatro receptores de tirosina quinasa que se unen a FGF (FGFR1-FGFR4). La interacción entre FGF y su receptor da como resultado la dimerización de FGFR, que permite que los dominios citoplasmáticos del receptor se transfosforilen y se activen, lo que a su vez conduce a la fosforilación y activación de las moléculas de señalización aguas abajo.

El receptor de alta afinidad para FGF19 es FGFR4 y la unión de FGF19 a FGFR4 se ve facilitada por beta klotho. Se ha informado de que los ratones transgénicos FGF19 tienen una adiposidad disminuida, una tasa metabólica aumentada, triglicéridos hepáticos reducidos, una oxidación aumentada de ácidos grasos, niveles reducidos de glucosa y una sensibilidad aumentada a la insulina. (Tomlinson y col, 2002, Endocrinology 143:1741-1747). Además, se informó de estos ratones transgénicos no se volvieron obesos o diabéticos con una dieta alta en grasas (Tomlinson y col, 2002, Endocrinology 143: 1741-1747). También se ha informado de que el tratamiento con FGF19 previno o revirtió la diabetes en ratones obesos por ablación genética del tejido adiposo marrón o la ausencia genética de leptina (Fu y col, 2004, Endocrinology 145: 2594-2603).

FGF21 actúa a través de la interacción de FGFR y beta klotho. FGFR1 es un receptor abundante en el tejido adiposo blanco y es muy probable que sea el principal receptor funcional para FGF21 en el tejido adiposo blanco. La expresión de FGF21 se detecta en el hígado, el timo, el tejido adiposo, y las células beta de los islotes en el páncreas. Se ha informado de que la interacción de FGF21 con el complejo beta klotho-FGFR estimula la captación de glucosa, disminuye la secreción de glucagón, mejora la sensibilidad a la insulina y la eliminación de la glucosa, promueve el tejido adiposo blanco en respuesta al ayuno, aumenta la cetogénesis en el hígado en respuesta al ayuno, reduce los niveles de triglicéridos en plasma, y aumenta el gasto de energía (Iglesias y col, 2012, European Journal of Endocrinología 167: 301-309).

Dado que FGF19 y FGF21 requieren tanto FGFR como beta klotho para la señalización celular, los agentes que imitan a FGF19 y/o FGF21 pueden ser deseables por sus efectos o el metabolismo de la glucosa o el metabolismo de los lípidos. Sin embargo, no está claro qué características son necesarias para que un agente confiera actividad de señalización celular de tipo FGF-19 o de tipo FGF-21.

El documento US 2011/135657 y US 2012/328616 describen anticuerpos que se unen a beta-klotho y/o un complejo que comprende beta-klotho y uno de FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4 para inducir la señalización de tipo FGF21. www.rndsystems.com/pdf/MAB3738.pdf (recuperado de Internet el 2011-02-21; "Monoclonal Anti-human/mouse Klotho beta Antibody" 6 de febrero de 2007) describe un anticuerpo que se une a beta klotho humano/de ratón.

RESUMEN

La presente descripción proporciona proteínas que se unen a beta klotho, incluyendo las proteínas de unión tales como los anticuerpos que se unen a beta klotho. Tales proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos, se pueden unir a un polipéptido beta klotho, un fragmento beta Klotho y/o un epítipo beta klotho. Tales proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos, pueden ser agonistas (por ejemplo, inducen señalización de tipo FGF19 o FGF21 de un receptor de FGF o activan un complejo receptor beta klotho/FGFr).

La presente descripción también proporciona proteínas de unión, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, que (i) se unen a beta klotto humano, (ii) inducen señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21, y (iii) no compiten con FGF19 y/o FGF21 para la interacción con beta klotto.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une dentro del dominio beta klotto 2 (KLB2) que comprende los residuos de aminoácidos 657 a 703 de beta klotto humano (SEQ ID NO:297), donde el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende:

10 una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:12, o la SEQ ID NO:13;
una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:14; y
una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:15;

y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende:

15 una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:16;
una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:11; y
una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:17.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:1, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:2, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:3; y

25 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:4, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:5, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende:

30 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:12, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:2, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:3; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:4, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:5, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende:

35 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:13, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:14, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:15; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:16, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:11, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:17.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:26.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:26.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:271 y una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:276.

50 En algunas realizaciones el anticuerpo se une a un epítipo que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos 657, 701 y/o 703 del beta klotto humano (SEQ ID NO:297).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un anticuerpo quimérico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, (scFv)₂, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo de región variable dual, un anticuerpo de región variable única, un anticuerpo lineal, la región V, o un anticuerpo multispecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpos.

60 La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de la invención.

La presente invención también proporciona un vector que comprende el polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de la invención.

5 La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o el vector que comprende el polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

La presente invención también proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento para mejorar el metabolismo de la glucosa en un sujeto.

15 En algunas realizaciones del uso del anticuerpo de la invención en un procedimiento para mejorar el metabolismo de la glucosa en un sujeto, el procedimiento para mejorar el metabolismo de la glucosa da como resultado:

- (a) niveles reducidos de glucosa;
- (b) niveles reducidos de insulina;
- (c) aumento de la sensibilidad a la insulina;
- 20 (d) reducción de la resistencia a la insulina;
- (e) mejora de la tolerancia a la glucosa; y/o
- (f) mejora de la función pancreática.

25 La presente invención también proporciona el anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la dislipidemia, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), la enfermedad cardiovascular, el síndrome metabólico, la obesidad, o la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés).

30 En algunas realizaciones del uso inventivo del anticuerpo, el procedimiento comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos en combinación con el anticuerpo.

35 En algunas realizaciones del uso inventivo del anticuerpo, el uno o más agentes terapéuticos se seleccionan de entre el grupo que consiste en biguanidas, sulfonilureas, tiazolidinedionas, análogos de GLP-1, agonistas de PPAR gamma, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), bromocriptina, secuestrantes de ácidos biliares, insulina, inhibidores de la alfa glucosidasa, metformina, inhibidores de SGLT-2, agentes de supresión del apetito y fármacos para la pérdida de peso.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-beta klotho son anticuerpos humanizados que se unen a un polipéptido betaklotho, un fragmento beta Klotho, o un epítipo beta klotho. El anticuerpo anti-beta klotho comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL de un anticuerpo monoclonal designado 5H23, como se describe en esta invención, o una variante humanizada del mismo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-beta klotho puede comprender además una FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, FR4 VH, FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL y/o FR4 VL de una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina humana o una variante de la misma.

45 En esta invención se describe una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo anti-beta klotho) que comprende seis CDR o menos de seis CDR. Una proteína de unión descrita en esta invención (*por ejemplo* un anticuerpo anti-beta klotho) comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR seleccionadas de entre CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL. El anticuerpo anti-beta klotho de la invención comprende seis CDR seleccionadas de entre CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL de un anticuerpo monoclonal designado 50 como 5H23, como se describe en esta invención, o una variante humanizada del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-beta klotho comprende además una región de andamio o región de estructura, que incluye una FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, FR4 VH, FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL y/o FR4 VL de una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina humana o una variante de la misma.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de unión a antígeno o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un polipéptido beta klotho (*por ejemplo* un beta klotho soluble o expresado en la superficie celular), un fragmento beta klotho, o un epítipo beta klotho.

60

La presente descripción también proporciona proteínas de unión tales como anticuerpos anti-beta klotho (i) que

bloquean competitivamente (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) un anticuerpo anti-beta klotho proporcionado en esta invención para que no se una a un polipéptido beta klotho (*por ejemplo*, un beta klotho soluble o s expresado en la superficie celular), un fragmento beta klotho, o un epítopo beta klotho y/o (ii) que se unen a un epítopo beta klotho que está unido por un anticuerpo anti-beta klotho proporcionado en esta invención. Las proteínas de unión tales como el anticuerpo anti-beta klotho bloquea competitivamente *por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) el anticuerpo monoclonal 5H23 o 1G19 descrito en esta invención o una variante humanizada del mismo para que no se una a un polipéptido beta klotho (*por ejemplo*, un beta klotho soluble o expresado en la superficie celular), un fragmento beta klotho, o un epítopo beta klotho. Las proteínas de unión tales como el anticuerpo anti-beta klotho se une a un epítopo beta klotho que está unido (*por ejemplo*, reconocido) por el anticuerpo monoclonal 5H23, o 1G19 descrito en esta invención o una variante humanizada del mismo.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, que (i) se unen a un epítopo beta klotho humano y betaklotho de mono cynomologous reconocido por un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26; o (ii) compiten por la unión a beta klotho humano con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26. En esta invención se describen proteínas de unión, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se unen a una región, que incluye un epítopo, de beta klotho humano o beta klotho cyno. Los anticuerpos de la presente invención se unen a una región de beta klotho humano que comprende los residuos de aminoácidos 657 a 703 de la SEQ ID NO:297 o una región de beta klotho cyno que comprende los residuos de aminoácidos 657 a 703 de la SEQ ID NO:299.

Los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítopo específico de beta klotho humano, incluyendo: (i) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos 657, 701 y/o 703 de beta klotho humano (SEQ ID NO:297); (ii) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos el residuo de aminoácido 657 de la SEQ ID NO:297; (iii) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos el residuo de aminoácido 701 de la SEQ ID NO:297; (iv) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos el residuo de aminoácido 703 de la SEQ ID NO:297; (v) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos los residuos de aminoácidos 657 y 701 de la SEQ ID NO:297; (vi) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos los residuos de aminoácidos 657 y 703 de la SEQ ID NO:297; (vii) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos los residuos de aminoácidos 701 y 703 de la SEQ ID NO:297; o (viii) un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos los residuos de aminoácidos 657, 701 y 703 de la SEQ ID NO:297. Tales anticuerpos proporcionados anteriormente pueden inducir señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21 o activar un complejo receptor beta klotho/FGF en una célula que expresa beta klotho humano y un receptor de FGF. Además, en algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, *por ejemplo*, un anticuerpo humanizado o quimérico.

Los anticuerpos anti-beta klotho proporcionados en esta invención pueden estar conjugados o unidos de forma recombinante a un agente de diagnóstico, agente detectable o agente terapéutico. En algunos aspectos, el agente terapéutico es un fármaco, que incluye uno o más fármacos tales como biguanidas y sulfonilureas (*por ejemplo*, metformina, tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida, tolazamida, glibenclamida, gliburida y glipizida), tiazolidinedionas (*por ejemplo*, rosiglitazona, pioglitazona), análogos de GLP-1, agonistas de PPAR gamma (*por ejemplo*, pioglitazona y rosiglitazona), dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) inhibidores, (*por ejemplo*, JANUVIN®, ONGLYZA®) formulaciones de bromocriptina y secuestrantes de ácidos biliares (*por ejemplo* colesevelam), e insulina (*por ejemplo*, análogos de bolo y basales), inhibidores de la alfa glucosidasa (*por ejemplo*, acarbosa, roglitose), metformina (*por ejemplo*, clorhidrato de metformina) con o sin una tiazolidinediona (TZD), inhibidores de SGLT-2, fármacos para la supresión del apetito o pérdida de peso (*por ejemplo*, Meridia®/sibutramina, Xenical®/ortostat). En algunos aspectos, el agente detectable es un radioisótopo, una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente o un compuesto quimioluminiscente.

En determinadas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-beta klotho de la invención. También se proporcionan en esta invención composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo beta klotho de la invención.

La presente descripción también proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican una cadena pesada de inmunoglobulina, una cadena ligera de inmunoglobulina, la región VH, la región VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, y/o CDR3 VL de proteínas de unión (*por ejemplo*, anticuerpos anti-beta klotho) que se unen a un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho o un epítopo beta klotho. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una región VH, una región VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL de un anticuerpo monoclonal designado como 5H23, como se describe en esta invención, o una variante humanizada del mismo. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica además una

región de andamio o región de estructura, que incluye FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, FR4 VH, FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL y/o FR4 VL de una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina humana o una variante de la misma. También se proporcionan en esta invención vectores y células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de unión tal como un anticuerpo anti-beta klotho, así como procedimientos de producción de una proteína de unión tal como un anticuerpo anti-beta klotho mediante el cultivo de las células huésped proporcionadas en esta invención en condiciones que promueven la producción de una proteína de unión tal como un anticuerpo anti-beta klotho.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en procedimientos de tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, uno o más síntomas) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-beta klotho a un sujeto, incluyendo un sujeto que lo necesita, tratando, previniendo o aliviando, de este modo la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección es causado por, o asociado de otro modo con beta klotho, tales como los relacionados con la señalización de tipo FGF19y/o FGF21 en un sujeto. En determinadas realizaciones, la enfermedad es tratable mediante la reducción de los niveles de glucosa en sangre, insulina o de lípidos en suero (*por ejemplo*, diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico).

En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección se relaciona con el metabolismo de la glucosa o el metabolismo de los lípidos. En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección se selecciona de entre el grupo de una afección hiperglucémica. (*por ejemplo*, diabetes, tal como diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico u obesidad).

El uso en procedimientos de tratamiento, prevención o mejora incluyen procedimientos para mejorar el metabolismo de la glucosa y/ procedimientos para mejorar el metabolismo de los lípidos. El uso en procedimientos de tratamiento, prevención o mejora da como resultado niveles reducidos de glucosa (*por ejemplo*, la reducción de glucosa en sangre), aumento de la sensibilidad a la insulina, reducción de la resistencia a la insulina, reducción de glucógeno, mejor tolerancia a la glucosa, mejor tolerancia a la glucosa, mejora del metabolismo de la glucosa, mejora de la homeostasis, mejora de la función pancreática, reducción de triglicéridos, reducción del colesterol, reducción de LDL, reducción de LDL, reducción de VLDL, disminución de la presión sanguínea, disminución del engrosamiento interno de un vaso sanguíneo y/o disminución de la masa corporal o el aumento de peso.

La presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociado con FGF19 humano y/o FGF21 humano, que incluye cualquier enfermedad, trastorno o afección cuyo inicio en un sujeto (*por ejemplo*, un paciente) es causado al menos en parte, por la inducción de señalización de tipo FGF19 y/o FGF21, que se inicia *in vivo* por la formación de un complejo que comprende FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c o FGFR4 y beta klotho y FGF19 o FGF21. La gravedad de la enfermedad o afección también se puede disminuir por la inducción de señalización tipo FGF19 y/o FGF21. Los ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden tratarse con las proteínas de unión, tales como anticuerpos anti-beta klotho incluyen diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedad cardiovascular, y síndrome metabólico.

Como tal, las proteínas de unión tales como los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención pueden usarse para tratar la diabetes tipo 2, la obesidad, la dislipidemia (*por ejemplo*, hipertrigliceridemia), NASH, la enfermedad cardiovascular, y/o el síndrome metabólico, así como cualquier enfermedad, trastorno, o afección en el que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21, o se pueden emplear como un tratamiento profiláctico administrado, por ejemplo, diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente, bianualmente, etc., para prevenir o reducir la frecuencia y/o gravedad de los síntomas (*por ejemplo*, niveles elevados de glucosa en plasma, niveles elevados de triglicéridos y colesterol), incluyendo, por ejemplo, proporcionar de este modo un perfil de factor de riesgo glucémico y/o cardiovascular mejorado. La presente descripción proporciona procedimientos para mejorar los parámetros metabólicos mediante la administración a un sujeto de una proteína de unión, incluyendo un anticuerpo o fragmento del mismo como se describe en esta invención o una composición farmacéutica descrita en esta invención, incluyendo, por ejemplo, donde la mejora incluye una disminución en el peso corporal, el índice de masa corporal, la circunferencia abdominal, el espesor del pliegue de la piel, la glucosa, la insulina y/o los triglicéridos.

La presente descripción también proporciona procedimientos para inducir la señalización de células de tipo FGF19 o FGF21 que tienen expresión de beta klotho en la superficie celular y uno o más receptores de FGF, tales como FGFR1, FGFR2, FGFR3 o FGFR4 que comprende poner en contacto las células con una cantidad efectiva de una proteína de unión (*por ejemplo*, un anticuerpo) que se une a beta klotho como se describe en esta invención. En algunas realizaciones, la célula es un adipocito o hepatocito. En otras realizaciones, la célula es una célula transfectada con un gen que codifica beta klotho y, opcionalmente, un gen que codifica un receptor de FGF. Los procedimientos

adicionales proporcionados incluyen el uso de un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención, con la actividad para mediar los efectos de señalización de tipo FGF19 y/o FGF21.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en procedimientos de modulación de una señalización de tipo FGF19- o FGF21 en un sujeto que comprende administrar una cantidad efectiva de una proteína de unión tal como un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención a un sujeto, incluyendo un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, la modulación comprende una activación de tipo FGF19. En algunas realizaciones, la modulación comprende una activación de tipo FGF21. En algunas realizaciones, la modulación comprende aumentar el metabolismo de la glucosa (*por ejemplo*, reducir los niveles de glucosa tal como los niveles de glucosa en sangre).

La presente descripción también proporciona procedimientos para detectar beta klotho en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-beta klotho de la invención, que comprende un agente detectable. En determinadas realizaciones, la muestra comprende una célula que expresa beta klotho en su superficie.

La presente descripción también proporciona kits que comprenden una proteína de unión tal como un anticuerpo anti-beta klotho que se une a un polipéptido beta klotho, un fragmento beta klotho o un epítipo beta klotho como se describe en esta invención.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A-1B muestra una alineación de secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena ligera de los anticuerpos anti-beta klotho designados 5H23, 1C17, 1D19, 2L12, 3L3, 3N20, 4P5, 5C23, 5F7 y 1G19. Los límites de las CDR se indican por Kabat, AbM, Chothia, Contact y la numeración IMGT.

La figura 2A-1 y 2A-2 muestra alineaciones de secuencia de las regiones variables de la cadena pesada de los anticuerpos anti-beta klotho que proporcionan secuencias de consenso de CDR. La agrupación superior consiste en anticuerpos designados 5H23, 1D19, 2L12, 3L3, 4P5, 5C23 y 5F7. La agrupación inferior consiste en anticuerpos designados 1C17 y 1G19. La agrupación inferior consiste sólo en los anticuerpos designados 3N20. Los residuos variables se presentan con "X". Los límites de las CDR se indican por Kabat, AbM, Chothia, Contact y la numeración IMGT.

La figura 2B-1 y 2B-2 muestra alineaciones de secuencia de las regiones variables de la cadena ligera de los anticuerpos anti-beta klotho que proporcionan secuencias de consenso de CDR. La agrupación superior consiste en anticuerpos designados 5H23, 1D19, 2L12, 3L3, 4P5, 5C23 y 5F7. La agrupación inferior consiste en anticuerpos designados 1C17 y 1G19. La agrupación inferior consiste sólo en los anticuerpos designados 3N20. Los residuos variables se presentan con "X". Los límites de las CDR se indican por Kabat, AbM, Chothia, Contact y la numeración IMGT.

La figura 3A-1 y 3A-2 muestra una alineación de secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-beta klotho designado 5H23 con las secuencias humanizadas (vH1-vH9). Los residuos que están en negrita indican residuos ejemplares que han sido modificados desde el anticuerpo original. Los residuos que están en negrita y subrayados indican residuos alterados de nuevo a un residuo de ratón.

La figura 3B muestra una alineación de secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-beta klotho designado 5H23 con las secuencias humanizadas (vL1-vL5). Los residuos que están en negrita indican residuos ejemplares que han sido modificados. Los residuos que están en negrita y subrayados indican residuos alterados de nuevo a un residuo de ratón.

La figura 3C-1 y 3C-2 muestra una alineación de secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-beta klotho designado 5H23 con las secuencias humanizadas (v1-39a-v1-39p). Los residuos que están en negrita indican residuos ejemplares que han sido modificados.

La figura 3D-1 y 3D-2 muestra una alineación de secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-beta klotho designado 5H23 con diversas secuencias humanizadas (v3-20a-v3-20j). Los residuos que están en negrita indican residuos ejemplares que han sido modificados.

La figura 4A-4C muestra una alineación de secuencia entre polipéptidos beta klotho humanos, de ratón y quiméricos. El polipéptido quimérico chMoHu indica KLB de ratón (M1-F506)-KLB humano (S509-S1044). El polipéptido quimérico chMoHu indica KLB humano (M1-F508)-KLB de ratón (P507-S1043). Los residuos

correspondientes a los residuos de ratón están en negrita y en cursiva.

La figura 5A-5F muestra una alineación de secuencia entre polipéptidos beta klotho de diversas especies descritas en esta invención.

5

La figura 6 muestra un modelo tridimensional de los tres residuos de unión identificados (esferas oscuras) en las posiciones equivalentes en la beta-glucosidasa citosólica humana. La estructura muestra el equivalente de los residuos beta klotho521-963.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos que se unen a beta klotho, incluyendo beta klotho humano y/o cyno, se proporcionan en esta invención. Una propiedad única de tales proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos descritos en esta invención, es su naturaleza agonista, incluyendo la capacidad de imitar el efecto *in vivo* de FGF19 y/o FGF21 y para inducir señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21. Más notablemente y, específicamente, algunas de las proteínas de unión tales como los anticuerpos que se unen a beta klotho descritos en esta invención (i) se unen a beta klotho humano y cyno, (ii) no compiten por la unión con FGF19 y/o FGF21, y (iii) inducen señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21, incluyendo, por ejemplo, en varios ensayos basados en células *in vitro*. Tales ensayos pueden incluir (1) un ensayo de reportero de ELK-luciferasaa (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4); (2) un ensayo de células mediadas por el receptor FGF19 recombinante para la fosforilación de ERK (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4); y (3) un ensayo de adipocitos humanos para la fosforilación de ERK (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 5). Por lo tanto, se espera que las proteínas de unión tales como los anticuerpos anti-beta klotho, como se describe en esta invención, muestren actividades *in vivo* que sean compatibles con la función biológica natural de FGF19 y/o FGF21. Esta propiedad hace que las proteínas de unión descritas, incluyendo los anticuerpos anti-beta klotho, sean terapéutica viable para el tratamiento de enfermedades metabólicas (*por ejemplo*, diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico) y, en general, cualquier enfermedad, trastorno o afección en la que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21.

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos que se unen a beta klotho, que se proporcionan en esta invención comparten la característica común de competir entre sí por la unión de beta klotho (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 3 que describe los anticuerpos en el contenedor de epítipo 5H23). Esta inhibición competitiva indica que cada anticuerpo se une a la misma región de beta klotho (*por ejemplo*, el mismo epítipo), afirmando de este modo efectos similares. Los anticuerpos anti-beta klotho proporcionados en esta invención incluyen los anticuerpos anti-beta klotho humanizados, que incluyen anticuerpos anti-beta klotho humanizados derivados de o basados en 5H23, 1C17, 1D19, 2L12, 3L3, 3N20, 4P5, 5C23, 5F7 y/o 1G19 que tienen la secuencia de CDR como se describe en las tablas 1-10 o las figuras 1-3, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, incluyendo los anticuerpos anti-beta klotho humanizados, se unen a un dominio específico de beta klotho humano (*por ejemplo*, KL2 (residuos S509-S1044); véase el ejemplo 9). Además, tal unión se puede atribuir en gran parte a residuos de aminoácidos particulares dentro de la región KL2 (*por ejemplo*, H657, Y701 y R703), que comprenden el epítipo reconocido por los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención. Tomados en conjunto, los resultados descritos en esta invención demuestran que los efectos observados para un anticuerpo anti-beta klotho que se deriva de o se basa en 5H23 o un anticuerpo en el contenedor de epítipo 5H23, incluyendo un anticuerpo que tiene una o más CDR descritas en las tablas 1-10 o las figuras 1-3, se pueden extrapolar a otros anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención que tienen la misma o similar especificidad de epítipo (*por ejemplo*, las mismas o similares CDR). Por ejemplo, las actividades *in vitro* de los anticuerpos, como se muestra en los ejemplos 4-7 y 9, así como los efectos *in vivo* demostrados en el ejemplo 8 para un anticuerpo anti-beta klotho humanizado ejemplar, son representativos de las actividades y los efectos de los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención.

En algunos aspectos de la presente descripción, las proteínas de unión tales como los anticuerpos anti-beta klotho pueden comprender regiones variables de inmunoglobulina que comprenden una o más regiones determinantes complementarias (CDR) como se describe en las tablas 1-10. En tales proteínas de unión (*por ejemplo*, anticuerpos anti-beta klotho), las CDR se pueden unir con una o más regiones de andamio o regiones de estructura, que orientan la(s) CDR(s) de tal manera que se consiguen las propiedades de la(s) CDR de unión a antígeno adecuadas. Tales proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos anti-beta klotho como se describe en esta invención, pueden facilitar o mejorar la interacción entre FGFR1c y beta klotho, y pueden inducir la señalización de tipo FGF-19 y/o la señalización de tipo FGF-21.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en esta invención incluyen aquellos que generalmente se entienden bien y/o se emplean comúnmente usando metodología convencional por parte de los expertos en la materia,

tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. ; *Current Protocols in Molecular Biology* (FM Ausubel, y col. Eds., (2003)); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, Z. An, ed, Wiley, Hoboken NJ (2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*, M. Albitar, ed, Humana Press, Totawa, NJ (2010.); y *Antibody Engineering*, 2ª ed., vol 1 y 2, Kontermann y Dubel, eds., Springer-Verlag, Heidelberg, 2010.

TERMINOLOGÍA

- 10 A menos que se describa lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia. A los fines de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicará la siguiente descripción de términos y, cuando corresponda, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa.
- 15 El término "beta klotho" o "polipéptido beta klotho" y términos similares se refiere a un polipéptido ("polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en esta invención) o cualquier beta klotho nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (*por ejemplo*, seres humanos, el mono cynomolgus (*cyno*)), perros y roedores (*por ejemplo*, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, y, en determinadas realizaciones, incluidos polipéptidos beta klotho relacionados, incluyendo variantes de SNP de los mismos. Beta klotho comprende dos dominios, beta klotho 1 (KLB1) y beta klotho 2 (KLB2). Cada dominio beta klotho comprende una región de glicosil hidrolasa 1. Por ejemplo, el dominio KLB1 de beta klotho humano comprende los residuos de aminoácidos 1-508 con la región de glicosil hidrolasa 1n que comprende los residuos de aminoácidos 77-508, y el dominio KLB2 de beta klotho humano comprende los residuos de aminoácidos 509-1044 con la región de glicosil hidrolasa 1 que comprende los residuos de aminoácidos 517-967. La secuencia de aminoácidos de beta klotho humano se proporciona a continuación:
- 25

1 MKPGCAAGSP GNEWIFFSTD EITTRYRNTM SNGGLQRSVI LSALILLRAV
 51 TGFSGDGRAI WSKNPNFTPV NESQLFLYDT FPKNFFWGIG TGALQVEGSW

ES 2 808 340 T3

101 KKDGGKPSIW DHFIHHLKN VSSTNGSSDS YIFLEKDLA LDFIGVSFYQ
151 FSISWPRLFP DGIVTVANAK GLQYYSTLLD ALVLRNIEPI VTLYHWDLPL
201 ALQEKYGGWK NDTIIDIFND YATYCFQMFQ DRVKYWITIH NPYLVAWHGY
251 GTGMHAPGEK GNLAAYTVG HNLKAHASKV WHNYNTHFRP HQKGWLSITL
301 GSHWIEPNRS ENTMDIFKCQ QSMVSVLGFV ANPIHGDGDY PEGMRKKLFS
351 VLPIFSEAEK HEMRGTADFF AFSFGPNFK PLNTMAKMGQ NVSLNLREAL
401 NWIKLEYNNP RILIAENGWF TDSRVKTEDT TAIYMMKNFL SQVLQAIRLD
451 EIRVFGYTAW SLLDGFQWQD AYTIRGLFY VDFNSKQKER KPKSSAHYYK
501 QIIRENGFSL KESTPDVQGG FPCDFSWGVT ESVLKPESVA SSPQFSDPHL
551 YVWNATGNRL LHRVEGVRLK TRPAQCTDFV NIKKQLEMLA RMKVTHYRFA
601 LDWASVLPFG NLSAVNRQAL RYYRCVVSEG LKLGISAMVT LYYPHTAHLG
651 LPEPLLHADG WLNPTAEAF QAYAGLCFQE LGDLVKLWIT INEPNRLSDI
701 YNRSNDTYG AAHLLVAHA LAWRLYDRQF RPSQRGAVSL SLHADWAEPA
751 NPYADSHWRA AERFLQFEIA WFAEPLFKTG DYPAAMREYI ASKHRRGLSS
801 SALPRLTEAE RRLKGTVDV CALNHFTTRF VMHEQLAGSR YDSDRDIQFL
851 QDITRLSSPT RLAVIPWVGR KLLRWVRRNY GDMDIYITAS GIDDQALEDD
901 RLRKYLLGKY LQEVLYKAYLI DKVRIKGYA FKLAEKSKP RFGFFTSDFK
951 AKSSIQFYNK VISSRGFPFE NSSSRCSQTQ ENTECTVCLF LVQKKPLIFL
1001 GCCFFSTLVL LLSIAIFQRQ KRRKFWKAKN LQHIPLKKGK RVVS

(SEQ ID NO: 297)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho humano:

atgaagccaggctgtgcggcaggatctccagggaaatgaatggattttcttcagcactgatga
aataaccacacgctataggaataacaatgtccaacggggattgcaaagatctgtcatcctgt
cagcacttattctgctacgagctgttactggattctctggagatggaagagctatatggtct
aaaaatcctaattttactccggtaaatgaaagtcagctgtttctctatgacactttccctaa
aaactttttctggggatttgggactggagcattgcaagtggaagggagttggaagaaggatg
gaaaaggaccttctatatgggatcatttcatccacacacaccttaaaaatgtcagcagcagc
aatggttccagtgacagttatatttttctggaaaaagacttatcagccctggattttatagg
agtttctttttatcaattttcaatttctggccaaggcttttccccgatggaatagtaacag
ttgccaacgcaaaaggctctgcagtactacagtactcttctggacgctctagtgttagaaac
attgaacctatagttactttataccactgggatttgcctttggcactacaagaaaaatattg
ggggtggaaaaatgataccataatagatatcttcaatgactatgccacatactgtttccaga

5

ES 2 808 340 T3

tgtttggggaccgtgtcaaatattggattacaattcacaaccocatatctagtggcttggcat
gggtatgggacaggtatgcatgcccctggagagaagggaaatntagcagctgtctacactgt
gggacacaacttgatcaaggctcactcgaaagtttggcataactacaacacacatttccgcc
cacatcagaagggttggttatcgatcacggttgggatctcattggatcgagccaaaccggctc
gaaaacacgatggatatattcaaatgtcaacaatccatggtttctgtgcttggatggtttgc
caaccctatccatggggatggcgactatccagaggggatgagaaagaagtgttctccgttc
taccatcttctctgaagcagagaagcatgagatgagagggcacagctgatttctttgccttt
tcttttggaccaacaacttcaagcccctaaacaccatggctaaaatgggacaaaatgtttc
acttaatttaagagaagcgtgaactggattaaactggaatacaacaaccctcgaatcttga
ttgctgagaatggctggttcacagacagtcgtgtgaaaacagaagacaccacggccatctac
atgatgaagaatttctcagccaggtgcttcaagcaataaggtagatgaaatacagagtgtt
tggttatactgcctggctctcctggatggcttgaatggcaggatgcttacaccatccgcc
gaggattatcttctgtggattttaaacagtaaacagaaagagcggaaacctaaagtcttcagca
cactactacaaacagatcatacgagaaaatggttttctttaaagagtccacgccagatgt
gcagggccagtttccctgtgacttctcctgggggtgctactgaatctgttcttaagcccagat
ctgtggcttctgccccacagttcagcgatcctcatctgtacgtgtggaacgccactggcaac
agactgttgcaccgagtggaaggggtgaggctgaaaacacgaccccgctcaatgcacagattt
tgtaaacatcaaaaaacaacttgagatggtggcaagaatgaaagtcacccactaccggtttg
ctctggattgggcctcggctccttcccactggcaacctgtccgcggtgaaccgacagccctg
aggactacaggtgcgtggctcagtgaggggctgaagcttggcatctccgcgatggctaccct
gtattatccgacccacgcccacctaggcctccccgagcctctgttgcatgccgacgggtggc
tgaaccatcgacggccgaggccttccaggcctacgctgggctgtgcttccaggagctgggg
gacctggtgaagctctggatcaccatcaacgagcctaaccggctaagtgcacatctacaaccg
ctctggcaacgacacctacggggcggcgcaaacctgctgggtggcccacgcccctggcctggc
gcctctacgaccggcagttcaggccctcacagcgcggggccgctgtcgtctgctgcacgcg
gactgggcggaacccgccaacccctatgctgactgcactggagggcgccgagcgttctc
gcagttcgagatcgctgggttcgcccagccgctcttcaagaccggggactaccccgggcca
tgagggaaatacattgcctccaagcaccgacgggggcttccagctcggccctgcccgcctc
accgaggccgaaaggaggctgctcaagggcacggctcacttctgcgcgctcaaccactcac
cactaggttcgtgatgcacgagcagctggccggcagccgctacgactcggacagggacatcc
agtttctgcaggacatcaccgctgagctccccacgcgctggctgtgattccctggggg
gtgcgcaagctgctgcggtgggtccggaggaactacggcgacatggacatttacatcaccgc
cagtggtcagcagaccaggtctgaggatgaccggctccggaagtactacctagggaggt
acctcaggaggtgctgaaagcatacctgattgataaagtcagaatcaaggctattatgca

ES 2 808 340 T3

ttcaaactggctgaagagaaatctaaaccagatttggattcttcacatctgattttaagc
taaatcctcaatacaattttacaacaaagtgatcagcagcaggggcttcccttttgagaaca
gtagttctagatgcagtcagaccaagaaaatacagagtgcactgtctgcttattccttg
cagaagaaaccactgatattcctgggttggtgcttcttctccaccctgggttctactctt
aattgccatTTTTCAAAGGCAGAAGAGAAGAAAGTTTTGGAAAGCAAAAACTTACAACACA
taccattaagaaaggcaagagagttgtagc

(SEQ ID NO: 298)

La secuencia de aminoácidos de beta klotho de mono cynomolgus (cyno), nombre científico *Macaca fascicularis*, se proporciona a continuación:

5

1	MKPGCAAGSP	GNWIFFSTD	EITIRYRNTM	SNGGLQRSVI	LSALTLLRAV
51	TGFSGDGRAV	WSKNPNFTPV	NESQLFLYDT	FPKNFFWVG	TGALQVEGSW
101	KKDGKGPSIW	DHFVHTHLKN	VSSTNGSSDS	YIFLEKDLA	LDFIGVSFYQ
151	FSISWPRLFP	DGIVTVANAK	GLQYYNTLLD	SLVLRNIEPI	VTLYHWDLPL
201	ALQEKYGGWK	NDTIIDIFND	YATYCFQTFG	DRVKYWITIH	NPYLVAWHGY
251	GTGMHAPGEK	GNLAAVYTVG	HNLIKAHASKV	WHNYNTHFRP	HQKGWLSITL
301	GSHWIEPNRS	ENTMDILKCQ	QSMVSVLGWF	ANPIHGDGDY	PEGMKKKLLS
351	ILPLFSEAEK	NEVRGTADFF	AFSFGPNFK	PLNTMAKMGQ	NVSLNREAL
401	NWIKLEYNNP	RILIAENGWF	TDSHVKTEDT	TAIYMMKNFL	SQVLQAIRLD
451	EIRVFGYTAW	SLLDGFEWQD	AYTIRRGFLY	VDFNSKQKER	KPKSSAHYYK
501	QIIRENGFSL	KEATPDVQGG	FPCDFSWGVT	ESVLKPESVA	SSPQFSDPYL
551	YVWNATGNRL	LHRVEGVRLK	TRPAQCTDFV	NIKKQLEMLA	RMKVTHYRFA
601	LDWASVLPTG	NLSAVNRQAL	RYYRCVVSEG	LKLGISAMVT	LYYPHAHLG
651	LPEPLLHAGG	WLNPNSTVEAF	QAYAGLCFQE	LGDLVKLWIT	INEPNRLSDI
701	YNRSGNDTYG	AAHNLLVAHA	LAWRLYDRQF	RPSQRGAVSL	SLHADWAEPA
751	NPYADSHWRA	AERFLQFEIA	WFAEPLFKTG	DYPAAMREYI	ASKHRRGLSS
801	SALPRLTEAE	RRLKGTVDV	CALNHFTTRF	VMHEQLAGSR	YSDRDIQFL
851	QDITRLSSPT	RLAVIPWGV	KLLRWVRRNY	GDMDIYITAS	GIDDALEDD
901	RLRKYYLEKY	LQEVKAYLI	DKVRIKGYA	FKLAEEKSKP	RFGFFTSDFK
951	AKSSIQFYNK	MISSSGFPSE	NSSRCSQTQ	KNTECTVCLF	LVQKKPLIFL
1001	GCCFFSTLVL	LLSITIFHRQ	KRRKFWKAKN	LQHIPLKKGK	RVLS

(SEQ ID NO: 299)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho cyno:

ES 2 808 340 T3

atgaagcctggatgtgcccgggaagccccggcaacgagtgatcttcttcagcaccgacga
gatcaccatccggtacagaaacacccatgagcaacggcggcctgcagcggagcgtgatcctgt
ctgctctgaccctgctgagagccgtgaccggcttcagcggagatggcagagccgtgtggtcc
aagaacccccaaacttcacccccgtgaacgagagccagctgttctctgtacgataccttcccaa
gaacttcttctggggcgtgggcacaggcgcctgcaggtggaaggatcctggaagaaggacg
gcaagggccccagcatctgggaccactttgtgacaccccactgaagaacgtgtccagcacc
aacggcagcagcagcagctacatctttctggaaaaggacctgagcgcctggacttcatcgg
cgtgtccttctaccagttcagcatcagctggcccagactgttccccgacggcatcgtgacag
tggccaatgccaagggcctgcagtactacaacaccctgctggacagcctggtgctgcggaac
atcgagcccacgtgaccctgtaccactgggacctgccactggctctgcaggagaaatacgg
cggctggaagaacgacaccatcatcgacatcttcaacgactacgccacactgcttccaga
ccttcggcgacagagtgaagtactggatcacaatccacaaccctacctggtggcctggcac
ggctatggcaccggaatgcatgcccctggcgagaagggaaatctggccgctgtacaccgt
gggcccacaacctgatcaaggcccacagcaaagtgtggcacaactacaatacccacttccggc
cccaccagaagggctggctgtctatcacactgggcagccactggatcgagcctaaccgcagc
gagaacaccatggacatcctgaagtgccagcagagcatggtgtccgtgctgggatggttcgc
caacccattcacggcgacggcgattaccccgaggcatgaagaagaagctgctgagcatcc
tggccctgttcagcagggccgagaagaacgaagtgcggggcaccgcccatttcttcgccttt
agcttcggccccaacaacttcaagcccctgaataccatggccaagatgggcccagaatgtgtc
cctgaacctgagagaggccctgaactggatcaagctggagtacaacaacccccggatcctga
tcgcccgagaacggctggttaccgacagccacgtgaaaaccgaggacaccaccgcccactat
atgatgaagaacttctgagccaggtgctgcaggctatccggctggatgagatccgggtgtt
cggctacaccgctggtcactgctggacggcttcgaatggcaggacgcctacaccatcagac
ggggcctgttctacgtggacttcaacagcaagcagaaagagcgggaagcccaagagcagcgc
cactactacaagcagatcatcagagagaatggcttcagcctgaaagaggccacccccgacgt
gcagggccagttcccttgtgatttctcttggggcgtgaccgagagcgtgctgaagcctgaaa
gcgtggccagcagccccagttcagcgaaccttacctgtacgtgtggaacgccaccggcaac
cggctgctgcatagagtggaaggcgtgcccgtgaaaaccagaccgcccagtgcaaccgactt
cgtgaacatcaagaaacagctggaaatgctggcccggatgaaagtgaccactacagattcg
ccctggactgggcccagcgtgctgcctaccggaaatctgagcgcctgaaacagacaggccctg
cggctactacagatgcgtggtgtccgagggcctgaagctgggcatcagcgcctatggtcaccct
gtactaccctaccacgcccacctgggactgcctgaacctctgctgcatgctggcggctggc
tgaacctagcaccgtggaagcctttcaggcctacgccgggctgtgcttccaggaactgggc

ES 2 808 340 T3

gacctcgtgaagctgtggatcaccatcaacgagcccaacagactgagcgcacatctacaacag
aagcggcaacgacacctacggcgctgcccacaatctgctggtggctcatgcctggcttggc
ggctgtacgacagacagattccggccttctcagcggggagccgtgtctctgtctctgcatgcc
gattggggccgagcccgccaaccttacgcccactctcattggagagccgccgagcggttcct
gcagttcgagatcgcttggttggccgagcccctgttcaagaccggcgattaccctgccgcca
tgagagagtatatcgccagcaagcacagacggggcctgagcagctctgccctgcctagactg
accgagggccgagcggagactgctgaagggaaaccgtggatttctgcccctgaaccacttca
caccagattcgtgatgcacgagcagctggccggcagcagatacgacagcgcaccgggacatcc
agtttctgcaggacatcaccggctgagcagcccatacaagactggccgtgatcccttgggga
gtgcggaagctgctgagatgggtgcgagaaactacggcgacatggatatctacatcaccgc
cagcggcatcgacgaccaggccctggaagatgaccggctgcggaagtactacctggaaaagt
acctgcaggaagtgctgaaggcctacctgatcgacaaaagtgcggatcaagggctactacgcc
ttcaagctggccgaggaaaagagcaagcccagattcggcttcttaccagcgaacttcaaggc
caagagcagcatccagttctacaacaagatgatcagcagcagcggcttccccagcagagaaca
gcagctccagatgcagccagaccagaaaaacaccgagtgaccgtgtgcctgttccctggtg
cagaagaagcccctgatcttctgggctgctgcttctttagcaccctgggtgctgctgctgct
catcaccatcttccaccggcagaagcggagaaagtctggaaggccaaaaacctgcagcaca
tccccctgaagaaaggcaagcgggtgctgagctga

(SEQ ID NO: 300)

La secuencia de aminoácidos del homólogo de beta klotho de ratón, nombre científico *Mus musculus*, se proporciona a continuación:

5

1 MKTGCAAGSP GNEWIFFSSD ERNTRSRKTM SNRALQRSV LSAFVLLRAV
51 TGFSGDGKAI WDKKQYVSPV NPSQLFLYDT FPKNFSWGVG TGAFQVEGSW
101 KTDGRGPSIW DRYVYSHLRG VNGTDRSTDS YIFLEKDLLA LDFLGVSFYQ
151 FSISWPRLFP NGTVAAVNAQ GLRYRALLD SLVLRNIEPI VTLYHWDLPL
201 TLQEEYGGWK NATMIDLFND YATYCFQTFG DRVKYWITH NPYLVAWHGF
251 GTGMHAPGEK GNLTAVYTVG HNLKAHASKV WHNYDKNFRP HQKGWLSITL
301 GSHWIEPNRT DNMEDVINCQ HSMSSVLGWF ANPIHGDGDY PEFMKTGAMI
351 PEFSEAEKEE VRGTADFFAF SFGPNNFRPS NTVVKMGQNV SLNLRQVLNW
401 IKLEYDDPQI LISENGWFTD SYIKTEDTTA IYMMKNFLNQ VLQAIKFDEI
451 RVFGYTAWTL LDGFEWQDAY TTRRGLFYVD FNSEQKERKP KSSAHYYKQI
501 IQDNGFPLKE STPDMKGRFP CDFSWGVTES VLKPEFTVSS PQFTDPHLYV

ES 2 808 340 T3

551 WNV TGNRLLY RVEGVRLKTR PSQCTDYVSI KKRVEMLAKM KVTHYQFALD
601 WTSILPTGNL SKVNRQVLRY YRCVVSEGLK LGVFPMTLY HPTHSHLGLP
651 LPLLSSGGWL NMNTAKAFQD YAELCFRELG DLVKLWITIN EPNRLSDMYN
701 RTSNDTYRAA HNLMIHAHQV WHLYDRQYRP VQHGAVSLSL HCDWAE PANP
751 FVD SHWKAAE RFLQFEIAWF ADPLFKTGDY PSVMKEYIAS KNQRGLSSSV
801 LPRFTAKESR LVKGTVDFYA LNHFTTRFVI HKQLNTNRSV ADRDVQFLQD
851 ITRLSSPSRL AVTPWGVRLK LAWIRRNRYR RDIYITANGI DDLALEDQI
901 RKYYLEKYVQ EALKAYLIDK VKIKGYAFK LTEEKSKPRF GFFTSDFRAK
951 SSVQFYSKLI SSSGLPAENR SPACGQPAED TDCTICSFLV EKKPLIFFGC
1001 CFISTLAVLL SITVFHHQKR RKFQKARNLQ NIPLKKGHSR VFS

(SEQ ID NO: 301)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho de ratón:

atgaagacaggctgtgcagcaggggtctccggggaatgaatggattttcttcagctctgatga
aagaaacacacgctctagggaaaacaatgtccaacagggcactgcaaagatctgccgtgctgt
ctgcggtttgttctgctgcgagctgttaccggcttctccggagacgggaaagcaatatgggat
aaaaaacagtacgtgagtcgggtaaacccaagtcagctgttctctatgacactttccctaa
aaacttttctggggcgttgggaccggagcatttcaagtgaagggagttggaagacagatg
gaagaggaccctcgatctgggatcggtagcttactcacacctgagaggtgtcaacggcaca
gacagatccactgacagttacatctttctggaaaaagacttgttggctctggatttttagg
agtttcttttatcagttctcaatctcctggccacgggtgttcccaatggaacagtagcag
cagtgaatgcgcaaggtctccggtagcttaccgtgcacttctggactcgtggtacttaggaat
atcgagcccattgttaccttgtaccattgggatttgcctctgacgctccaggaagaatatgg
gggctggaaaaatgcaactatgatagatctcttcaacgactatgccacatactgcttccaga
cctttggagaccgtgtcaaatattggattacaattcacaacccttaccttgttggcttggcat
gggtttggcacaggtatgcatgcaccaggagagaagggaaatttaacagctgtctacactgt
gggacacaacctgatcaaggcacattcgaagtggtggcataactacgacaaaaacttccgcc
ctcatcagaaggggttggctctccatcaccttgggggtcccattggatagagccaaacagaaca
gacaacatggaggacgtgatcaactgccagcactccatgtcctctgtgcttggatggttcgc
caaccccatccacggggacggcgactaccctgagttcatgaagacggggcgcctgatccccg
agttctctgaggcagagaaggaggaggtgaggggacggctgatttctttgccttttcttc
gggccaacaacttcaggccctcaaacaccgtggtgaaaatgggacaaaatgtatcactcaa

5

ES 2 808 340 T3

cttaaggcaggtgctgaactggattaaactggaatac gatgaccctcaa atcttgatttcgg
agaacggctggttcacagatagctatataaagacagaggacaccacggccatctacatgatg
aagaatctcctaaaccaggttcttcaagcaataaaaat ttgatgaaatccgcgtg tttgggta
tacggcctggactctcctggatggcttttgagtggcaggatgcctatac gacccgacgagggc
tgttttatgtggactttaacagtgagcagaaagagaggaaacccaagtcctcg gctcattac
tacaagcagatcatacaagacaacggcttccctttgaaagagtccacg ccagacatgaaggg
tcggttcccctgtgatttctcttggggagtcactgagtcgttcttaagccc gagttaacgg
tctcctcccgcagtttaccgatcctcaoctgtatgtgtggaatgtcactgg caacagattg
ctctaccgagtggaaggggtaaggctgaaaacaagaccatcccagtgca cagattatgtgag
catcaaaaaacgagttgaaatg ttggcaaaaatgaaagtcaccactacc agtttgcctctgg
actggacctctatccttcccactggcaatctgtccaaagttaacagaca agtgtaaggtaac
tataggtgtgtggtgagcgaaggactgaagctgggctcttccc atggtgacgttgtaacca
cccaaccactccc atctcggcctccccctgccacttctgagcagtg ggggggtggctaaaca
tgaacacagccaaggccttccaggactacgctgagctgtgcttccggg agttgggggacttg
gtgaagctctggatcaccatcaatgagcctaacaggctgagtgacatgtaca accgcacgag
taatgacacctaccgtgcagcccacaacctgatgatcgccatgcc caggtctggcacctct
atgataggcagtataggccggctccagcatggggctgtgtcgtgtcctt acattgogactgg
gcagaacctgccaaccctttgtggattcacactggaaggcagccgagc gcttccctccagtt
tgagatcgctggtttgcagatccgctcttcaagactggcgactatcc atcggttatgaagg
aatacatcgctccaagaaccagcgagggctgtctagctcagtcctg ccgcgcttccaccgag
aaggagagcaggctggtgaagggtaaccgtogacttctacgcactga accacttcaactacgag
gttcgtgatacacaagcagctgaacaccaaccgctcagttgcagacag gggacgtccagttcc
tgcaggacatcacccgcctaagctcgcccagccgctggctgtaacac ccctggggagtgcgc
aagctccttgctggatccggaggaactacagagacagggatatctac atcacagccaatgg
catcgatgacctggctctagaggatgatcagatccgaaagtactact tggagaagtatgtcc
aggaggtctgaaagc atatctcattgacaaggtcaaaatcaaaggct actatgcattcaaa
ctgactgaagagaaatctaagcctagatttgatttttcacctctgact tccagagctaagtc
ctctgtccagttttacagcaagctgatcagcagcagtgccctcccc gctgagaacagaagtc
ctgcgtgtggtcagcctgcggaagacacagactgcaccatttgctc atttctcgtggagaag
aaaccactcatcttcttcggttgctgcttcatctccactctggctgt actgctatccatcac
cgtttttcatcatcaaaagagaagaaaattccagaaagcaaggaactt acaaaatataccat
tgaagaaaggccacagcagagttttcagc

(SEQ ID NO: 302)

La secuencia de aminoácidos de beta klotho de rata, nombre científico *Rattus norvegicus*, se proporciona a continuación:

5

MKTGCAAGSPGNEWVFFSSDERSTRSRKTMSENGALQRSVLSALVLLRAVTGFSG
DGKAIWDKKQYVSPVNPQQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSI
WDRYVDSHLRGNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVA
AVNAKGLQYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYA
TYCFQTFGDRVKYWITIHPYLVAVWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLKAHS
KVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSWIEPNRTENMEDVINCQHSMSSVLGWFAN
PIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQ
NVSLNLRQVLNWIKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIK
FDEIQVFGYTAWTLLDGFQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQ
DNGFPLQESTPDMKGQFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVNVTGN
RLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSLPTGNLSKI
NRQVLRYYRCVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLLSSGGWLNTNTAKAFQ
DYAGLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYD
RQYRPVQHGAVSLSLHSDWAEPANPYVESHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDY
PLAMKEYIASKKQRGLSSSVLPRFTLKE SRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNC
SVADR DVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMKLLGWIRRNRYRDMDIYVTANGIDDLA
LEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLT EEEKSKPRFGFFTSDFKAKSS
VQFYSKLISSSGFSSENRSPACGQPPEDTECAICSFLTQKKPLIFFGCCFISTLAALL
SITIFHHRKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO:356)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho de rata:

ATGAAGACAGGCTGTGCAGCAGGGTCTCCAGGGAATGAATGGGTTTTCTTCAG
CTCTGATGAAAGAAGCACACGCTCTAGGAAAACAATGTCCAACGGGAGCACTGC
AAAGATCTGCCGTGCTGTCTGCATTGGTTCTGCTGCGAGCTGTTACCGGCTTCT
CTGGAGACGGAAAAGCAATATGGGATAAAAAACAATACGTGAGTCCGGTAAACC
CAGGTCAGCTGTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAACTTTTCTGGGGCGTTG
GGACCGGAGCATTCAAGTGAAGGGAGTTGGAAGGCAGATGGAAGAGGACC
CTCGATCTGGGACCGTTATGTCGACTCACACCTGAGAGGTGTCAACAGCACAG
ACAGATCCACTGACAGTTATGTCTTTCTGGAAAAGGACTTGCTGGCTCTGGATT
TTTTAGGAGTTTCTTTTTATCAGTTCTCAATCTCCTGGCCGCGGTTGTTCCCAA
CGGAACAGTAGCAGCTGTGAATGCAAAAGGTCTCCAGTACTACAGAGCACTTCT

5

GGACTCGCTGGTACTTAGGAATATCGAACCCATTGTTACCTTATAACCATTGGGA
TTTGCCTTTGACGCTACAGGAAGAATATGGGGGCTGGAAAAATGCAACTATGAT
AGATCTCTTCAATGACTATGCCACATACTGCTTCCAGACCTTTGGAGACCGTGT
CAAATATTGGATTACAATTCACAACCCTTACCTCGTTGCTTGGCATGGGTTTGGC
ACAGGTATGCATGCGCCAGGAGAGAAGGGAAATTTAACAGCTGTCTACACTGT
GGGACACAACCTGATCAAGGCGCATTGAAAGTGTGGCATAACTACGACAAAA
ACTTCCGCCCTCATCAGAAGGGTTGGCTCTCCATCACCTTGGGGTCCCATTGG
ATAGAACCAAACAGAACAGAAAACATGGAGGACGTGATCAACTGCCAGCACTC
CATGTCTTCTGTGCTCGGATGGTTTGCCAACCCCATCCACGGAGACGGCGACT
ACCCCGAGTTCATGAAGACGAGCTCCGTAATCCCTGAGTTCTCTGAGGCAGAG
AAGGAGGAGGTGCGGGGCACTGCTGACTTCTTTGCCTTTTCCTTCGGGCCCAA
CAATTCAGGCCCTCGAACACCGTGGTAAAAATGGGACAAAATGTATCACTCAA
CTTAAGACAGGTGCTGAACTGGATTAACTAGAATATGACAACCCCTCGAATCTT
GATTCGGAGAACGGCTGGTTCACAGATAGTTATATAAAGACGGAAGATACCAC
GGCCATCTACATGATGAAGAATTTCTCAACCAGGTTCTTCAAGCAATAAAGTTT
GATGAAATACAAGTGTGGTTATACGGCTTGGACTCTCCTGGATGGCTTTGAG
TGCCAGGATGCCTACACGACCCGACGAGGGCTGTTTTATGTGGACTTTAATAGT
GAGCAGAAAGAGAGGAAACCCAAGTCCCTCCGCTCATTACTACAAACAGATTATA
CAAGACAACGGTTTCCCTTTGCAAGAATCCACACCAGACATGAAGGGTCAGTTT
CCCTGTGACTTCTCCTGGGGAGTCACTGAGTCTGTTCTTAAGCCGGAGTTTACG
GTGTCCTCCCCACAGTTTACTGATCCTCACCTGTATGTGTGGAATGCACTGGC
AACAGATTGCTATACCGAGTGGAAGGAGTCAGGCTAAAAACAAGACCGTCCCA
ATGCACAGATTATGTGAGCATCAAAAAACGAGTTGAAATGTTGGCCAAAATGAA
AGTCACCCACTACCAGTTTGTCTGGACTGGACCTCTATCCTCCCTACCGGAAA
TCTGTCTAAAATTAATAGACAAGTGTGGAGTACTATAGGTGTGTGGTGAGCGA
AGGACTGAAGCTGGGCATCTCCCTATGGTGACGTTGTACCACCCGACCCACT
CCCATCTAGGCCTCCCATGCCACTTCTGAGCAGTGGGGGATGGCTAAACACC
AACACAGCCAAGGCCTTCCAGGACTACGCAGGCCTGTGCTTCAAGGAGCTGGG
GGACTTGGTAAAGCTCTGGATCACCATCAATGAACCCAATAGGCTGAGTGACAT
GTACAACCGCACGAGTAACGACACCTACCGTGCGGCCACAACTGATGATCG
CCCATGCCAGGTCTGGCACCTCTATGATAGGCAGTATAGGCCGGTCCAGCAC
GGGGCTGTGTCGCTGTCTTACATTCCGACTGGGCAGAACCTGCCAACCCCTA
TGTGGAGTCTCACTGGAAGGCAGCCGAGCGCTTCCCTCCAGTTTGGATCGCCT
GGTTTGGGATCCACTCTTCAAGACTGGTGACTACCCGCTGGCCATGAAGGAA

TACATCGCCTCCAAGAAGCAGCGAGGGCTGTCTAGCTCAGTCCTGCCGCGCTT
TACCTTGAAGGAGAGCAGGCTGGTGAAGGGGACCATCGACTTTTACGCACTGA
ACCACTTCACTACTAGATTTCGTGATACACAAGCAGTTGAATACCAACTGCTCAGT
GGCAGACAGGGACGTCCAGTTCCTGCAGGACATCACCCGCCTGAGCTCGCCC
AGTCGCCTAGCCGTAACGCCCTGGGGAATGCGCAAGCTCCTTGGGTGGATCC
GGAGGAACTACAGAGACATGGATATCTACGTCACAGCCAATGGCATTGATGATC
TTGCTCTAGAGGACGATCAGATTAGAAAGTACTACTTGGAGAAGTACGTCCAGG
AGGCTCTGAAAGCATATCTGATTGACAAGGTCAAATCAAAGGCTACTATGCAT
TCAAAGTACTGAAGAGAAATCTAAGCCTAGATTTGGATTTTTACATCTGACTT
CAAAGCTAAATCTTCTGTACAGTTTTATAGCAAGCTGATCAGCAGCAGCGGCTT
CTCCTCTGAGAACAGAAGTCCTGCCTGTGGTCAGCCTCCAGAAGACACAGAAT
GCGCCATTTGCTCCTTCCTTACACAGAAGAAACCACTCATCTTCTTTGGTTGTTG
CTTCATCTCCACTCTGGCTGCACTGCTATCAATCACTATTTTTATCATCGGAAG
AGAAGAAAATTCCAGAAAGCAAGGAAGTACAAAATATACCATTGAAGAAAGGG
CACAGCAGAGTTTTTAGCTAA (SEQ ID NO:357)

La secuencia de aminoácidos de beta klotho de hámster, nombre científico *Cricetulus griseus*, se proporciona a continuación:

5

MKAGCAAGSPGNEWIFLSSYERNTRSKKTM SNRALQRSVVL SAFVLLRAVTGLSG
DGKAIWDKKQYVSPVNASQLFLYDTFPKNFFWGVGTGAFQVEGNWQADGRGPSI
WDRFIYTHLRDVSITEKSADSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFNGTVASV
NAKGLQYYNKLLDSLILRNIEPVVTLYHWDLPLALQEDYGGWKNATMIDLFNDYATY
CFQTFGDRVKYWITIHPYLVAVWHGFATGMHAPGETGNLTAVYIVGHNLIAHASKV
WHNYDKNFRPHQKGLLSITLGSHWIEPNKTENMADTISCQHSMFVLGWFANPIHA
DGDYPEFMKTLSTMPVFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNV
LNLRQVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSDIKTEDTTAIYMMKHFLNQVLQAIQFDEI
RVFGYTAWSLLDGFEWQYAYTSRRGLFYVDFNSEQKERKPKTSAHYKQIIQENG
FPLKESTPDMQGFPCDFSWGVTE SVLKPEFMVSSPQFTDPHLYVWNATGNRLL
QRVEGVRLKTKPSHCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWATILPTGNLSEVNR
QVLRYYRCVVSEGLKLGVS PMVTLYHPTHSHLGLPEPLLNSGGWLNTYTAKAFQD
YAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWRLYDR
QYRPVQHGAVSLSLHSDWVEPANPYVDSHWKAAERFLLFEIAWFADPLFKTGDYP
LAMKEYIASKNQQLSRSVLP RFTPEESRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNSSR

SMADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVMPWGARKLLGWIQRNYGDMDIYITANGIDDLA
 LENDGIRKYYLEKYIQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSS
 VEFYSKLISRSGFPSETSNPACGQPPEDTDCTICSFFFTQKSLIFFGCCFISTLAVLLS
 ITIFHHRKRRFHKSKNLENIPLKEGHSRVLS (SEQ ID NO: 408)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho de hámster:

atgtccaacagggcactgcaaagatctgtcgtcgtcagcgtttgttctcgtcgcgagctgttaccggattgctggagac
 gggaaagcgatatgggataaaaaacagtacgtgagtcgggtgaatgcaagtcagctgtttctctatgacactttcccta
 aaaaacttttctgggggttggaaactggagcattcaagtgaaggggaattggcaggcagacggaagaggacctcg
 atttgggatcgtttcatctacacacacctgagagatgtcagcatcacagagaaatccgccgacagttacattttctgga
 aaaagattgttgctctggatttttaggagttcttttatcagtttcaatctcctggccacgggtgttcccaatggaaca
 gtagcatccgtgaatgcaaaaggctccaataactacaacaaacttctggactcgtgatacttaggaatattgagcccg
 ttgttacctatacattgggatttgccttggcgctacaggaagactatgggggttgaaaaatgcaactatgatagatc
 tctcaatgactatgccacatactgctccagaccttggagaccgtgtcaagtattggattacaattcacaacccttacct
 ggttgcctggcatgggttggccacaggtatgcatgcgacagagacgggaaattaacagctgtctacattgtggga
 cacaacctgatcaaggctcattcgaaagtgtggcataactacgacaaaaacttccgccccatcagaagggtttgc
 gtccattacctgggggtcccactggatagaaccaacaaaaacagaaaacatggccgatacaatcagctgccagca
 ctctatggctttgtgcttgggtggttccaacccatccatgcagacggcgactaccctgagttcatgaaaacattgtc
 caccatgccagtgctctgagggcagagaaggaggagggtgagggggcacagctgacttcttgccttttcttggccc
 aacaatttcaggccctcgaacactgtagtgaatgggacaaaatgtatcactcaactaagacaggtgctgaactg
 gattaaatagaatatgacaacctcgaatcttgatttcggagaatggctggttcacagatagtgacataaagacaga
 ggacaccacagccatctacatgatgaagcatttctcaaccaggttctcaagcaatacagtttgatgaaatacagtg
 tttggttacacggcctggtctctcctggatggcttgaatggcagtatgcctacacgtctcgcgaggactgtttatgtgga
 cttaatagtgaacagaaagaaaggaacccaagacctcggcacattactacaacagatcatacaagaaaatgg
 tttcccttgaaagagtccacgccagacatgcagggcagtttccctgtgacttctcctggggggcaccgagctgttctt
 aagccggagttatggttctccccacagtttaccgacctcacctgtatgttggaatgccactggcaacagattgct
 acagcagtagaaggagtaaggctaaaaacaaacatcccactgcacagactatgtagcatcaaaaaacgag
 ttgagatgttgccaaaatgaaagtcaccactaccagtttgcctggactgggccaccatcctcccactggcaatctg
 tctgaagttaatagacaagtaaggtactataggtgtgtggtgagcgaaggactgaagctgggctctctccatg
 gtgacgtgtaccaccccaccactccccttaggcctcctgagccgcttctaacagtgggggatggctaaacactt
 acaccgcaaggcctccaggactacgcaggactgtgctccaggaactaggggactggtgaagctctggatcac
 catcaatgagcctaattaggctgagtgacatgtacaaccgcagagtaatgacacctaccgtgcagcccataacctg

5

atgattgccatgccaggctggcgtctctacgacaggcagtataggccagtcagcatggagctgtgctgctgcc
 tacattctgactgggtggaacctgccaaccctatgtggactcactggaaggcagcggagcgttctctctgtttga
 gatcgctggttcgctgatccgctctcaagactggcgactaccactggccatgaaggagatcatcgctccaagaa
 ccagcaagggctgtcccgtcagtcctgcccgcgttccccagaggagagcaggctggtgaagggcaccatcga
 ctctacgactgaaccactcactactaggttcgtgatacacaacagctcaacagcagccgctctatggcagacag
 ggacgtccagttctgcaggacatccccgcctgagctcgcccagccgctggctgttatgccctggggagcagca
 agctgctgggtggatccagaggaactatggggacatggacatctacatcacagccaatggcatgatgatctggct
 ctggagaatgatgggatccgaaagtactactggagaagtacatccaggaggctctgaaagcatacctcattgaaa
 agtcaaaatcaaaggctattatgattcaactgactgaagagaaatctaagcctagattggattttcacatctgactt
 caaagctaagtcactgtagagtttatagcaagttgatcagcagaagtggctcccctctgagactagcaatcccgcat
 gtggtcagcctcagaagacacagactgcaccatctgctcattttcactcagaagaaatctctgatctctttgggtgtg
 ctctatctccactctggctgtactgctgtcaatcaccattttcatcatcgaaagagaagattcataaatcaagaactta
 gaaatataccattgaaggaaggccacagtagagttcttagctaa (SEQ ID NO: 409)

La secuencia de aminoácidos de beta klotho de conejo, nombre científico *Oryctolagus cuniculus*, se proporciona a continuación:

5

MKPGCAAGSPGNEWVSFCTDERNRRCRETMSSGRLRRSVMLSAFILLRAVTGFP
 GDGRAVWSQNPNSPVNESQLFLYDTFKNFFWGVGTGAFQVEGSWKKDGKGL
 SVWDHFIATHLNVSSRDGSSDSYIFLEKDSLALDFLGVSFYQFSISWPRLFDPGTVA
 VANAKGLQYYNRLDLSLLRNIEPVVTLYHWDLPWALQEKEYGGWKNETLIDLFNDY
 ATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGLHAPGEKGNVAAVYTVGHNLLKA
 HSKVWHNYNRNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRAESIVDILKCQQSMVSVLGWFA
 NPIHGDGDYPEVMTKKLLSVLPFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAK
 MGQNVSLNLRQVLNWKLEYGNPRILIAENGWFTDSYVQTEDTTAIYMMKNFLNQV
 LQAIRLDGVRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYNTRRGLFYVDFNSEQRERRPKSSAHY
 YKQVIGENGFTLREATPDLQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVW
 NATGNRMLHRVEGVRLKTRPAQCTDFITIKKQLEMLARMKVTHFRFALDWASVLP
 GNLSEVNRQALRYRCVVTEGLKLNISPMVTLYYPHTAHLGLPAPLLHSGGWLDPS
 TAKAFRDYAGLCFRELGDVLKWLITINEPNRLSDVYNRTSNDTYQAAHNLIAHALV
 WHLYDRQYRPSQRGALSLSLHSDWAEPANPYVASHWQAAERFLQFEIAWFAEPLF
 KTGDYPVAMREYIASKTRRGLSSSVLPRFSDAERRLVKGAADFYALNHFTTRFVMH
 EQQNGSRYDSDRDVQFLQDITRLASPSRLAVMPWGEGKLLRWMRNNYGDLDVYI
 TANGIDDQALQNDQLRQYYLEKYVQEALKAYLIDKIKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFF
 TSDFKAKSSIQFYKLTISNGFPSENGGPRCNQTQGNPECTVCLLLLQKKPLIFFSC
 CFFCTLVLLSSITIFHRRKRRKFWKAKDLQHIPLKKGHKRVLS (SEQ ID NO: 410)

10 A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho de conejo:

tgaagccgtgataagacgggtcccgcagttcgtggcaaataagaccaggctgtgcggcaggatctccagggatga
atgggttctctgcaccgatgaaagaaacagacgctgtagggaacgatgtccagcggacgcctcggagatct
gtcatgctgcagcctcatcctgctgcgagccgtgactgggtccccggagacggaagagctgtatggtcgaaaat
cctaattgagtcggtaaacgaaagtcagctgttctctatgacactttccaaaaacttttctgggggtggggactg
gagcctccaagtggaagggagttggaagaaggatgggaaaggactctctgtatgggatcattcatcgctacacac
ctgaacgicagcagcccgatggctccagtgacagctacatTTTTGGAGAAAGACTTATCGGCGTGGATTTTTAGG
AGTCTCTTTTATCAGTTTCAATTCCTGGCAAGACTGTCCCGGATGGCACAGTAGCAGTCGCGCAATGCAAAAGGTCTC
CAGTACTATAATCGGCTCCTGGACTCTGCTACTTAGAAACATTGAACCTGTAGTCACTTTATACCATGGGATCTGCCTG
GGCGCTACAAGAAAAATACGGGGGTGGAACACGAGACGTTGATTGATTTATTCAATGACTATGCCACCTACTGTTTC
CAGACGTTGGGACCGTGTCAAATACTGGATCACCAATCAACCCATCTGGTGGCTGGCATGGCTACGGGACAG
GTCTGCATGTCCGGGAGAGAAGGGGAATGTGGCAGCTGTCTACACTGTGGACACAACCTGCTAAGGCTCATCA
AAAGTCTGGCACAATAACAGGAATTCGCCCCATCAGAAAGGCTGGCTGTGATCAGCTGGGATCCCACT
GGATTGAGCCAAACAGAGCGGAAAGCATCGTGGACATACTCAAGTGCCAGCAGTCCATGGTCTCGGTCTGGGCTG
GTTTGCAACCCGATCCACGGGGACGGGGACTACCCAGAGGTGATGACAAAGAAGCTGTCTCCGCTCTGCCGCTT
TCTCAGAAGCAGAGAAGAACGAGGTACGAGGCACCGCAGACTTCTTGCTTTTCTGGACCCAACAACCTCAAGC
CCTAAACACCATGGCTAAAAATGGGGCAGAAATGTGCTACTCAATCAAGACAGGTGCTGAACCTGGATTAACCTGGAAT
ATGGCAACCCTCGAATCCTGATCGCTGAGAACGGCTGGTTCACAGACAGTTACGTGCAACAGAAGACACCACAG
CCATCTACATGATGAAGAAATTCCTCAACCAGGTCTTCAAGCAATAAGGTGGATGGAGTCCGAGTGTGGCTACT
GCTGGTCTCTCTGGATGGCTCGAATGGCAGGACGCTTACAACCCCGCGTGGACTGTTTATGTGGACTTCAACAG
CGAACAGAGAGAAAGAAGGCCAAGTCTCGGCGCATTACTATAAACAGGTATAGGAGAAAACGGCTTACGCG
TCAGAGAGGCCACCCGGATCTGCAGGGGCAGTTCCCTGTGACTTCTCTGGGGCGTACCAGTCTGTTCTAAGCC
CGAGTGGTGGCTTCTCGCCACAGTTCAGCGACCCCTACCTCTACGTGTGGAACGCCACTGGCAACCGAATGCTCA
CCGGGTGGAAGGGGTGAGGTGAAAACACGGCCGCTCAGTGACAGATTCATCACCATCAAGAAACAACCTCGA
GATGTTGGCAAGAAATGAAAGTCAACCCTCCGGTTTGTCTGGACTGGGCTCGGTCTTCCACGGGCAACCTGTCC
GAGGTGAACCGACAAGCCCTGAGGTACTACAGGTGTGTGGTACCGAGGGGCTGAAGCTCAACATCTGCCCATGG
TCACCTGTACTACCCGACCATGCCACCTGGGCTGCCGCGCGCTGCTGCACAGCGGGGGGTGGCTGGACCC
ATCCACGGCCAAGGCCTCCGCGACTACGCAGGGCTGTGCTCCGGGAGCTGGGGACCTGGTGAAGCTCTGGATC
ACCATCAACGAGCCCAACCGGTGAGCGACGTCTACAACCGCACCAAGCACACCTACCAGGCCGCCACA
ACCTGCTGATCGCGCACGCGCTGTGGCACCTGTACGACCGCCAGTACCAGCCGCTGCAGCGGGGGCGCTGT

gctgtccctgcactcggactgggcccagcccgaacccctacgtggcctgcactggcaggcggccgagcgcttc
ctgcagttcgagattgcgtggttcgcccagcccctgtcaagaccggggactaccgggtggccatgagggagtacat
cgccccaagaaccggcgcggtctccagctccgtgctccccgctcagcgagcggcggtggtcaa
ggcgccgcccactctacgccctcaaccctcaccaccagggtcgtgatgacgagcagcagaacggcagccg
ctacgactcggacagggacgtgcagttcctgcaggacatcaccgctggcctcaccagccgctggccgtgatg
ccctggggcgagggcaagctgctcggtggatgcggaacaactacggagacctggacgtctacatcacggccaat
ggcatcgacgaccaggccctgcagaacgaccagcttcgaccagtactaccggagaagtacgtccaggaggctctg
aaagcatalctgatagataaaaataaaaatcaaaggctattatgcattcaaaactgactgaagaaaaatcaaaccag
gttggattctcactctgatttcaaagccaagcttcaatacagttttacaacaaactaattaccagcaacggctcccg
tctgagaacggcggctctagatgcaatcagactcaaggaaatcccagagtcaccgtctgcttactcctctgcagaa
gaagccgctgatattcttagctgctctctcgcaccctgggtctactctcatcaattaccatctttcacagacggaaga
gaagaaaatttggaaagcaaggacttacaacataccattaaagaaaggccacaagagagtccttagctaaa
gtgaactattctctgaagagttgaaattcactccagttccatatgctggtaacacaaaagacatacccgattgta
cacagagatttgagatactgtgtaaccaaggcgtgacaatcaaacctctgcatgtggtgaaatgcaatttccctt
aagcggtgacaatcagcgaactcagttctgttctaaaggaggcttcgactgcccactaggctatgagtattacctga
cgcattgcttgcagttgatgagctgttctgcattctctagctttcttagataccaatagctactatggtaaaagtgt
ttttaaagcaaaactctgtaaggctcacagcagatttaaactattcttacactggatctgtgatttgcactcgtagca
agggtcttcccccttggctcctagtggtctcaaatagaaagcaaacacatcttaggtaattctactatctatagccaat
cacagcactgaccacaaactacacaaatccgttagctctctcataaaacacctaatttggtagctttaaagtaactg
aaatgtaaagtagactccgtaaccatctcatggaaagatcgactaaggagagccataccagctgtgaggac
aattagctactaatctaccgtagtcaactcctcttagagcaggcattccttaccattttgtaagatgacatgatta
gcatctgaaccctatctgcagttcttctatggcttacctacattcaagaatattgaacggaaaattcagaaagattt
ccaagtttaaatgtgtagcattagtgatgaaatctcatttcttctcctatcctgcacagagatgtaaacatc
cctctgcccagcaagtccaagctacctatattactcaactgatagtcaccatggtatccagctgttactgtctatacc
caggtaaccctttttatataatagctccaagataagactagtgatgaaaaggaggtaagtcataaataggaa
ggacagattaactctggcactaagtgggaatgctgcaggttttacaggaacacaaaatcagtcagtggttaaagca
tcctctgaggtacctgggacacaatctccacagataaggggaagagcactgacaagactaaacatcctaaaaa
gacgcaatgttctactactggccatcagaataatggccaaaggaccctatactgctgtctctagccaagttcgctg
cacatagggtagaatgcagcagactgaccctggatgcgattcagaatgctgatctgagtgaaactagttttatacagca
cttttaagcctagaattctccatctgaactgggagtttgactttttgaaattaattgtgcttaagatttactcagtgattct
aaacactggaggtagaaaactgtataccattatgcctattaattttctgattagccaacatttaataaccacaagt
ggccagtcgttcttcccttcaggaatttaagcaaggatgctgctgcctgcgatgctggcattcataggggtgac
agttgtgctccggttccactcctatccagctccctgctaattggtgggagagccctgacccacatgggagacc
caaaagcagatcctgctgcttccagcctgctgcccactggagatgaaccagtgatggaagatcaatgtctctcc

caacaattctttgaataaatttttcaaaagtcaaaataaaattctccagctcaaaaagcttttagtagaaaacgatcctac
 attaaggcgggttgattgtatcccaagtgcatctacgttacaaccaaattgagatgcaattcagatgctactagact
 ataaggagaaaacagccaattcaaacaaaataccaaagtcacgtgcagttaattgcttctggtggccaaatgTTTT
 ttctcttctgccaccactgtttacatgtactttagaagaaatttgacttttctccttgagaaatcactattatcaaaggc
 aattcataattacaagtggtccattgtcttaagagctcaagattatagccctcaaaactgccaactcctcaaatagtga
 agctcctaacgaagggtttacaacatcctgtccttaggggtatattttaagtgactgtaatttacctaacaataatct
 ggctatctattggaatacatgtaataatcagggttatcataaaccactaaaaactaaaggtaagtggaagtgctgct
 tttcaaagtaacaggctctcaggggaaaatcaccttagcgtccacctggtactacatctcgtgattcactgtaacc
 atcttccgaacatgctgatataatggaacaacactagtgcttagcctctggaaatgaggccaggattttgtgataa
 atgtctaattattccaaataaactgattacgccaata (SEQ ID NO: 411)

La secuencia de aminoácidos de beta klotho de perro, nombre científico *Canis lupus familiaris*, se proporciona a continuación:

5

MKPGCAAGSPGNEWIFLSTDESNTHYRKTCMNHGLQRSVILSAFILLGAVPGFSGD
 GRAIWSKNPHFSPVNESQLFLYDTFPKNFFWGVGTGAFQVEGNWKTGKGPSIW
 DHFIHTHLKNVNSMNSSSDSYIFLEKDLSDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGLAAVAN
 AKGLQYYNSLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWKNETITDIFNDYATYCF
 QTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIAHASKVW
 HNYNTNFRPYQKGLLSITLGSWIEPNRSENMMDILKCQQSMVSVLGFANPIHGN
 GDYPEVMKKLLSTLPLFSEAENEVRGTADFFAFSFGPNNFKPQNTMAKMGQNV
 SLNLREVLNWKLEYGNPRILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIRFD
 EIQVFGYTAWSLLDGFEWQDAYSTRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAYYYKQIIQEN
 GFTFKESTPDVQGFPCDFSWGVTSVLKPKVASSPQFSDPHLYVWVNTGNRLL
 HRVEGVRLKTRPAQCTDFVSIKRQLEMLARMNVTHYRFALDWPSILPTGNLSTVNR
 QALRYRRCVSESLKLSISPMVTLYYPTHAHLGLPSPLLHSGGWLNASTARAFQDY
 AGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDVYSHTSSDYRAAHNLLIAHALVWHLYDRRY
 RPAQRGAVSLSLHSDWAEPANPYADSHWKAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPPA
 MREYIASKNRQGLSRSTLPRFTDEERLVKGAADFYALNHFTTRFVMHARQNGSR
 YDADRVDQFLQDITCLSSPSRLAVLPWGERKVLRWIQKNYGDVDVYITASGIDDQS
 LENDELRYYLEKYIQEALKAHLIDKVKVKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSEFKAKSS
 VQLYNKLISNSGFSENRSRRCSETQRNTECMVCLFLVQKKPLIFFSCFFSTLVLL
 SSITILHKRKRRIWKAKNLQHIPLKSKNSLQS (SEQ ID NO: 412)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de beta klotho de perro:

acaatcacaagctttactgaagcgttgataagacagggcagcagtagtgcaaatgaagccaggctgtgctgctg
gatctccagggaatgaatggatttccicagcaccgatgaagcaacacacactataggaaaacaatgtgcaacca
cgggctacagagatctgtcatcctgtcagcatttattcctcctaggagctgttctcctggattctctggagacggaagagctat
atggctcaaaaatcctcatttagtccggtaaatgaaagtcagctgttctctatgacactttcctaaaaactttttggggc
gttgggactggagcattcaagtggaaggaatggaagacagatggaaaaggaccctctatatgggatcatttcatc
cacacacaccttaaaaatgtcaacagcatgaatagttccagtgacagttacattttctggaaaaagacctatagccc
tggattttatcggagtttctttatcaatttcaatttctcctggccaaggctttccccgatggaatagcagcagttgccaacgc
aaaaggctcctcagactacaattctctctcgtatgctctagtaggaacattgaacctatagttactttataccattggg
atgtcctttggcactacaagaaaaatgggggtggaataatgaaaccataacggatcttcaatgactatgcc
cctactgtttcagacgttcgggatcgtgtcaaatctggattacaattcaatccatatctagttgcttggcatgggta
tgggacaggtatgacgcgctggagagaagggaaacttagcagctgtctacactgtgggacacaacctaatcaa
ggctcattcgaagtttgcataactacaacacaaatttccgccatatacagaagggttgtatcaatcacgttgggat
cccattggatgaacaaacagatcagaaaacatgatggatatactcaaatgtcaacaatccatggttcagtgctcg
gggtggttccaacccatccatgggaatggagactatccagaagtgatgaaaaagaagttgctcctcactctacccc
tttctctgaagcagagaagaatgaagtgagggcacagctgacttcttgcctttcctttggaccaacaattcaagc
cccagaacaccatggctaaaaatgggacaaaatgtgtcactcaatttaagagaagtgctgaattggattaaactggaa
tatggcaacccccgaatcttgattgctgagaatggctggttcacagacagtcagtgaaaacagaagataccacagc
cattacatgatgaagaatttctcaaccaggttctcaagcaataaggttgacgaaatacaagtttggctacactgc
ttggtctctcctggatggcttgaatggcaggatgcttaccactcgcgaggatttttatgttgatttaataagtaaaca
aaaagaaagaaagcccaagcttccggcatatfactataaacagatcatacaagaaaatggtttactttcaagagtc
caccacagatgtgagggtcagttcctgtgacttctatgggggtgcaaccgaatctgtccttaagcccaagctgtg
cttctcccacagttcagcgaccctcacctgtacgtgtggaatgtgacaggcaacagactgttcaccgagtggaag
gggtgaggctgaagacacggccggctcaatgacagatttgtcagcatcaaaagacaactgagatgttggcgag
gatgaacgtcactcactacaggttctcctggactggccctccatcctcccaccggcaacctgtccacggttaaccga
caagccctgaggtactacaggtgtgtggtcagcgagtcgctgaagctcagcatctcccgatggtcaacgtgtactac
ccgaccacgcccactggcctcccctcgcgctgtgcaacagcggggctggtgctgaacgctccaccgcccgc
gcctccaggactatccgggctgtgtcctcaggagctgggggacctggtgaagctctggatcaccatcaatgagcc
caaccggctgagtgacgtctacagccaccagcagcgacacctaccgggcagcgcacaacctgctgatcggcc
acgcctggtgtggcacctgtacgaccggctaccggccggcgcagcgcggggccgtgtcgtctcctgactc
ggactgggggagcccgaacccctacgcccactgcactggaaggcggccgagcgttctctcagttcgaat
cgctggttcgagcggctctcaagaccgggactaccgcccggccatgagggagtacatcgctccaagaa
caggcaggggctctcgcctccaccctgcccgtcaccgacgaggagaggaggtgtcaagggcgcgccc
actctacgctgaaccactcaccaccaggtctgtatgacgcgcccagaaacggcagccgctacgacgcgg
accgacagctccagttctcagggacatcacctgcctgagctccccagccgctggccgtcctgcccgggggga

ES 2 808 340 T3

gcgcaaggtgctcaggtggatccagaagaactacggagacgtggacgtgtacatcacggccagtgccatcgatga
ccagtcctcggaaaatgatgagctcagaaaatactacttggagaaatacatccaggaggctctgaaagcacaccta
attgataaagcaaaagcaaggctattatgcattcaaaactgactgaagaaaaatctaaaccagatttggattctcac
gtctgaattcaaagctaaatcctcagttcagcttacaacaaactgatcagcaacagtggtccctctgagaacagg
agtcctagatgcagtgagactcaaagaacacagagtgcatggctgcttatttcttgcaaaagaaccactgat
tcttagtggcttctctaccctgggtctacttcatcgattaccattctcataagcgaagagaagaaaaattggaa
agcaagaactacaacatataaccattaaagtgaggccacagaaagtcttagtgaactgatctattctgtctgat
gatagaaagctaaaaattcactccagtcctcaatactggtaacatagaagacaattgaaacactagtagtaacca
aggatgacaaatcaaggctctgctgtgtggccaaatgaatttccattagggttgacatcactgaatacagtttag
atctgaagactaagatctagagagtaagctaggattatctgatacaatgcttcattaagttaataagctgtatccatcat
tcttctcggcttctctagaaataccaatagctaattatagcaacttagaaaaagtgcaactttgctagactccatag
cagaaatctaaaactctaacactggatattcagtgatttctatcacttcaacaagggtgctttccccttagaagatat
acaatagggtaaatagtgctccttcatccattccagcacttttttccagcatagactctaaacacattgatctagtt
tttcaatagaaataaaaaatcatttagaaaacatggaattttgtgaggtctctccttgacattagatctgagtttttaaaa
aaaagacttaactccataaccatctcatgggaagatcacaggactaagattaaggagagtagaccatcaactg
cctgaggagacagcactcaacctcacagtacagcaaatcctgggacaaactgacagcaatctccgcacttggat
tgtgaggcagcacacaagatctaacatacttaggaaagttaaatattctaaaagatgtaaagttttattttattatcaa
gtctcaaaggaccatatttccataagacttctctcctgagttccactctctgacactatgtgtataggggacact
caactgcacctgacattgcaactttggatacaattcagaatgtaaagtttgaaggacttaaaacttctccactgcac
ctttgaagctgggattaagtaaatacgaactgggagttgactttttgaaactctgtgctgatttattcactgtattctaaatt
taaggaaaacctgaatgtaaaccattcatacccttcttgggtagtaaaccatttaaccaccatttca (SEQ ID
NO: 413).

La secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica beta klotho humana/de ratón (KLB humano (M1-F508)-KLB de ratón (P507-S1043)) se proporciona a continuación:

5

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTGFSGDG
RAIWSKPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGGKGPSIWDH
FIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAK
GLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQM
FGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIAHASKVWHN
YNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGFANPIHGDG
DYPEGMRKKLFSVLPFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVS
LNLREALNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDE

IRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENG
 FPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVGTGNRLLY
 RVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNQR
 VLRYRRCVVSEGLKLGVPMTLYHPTHSHLGLPLPLLSSGGWLNMTAKAFQDY
 AELCFRELGDVLKWLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQ
 YRPVQHGAVSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPS
 VMKEYIASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDYALNHFTTRFVIHKQLNTRNS
 VADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVKLLAWIRRNRYRDRDIYITANGIDDLALE
 DDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFRAKSSV
 QFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLVEKKPLIFFGCCFISTLAVLLSI
 TVFHHQKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO:374).

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína quimérica beta klotho humana/de ratón:

5

ATGAAGCCAGGCTGTGCGGCAGGATCTCCAGGGAATGAATGGATTTTCTTCAG
 CACTGATGAAATAACCACACGCTATAGGAATACAATGTCCAACGGGGGATTGCA
 AAGATCTGTCATCCTGTCAGCACTTATTCTGCTACGAGCTGTTACTGGATTCTCT
 GGAGATGGAAGAGCTATATGGTCTAAAAATCCTAATTTTACTCCGGTAAATGAAA
 GTCAGCTGTTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAAACTTTTTCTGGGGTATTGGGAC
 TGGAGCATTGCAAGTGGAAAGGGAGTTGGAAGAAGGATGGAAAAGGACCTTCTA
 TATGGGATCATTTCATCCACACACACCTTAAAAATGTCAGCAGCACGAATGGTT
 CCAGTGACAGTTATATTTTTCTGGAAAAAGACTTATCAGCCCTGGATTTTATAGG
 AGTTTTCTTTTTATCAATTTTCAATTTCCCTGGCCAAGGCTTTTCCCCGATGGAATA
 GTAACAGTTGCCAACGCAAAAGGTCTGCAGTACTACAGTACTCTTCTGGACGCT
 CTAGTGCTTAGAAACATTGAACCTATAGTTACTTTTATACCACTGGGATTTGCCTT
 TGGCACTACAAGAAAAATATGGGGGGTGGAAAAATGATACCATAATAGATATCT
 TCAATGACTATGCCACATACTGTTTCCAGATGTTTGGGGACCGTGTCAAATATTG
 GATTACAATTCACAACCCATATCTAGTGGCTTGGCATGGGTATGGGACAGGTAT
 GCATGCCCTGGAGAGAAGGGAAATTTAGCAGCTGTCTACACTGTGGGACACA
 ACTTGATCAAGGCTCACTCGAAAGTTTGGCATAACTACAACACACATTTCCGCC
 CACATCAGAAGGGTTGGTTATCGATCACGTTGGGATCTCATTGGATCGAGCCAA
 ACCGGTCGGAAAACACGATGGATATATTCAAATGTCAACAATCCATGGTTTCTG
 TGCTTGGATGGTTTGGCAACCCTATCCATGGGGATGGCGACTATCCAGAGGGG

ATGAGAAAGAAGTTGTTCTCCGTTCTACCCATTTTCTCTGAAGCAGAGAAGCAT
 GAGATGAGAGGCACAGCTGATTTCTTTGCCTTTTCTTTTGGACCCAACAACCTTCA
 AGCCCCTAACACCATGGCTAAAATGGGACAAAATGTTTCACTTAATTTAAGAGA
 AGCGCTGAACTGGATTAACTGGAATACAACAACCCTCGAATCTTGATTGCTGA
 GAATGGCTGGTTCACAGACAGTCGTGTGAAAACAGAAGACACCACGGCCATCT
 ACATGATGAAGAATTTCTCAGCCAGGTGCTTCAAGCAATAAGGTTAGATGAAA
 TACGAGTGTGGTTATACTGCCTGGTCTCTCCTGGATGGCTTTGAATGGCAGG
 ATGCTTACACCATCCGCCGAGGATTATTTATGTGGATTTTAACAGTAAACAGAA
 AGAGCGGAAACCTAAGTCTTCAGCACACTACTACAAACAGATCATACGAGAAAA
 TGGTTTTCTTTGAAAGAGTCCACGCCAGACATGAAGGGTCGGTTCCTGTGA
 TTTCTCTGGGGAGTCACTGAGTCTGTTCTTAAGCCCGAGTTTACGGTCTCCTC
 CCCGCAGTTTACCGATCCTCACCTGTATGTGTGGAATGTCACTGGCAACAGATT
 GCTCTACCGAGTGAAGGGGTAAGGCTGAAAACAAGACCATCCCAGTGCACAG
 ATTATGTGAGCATCAAAAAACGAGTTGAAATGTTGGCAAAAATGAAAGTCAACC
 ACTACCAGTTTGCTCTGGACTGGACCTCTATCCTTCCCCTGGCAATCTGTCCA
 AAGTTAACAGACAAGTGTTAAGGTAAGTATAGGTGTGTGGTGAGCGAAGGACTGA
 AGCTGGGCGTCTTCCCCATGGTGACGTTGTACCACCCAACCCACTCCCATCTC
 GGCTCCCCCTGCCACTTCTGAGCAGTGGGGGGTGGCTAAACATGAACACAGC
 CAAGGCCCTCCAGGACTACGCTGAGCTGTGCTTCCGGGAGTTGGGGGACTTGG
 TGAAGCTCTGGATCACCATCAATGAGCCTAACAGGCTGAGTGACATGTACAACC
 GCACGAGTAATGACACCTACCGTGCAGCCCACAACCTGATGATCGCCCATGCC
 CAGGTCTGGCACCTCTATGATAGGCAGTATAGGCCGGTCCAGCATGGGGCTGT
 GTCGCTGTCTTACATTGCGACTGGGCAGAACCTGCCAACCCCTTTGTGGATTC
 ACACTGGAAGGCAGCCGAGCGCTTCCTCCAGTTTGAGATCGCCTGGTTTGCAG
 ATCCGCTCTTCAAGACTGGCGACTATCCATCGGTTATGAAGGAATACATCGCCT
 CCAAGAACCAGCGAGGGCTGTCTAGCTCAGTCCTGCCGCGCTTACCAGCGAAG
 GAGAGCAGGCTGGTGAAGGGTACCGTGCAGTTCTACGCACTGAACCACTTAC
 TACGAGGTTCTGATACACAAGCAGCTGAACACCAACCGCTCAGTTGCAGACA
 GGGACGTCCAGTTCCTGCAGGACATCACCCGCCTAAGCTCGCCCAGCCGCCT
 GGCTGTAACACCCTGGGGAGTGCAGCAAGCTCCTTGCGTGGATCCGGAGGAAC
 TACAGAGACAGGGATATCTACATCACAGCCAATGGCATCGATGACCTGGCTCTA
 GAGGATGATCAGATCCGAAAGTACTACTTGGAGAAGTATGTCCAGGAGGCTCT
 GAAAGCATATCTCATTGACAAGGTCAAATCAAAGGCTACTATGCATTCAAAGT
 ACTGAAGAGAAATCTAAGCCTAGATTTGGATTTTTACCTCTGACTTCAGAGCTA

AGTCCTCTGTCCAGTTTTACAGCAAGCTGATCAGCAGCAGTGGCCTCCCCGCT
GAGAACAGAAGTCCTGCGTGTGGTCAGCCTGCGGAAGACACAGACTGCACCAT
TTGCTCATTCTCGTGGAGAAGAAACCACTCATCTTCTTCGGTTGCTGCTTCATC
TCCACTCTGGCTGTACTGCTATCCATCACCGTTTTTTCATCATCAAAAGAGAAGAA
AATTCCAGAAAGCAAGGAACCTACAAAATATACCATTGAAGAAAGGCCACAGCA
GAGTTTTTCAGCTGA (SEQ ID NO:375)

La secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica beta klotho de ratón/humana (KLB de ratón (M1-F506)-KLB humano (S509-S1044)) se proporciona a continuación:

5

MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSVLSAFVLLRAVTGFSG
DGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKT DGRGPSI
WDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVA
AVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYA
TYCFQTFGDRVKYWITIHPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHS
KVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFAN
PIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMG
QNVSLNLRQVLNWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAI
KFDEIRVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQII
QDNGFSLKESTPDVQGFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATG
NRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLS
AVNRQALRYRRCVVSEGLKLGISAMVTLYPHTAHLGLPEPLLHADGWLNPNSTAEA
FQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHLLVAHALAWRLY
DRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGD
YPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLA
GSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDD
QALEDDRRLRKYLYLQEVKAYLIDKVRIGYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKA
KSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKPLIFLGCCFFSTLV
LLLSIAIFQRQRKRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID NO:376)

A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína quimérica beta klotho de ratón/humana:

10

ATGAAGACAGGCTGTGCAGCAGGGTCTCCGGGGAATGAATGGATTTTCTTCAG
CTCTGATGAAAGAAACACACGCTCTAGGAAAACAATGTCCAACAGGGCACTGCA

AAGATCTGCCGTGCTGTCTGCGTTTGTCTGCTGCGAGCTGTTACCGGCTTCTC
CGGAGACGGGAAAGCAATATGGGATAAAAAACAGTACGTGAGTCCGGTAAACC
CAAGTCAGCTGTTCCCTCTATGACACTTTCCTAAAACTTTTCTGGGGCGTTG
GGACCGGAGCATTTCAGTGGAAGGGAGTTGGAAGACAGATGGAAGAGGACC
CTCGATCTGGGATCGGTACGTCTACTCACACCTGAGAGGTGTCAACGGCACAG
ACAGATCCACTGACAGTTACATCTTTCTGGA AAAAGACTTGTTGGCTCTGGATTT
TTTAGGAGTTTTCTTTTTATCAGTTCTCAATCTCCTGGCCACGGTTGTTCCCAAT
GGAACAGTAGCAGCAGTGAATGCGCAAGGTCTCCGGTACTACCGTGCACCTTCT
GGACTCGCTGGTACTTAGGAATATCGAGCCCATTGTTACCTTGTTACCATTGGGA
TTTGCCTCTGACGCTCCAGGAAGAATATGGGGGCTGGAAAAATGCAACTATGAT
AGATCTCTTCAACGACTATGCCACATACTGCTTCCAGACCTTTGGAGACCGTGT
CAAATATTGGATTACAATTCACAACCCTTACCTTGTTGCTTGGCATGGGTTTGGC
ACAGGTATGCATGCACCAGGAGAGAAGGGAAATTTAACAGCTGTCTACACTGTG
GGACACAACCTGATCAAGGCACATTGAAAAGTGTGGCATAACTACGACAAAAAC
TTCCGCCCTCATCAGAAGGGTTGGCTCTCCATCACCTTGGGGTCCCATTGGATA
GAGCCAAACAGAACAGACAACATGGAGGACGTGATCAACTGCCAGCACTCCAT
GTCCTCTGTGCTTGGATGGTTGCGCAACCCCATCCACGGGGACGGCGACTACC
CTGAGTTCATGAAGACGGGGCGCCATGATCCCCGAGTTCTCTGAGGCAGAGAAG
GAGGAGGTGAGGGGCACGGCTGATTTCTTTGCCTTTTCTTCGGGGCCCAACAA
CTTCAGGCCCTCAAACACCGTGGTGA AAAATGGGACAAAATGTATCACTCAACTT
AAGGCAGGTGCTGAACTGGATTA AACTGGAATACGATGACCCTCAAATCTTGAT
TTCGGAGAACGGCTGGTTCACAGATAGCTATATAAAGACAGAGGACACCACGG
CCATCTACATGATGAAGAATTTCTTAAACCAGGTTCTTCAAGCAATAAAATTTGA
TGAAATCCGCGTGTTTGGTTATACGGCCTGGACTCTCCTGGATGGCTTTGAGTG
GCAGGATGCCTATACGACCCGACGAGGGCTGTTTTATGTGGACTTTAACAGTGA
GCAGAAAGAGAGGAAACCCAAGTCTCGGCTCATTACTACAAGCAGATCATACA
AGACAACGGCTTCTCTTTAAAAGAGTCCACGCCAGATGTGCAGGGCCAGTTTCC
CTGTGACTTCTCCTGGGGTGTCACTGAATCTGTTCTTAAGCCCGAGTCTGTGGC
TTCGTCCCACAGTTTACGGATCCTCATCTGTACGTGTGGAACGCCACTGGCAA
CAGACTGTTGCACCGAGTGGAAGGGGTGAGGCTGAAAACACGACCCGCTCAAT
GCACAGATTTTGTAAACATCAAAAAACA AACTTGAGATGTTGGCAAGAATGAAAGT
CACCCACTACCGGTTTGTCTGATTGGGCCTCGGTCCTTCCCACTGGCAACC
TGTCCGCGGTGAACCGACAGGCCCTGAGGTACTACAGGTGCGTGGTCAGTGA
GGGGCTGAAGCTTGGCATCTCCGCGATGGTCACCCTGTATTATCCGACCCACG

CCCACCTAGGCCTCCCCGAGCCTCTGTTGCATGCCGACGGGTGGCTGAACCCA
 TCGACGGCCGAGGCCTTCCAGGCCTACGCTGGGCTGTGCTTCCAGGAGCTGG
 GGGACCTGGTGAAGCTCTGGATCACCATCAACGAGCCTAACCGGCTAAGTGAC
 ATCTACAACCGCTCTGGCAACGACACCTACGGGGCGGCGCACAACTGCTGGT
 GGCCACGCCCTGGCCTGGCGCCTCTACGACCGGCAGTTCAGGCCCTCACAG
 CGCGGGGCGTGTGCTGTGCTGCACGCGGACTGGGCGGAACCCGCCAAC
 CCCTATGCTGACTCGCACTGGAGGGCGGCCGAGCGCTTCCTGCAGTTCGAGAT
 CGCCTGGTTCGCCGAGCCGCTCTTCAAGACCGGGGACTACCCCGCGGCCATG
 AGGGAATACATTGCCTCCAAGCACCGACGGGGGCTTTCAGCTCGGCCCTGCC
 GCGCCTCACCGAGGCCGAAAGGAGGCTGCTCAAGGGCACGGTCTGACTTCTGC
 GCGCTCAACCACTTCACTAGGTTCTGATGCACGAGCAGCTGGCCGGCAG
 CCGCTACGACTCGGACAGGGACATCCAGTTTCTGCAGGACATCACCCGCCTGA
 GCTCCCCACGCGCCTGGCTGTGATTCCCTGGGGGGTGCGCAAGCTGCTGCG
 GTGGGTCCGGAGGAACTACGGCGACATGGACATTTACATCACCGCCAGTGGCA
 TCGACGACCAGGCTCTGGAGGATGACCGGCTCCGGAAGTACTACCTAGGGAA
 GTACCTCAGGAGGTGCTGAAAGCATACTGATTGATAAAGTCAGAATCAAAGG
 CTATTATGCATTCAAACCTGGCTGAAGAGAAATCTAAACCCAGATTTGGATTCTTC
 ACATCTGATTTTAAAGCTAAATCCTCAATACAATTTTACAACAAAGTGATCAGCA
 GCAGGGGCTTCCCTTTTGAGAACAGTAGTTCTAGATGCAGTCAGACCCAAGAAA
 ATACAGAGTGCCTGTCTGCTTATTCTTGTGCAGAAGAAACCACTGATATTCTT
 GGGTTGTTGCTTCTTCTCCACCCTGGTTCTACTCTTATCAATTGCCATTTTTCAA
 AGGCAGAAGAGAAGAAAGTTTTGGAAAGCAAAAACTTACAACACATACCATTA
 AAGAAAGGCAAGAGAGTTGTTAGCTAG (SEQ ID NO:377)

Los polipéptidos beta klotho relacionados incluyen variantes alélicas (*por ejemplo*, variantes de SNP); variantes de splicing; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, delección e inserción; polipéptidos de fusión; y homólogos entre especies, preferentemente, que conservan la actividad beta klotho y/o son suficientes para generar una respuesta inmune anti-beta klotho. Como apreciarán los expertos en la materia, un anticuerpo anti-beta klotho proporcionado en esta invención se puede unir a un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un antígeno beta klotho y/o un epítipo beta klotho. Un epítipo puede ser parte de un antígeno beta klotho más grande, que puede ser parte de un fragmento de polipéptido beta klotho más grande, el cual, a su vez, puede ser parte de un polipéptido beta klotho más grande. Beta klotho puede existir en una forma nativa o desnaturalizada. Los polipéptidos beta klotho descritos en esta invención pueden aislarse de una diversidad de fuentes, tal como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o sintéticos. Un polipéptido beta klotho puede comprender un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido beta klotho correspondiente derivado de la naturaleza. Los polipéptidos beta klotho abarcan formas truncadas o secretadas de un polipéptido beta klotho (*por ejemplo*, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes (*por ejemplo*, formas splicing) y variantes alélicas del polipéptido. Los ortólogos al polipéptido beta klotho también son bien conocidos en la técnica.

El término "beta klotho" abarca beta klotho "de longitud completa", sin procesar, así como cualquier forma de beta klotho que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes o mutaciones naturales de beta klotho (*por ejemplo*, variantes de splicing, variantes alélicas, variantes de SNP e isoformas). Los polipéptidos beta klotho descritos en esta invención pueden aislarse de una diversidad de fuentes, tal como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o sintéticos.

Las expresiones "señalización de tipo FGF19" e "induce señalización de tipo FGF19" cuando se aplican a una proteína de unión tal como un anticuerpo que se une al beta klotho de la presente descripción, significa que la proteína de unión (*por ejemplo*, el anticuerpo) imita, o modula, un efecto biológico *in vivo* inducido por la unión de (i) beta klotho; (ii) 5 FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4; o (iii) un complejo que comprende beta klotho y uno de FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4 e induce una respuesta biológica que de otro modo resultaría de la unión de FGF19 a (i) beta klotho; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c o FGFR4; o (iii) un complejo que comprende beta klotho y uno de FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4 *in vivo*. Al evaluar la unión y la especificidad del anticuerpo anti-beta klotho, *por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento del mismo, que se une a beta klotho (*por ejemplo*, beta klotho humano), se considera que un 10 anticuerpo o fragmento del mismo induce una respuesta biológica cuando la respuesta es igual o mayor que 5 %, y preferentemente igual a o mayor que el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, de la actividad de un estándar FGF19 de tipo silvestre que comprende la forma madura de la SEQ ID NO:304 (*por ejemplo*, la forma madura de FGF19 humano) y tiene las siguientes propiedades: muestra un nivel de eficacia igual o superior al 5 % de un estándar de FGF19, con una CE50 igual o inferior a 100 nM, 15 *por ejemplo*, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM o 10 nM en (1) un ensayo de células reporteras de luciferasa mediadas por el receptor FGF19 recombinante (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4); (2) fosforilación de ERK en un ensayo de células mediadas por el receptor FGF19 recombinante (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4); o (3) fosforilación de ERK en los adipocitos humanos (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 5).

20 El término "FGF19R" puede referirse a un complejo receptor multimérico que se sabe o se sospecha que FGF19 forma *in vivo*. En diversas realizaciones, FGF19R comprende (i) un FGFR, *por ejemplo*, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c o FGFR4, y (ii) beta klotho.

Las expresiones "señalización de tipo FGF21" e "induce señalización de tipo FGF21" cuando se aplican a una proteína de unión tal como el anticuerpo que se une al beta klotho de la presente descripción, significa que la proteína de unión (*por ejemplo*, el anticuerpo) imita, o modula, un efecto biológico *in vivo* inducido por la unión de (i) beta klotho; (ii) 25 FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4; o (iii) un complejo que comprende beta klotho y uno de FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4 e induce una respuesta biológica que de otro modo resultaría de la unión de FGF21 a (i) beta klotho; (ii) FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c o FGFR4; o (iii) un complejo que comprende beta klotho y uno de FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c y FGFR4 *in vivo*. Al evaluar la unión y la especificidad del anticuerpo anti-beta klotho, *por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento del mismo, que se une a beta klotho (*por ejemplo*, beta klotho humano), se considera que un anticuerpo o fragmento del mismo induce una respuesta biológica cuando la respuesta es igual o mayor que el 5 %, y preferentemente igual a o mayor que el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, de la actividad de un estándar FGF21 de tipo silvestre que comprende la forma 30 madura de la SEQ ID NO:306 o 429 (*por ejemplo*, la forma madura de FGF21 humano) y tiene las siguientes propiedades: muestra un nivel de eficacia igual o superior al 5 % de un estándar de FGF21, con una CE50 igual o inferior a 100 nM, *por ejemplo*, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM o 10 nM en (1) un ensayo de células reporteras de luciferasa mediadas por el receptor FGF21 recombinante (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4); (2) fosforilación de ERK en un ensayo de células mediadas por el receptor FGF21 recombinante (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4); o (3) fosforilación de ERK en los adipocitos humanos (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 5).

El término "FGF21R" puede referirse a un complejo receptor multimérico que se sabe o se sospecha que FGF21 forma *in vivo*. En diversas realizaciones, FGF21R comprende (i) un FGFR, *por ejemplo*, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c o FGFR4, y (ii) beta klotho.

45 El término "proteína de unión" se refiere a una proteína que comprende una porción (*por ejemplo*, una o más regiones de unión tales como CDR) que se une a beta klotho, incluyendo beta klotho humano y/o cynoy, opcionalmente, una porción de andamio o estructura (*por ejemplo*, una o más regiones de andamio o de estructura) que permite que la porción de unión adopte una conformación que promueve la unión de la proteína de unión a un polipéptido, fragmento o epítipo beta klotho. Los ejemplos de tales proteínas de unión incluyen anticuerpos, tales como un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo recombinante; un anticuerpo de cadena sencilla; un diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂; un anticuerpo IgD; un anticuerpo IgE; un anticuerpo IgM; un anticuerpo IgG1; un anticuerpo IgG2; un anticuerpo IgG3; o un anticuerpo IgG4, y fragmentos de los mismos. La proteína de unión puede comprender, *por ejemplo*, un andamio de proteína alternativa 50 o un andamio artificial con CDR injertadas o derivados de CDR. Tales andamios incluyen, pero no se limitan a, andamios derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas, *por ejemplo*, para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión, así como los andamios completamente sintéticos que comprenden, *por ejemplo*, un polímero biocompatible. Véase, *por ejemplo*, Korndorfer y col., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129 (2003); Roque y col., *Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004). Además, se pueden usar 55 miméticos peptídicos de anticuerpos ("PAM, por sus siglas en inglés"), así como andamios basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de fibronectina como andamio. En el contexto de la presente descripción, se

dice que una proteína de unión se une específicamente o selectivamente a beta klotho, por ejemplo, cuando la constante de disociación (K_D) es $\leq 10^{-8}$ M. La proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo) se puede unir específicamente a beta klotho con alta afinidad cuando la K_D es $\leq 10^{-9}$ M o K_D es $\leq 10^{-10}$. Las proteínas de unión (por ejemplo, anticuerpos) se pueden unir a beta klotho o a un complejo que comprende FGFR1c y beta klotho, incluyendo con una K_D de entre aproximadamente 10^{-7} M y aproximadamente 10^{-12} M y en otros aspectos, las proteínas de unión (por ejemplo, anticuerpos) se puede unir con una K_D de $1-2 \times 10^{-9}$ M.

El término "anticuerpo" e "inmunoglobulina" o "Ig" se usan indistintamente en esta invención, y se utiliza en el sentido más amplio e incluye específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-beta klotho individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas, neutralizantes, de longitud completa o anticuerpos monoclonales intactos), composiciones de anticuerpos anti-beta klotho con especificidad poliepitópica o monoepitópica, anticuerpos policlonales o monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada), formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos anti-beta klotho de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos anti-beta klotho, como se describe a continuación. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado, quimérico y/o madurado por afinidad, así como un anticuerpo de otras especies, por ejemplo ratón, conejo, etc. El término "anticuerpo" pretende incluir un producto polipéptido de células B dentro de la clase de inmunoglobulina de polipéptidos que es capaz de unirse a un antígeno específico y molecular y está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kDa) y una cadena ligera (aproximadamente 25 kDa) y cada porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 130 o más aminoácidos y cada porción carboxi-terminal de cada cadena incluye una región constante (véase, Borrebaeck (ed.) (1995) *Antibody Engineering*, segunda ed., Oxford University Press.; Kuby (1997) *Immunology*, tercera Ed., WH Freeman and Company, Nueva York). El antígeno molecular específico que se puede unir mediante un anticuerpo proporcionado en esta invención incluye un polipéptido beta klotho, un fragmento beta klotho o un epítipo beta klotho. Los anticuerpos también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos funcionales (por ejemplo, fragmentos de unión a antígenos tales como fragmentos de unión a beta klotho) de cualquiera de los anteriores, que se refiere una porción de un polipéptido de cadena pesada o ligera de anticuerpo que conserva parte o la totalidad de la actividad de unión del anticuerpo del que se derivó el fragmento. Los ejemplos no limitativos de fragmentos funcionales (por ejemplo, fragmentos de unión a antígenos tales como fragmentos de unión a beta klotho) incluyen Fv de cadena sencilla (scFv) (por ejemplo, incluyendo mono-específicos, biespecíficos, etc.), fragmentos Fab, fragmentos F(ab') fragmentos, F(ab)2, fragmentos F(ab')2, Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos Fd, fragmentos Fv, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo y minicuerpo. En particular, los anticuerpos proporcionados en esta invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, dominios de unión a antígeno o moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une a un antígenobeta klotho (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-beta). Tales fragmentos de anticuerpos se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); Myers (ed.), *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, Nueva York: VCH Publisher, Inc.; Huston y col., *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Plückerthun y Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) y en Day, ED, *Advanced Immunochimistry*, segunda Ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY (1990). Los anticuerpos proporcionados en esta invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA e IgY), cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos anti-beta klotho pueden ser anticuerpos agonistas o anticuerpos antagonistas. En esta invención se proporcionan anticuerpos agonistas que se unen a beta klotho, incluyendo anticuerpos que inducen señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21. Los anticuerpos agonistas preferidos que se unen a beta klotho no compiten por la unión de FGF19 y/o FGF21 a un receptor de FGF, incluyendo, por ejemplo, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, o FGFR4c.

El término "factores de crecimiento de fibroblastos" se refiere a una familia de factores de crecimiento, que incluye veintidós miembros de la familia de FGF humano. La subfamilia FGF19 de factores de crecimiento de fibroblastos consiste en FGF21 FGF23 y FGF19 humano y FGF15 de ratón. Los efectos de los miembros de la familia FGF son el resultado de su unión dependiente de heparina a uno o más miembros del receptor FGF de la familia tirosina quinasa (FGFR), que incluye cuatro miembros que tienen cada uno un dominio de tirosina quinasa, FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, así como dos variantes de splicing cada una de FGFR1, FGFR2 y FGFR3. Estas variantes de splicing, que se producen en el exón 3 de FGFR1, FGFR2 y FGFR3, se designan como variantes "b" y "c" (por ejemplo, FGFR1b, FGFR2b, FGFR3c, FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c, que también se conocen como FGFR1(III)b, FGFR2(III)b, FGFR3(III)c, FGFR1(III)c, FGFR2(III)c y FGFR3(III)c, respectivamente). Por ejemplo, FGF19 se dirige y tiene efectos tanto en adipocitos como en hepatocitos. Los ratones tratados con FGF19 humano recombinante (rhFGF19), a pesar de tener una dieta alta en grasas, muestran tasas metabólicas aumentadas, oxidación lipídica aumentada, un cociente

respiratorio más bajo y pérdida de peso. Además, tales ratones mostraron niveles en suero más bajos de leptina, insulina, colesterol y triglicéridos, y niveles normales de glucosa en sangre a pesar de la dieta alta en grasas y sin disminución del apetito. Además, los ratones obesos que carecían de leptina, pero que incluían un transgén FGF19 mostraron pérdida de peso, bajaron el colesterol y los triglicéridos, y no desarrollaron diabetes. Además, los ratones obesos y diabéticos que carecen de leptina, cuando se inyectó rhFGF19, mostraron una reversión de sus características metabólicas en forma de pérdida de peso y disminución de la glucosa en sangre. Por ejemplo, FGF21 se expresa principalmente en el hígado y tiene efectos metabólicos similares a los de FGF19, tales como un aumento del metabolismo a través de sus efectos sobre el tejido adiposo, pérdida de peso, niveles bajos de glucosa en sangre, y resistencia a la obesidad y la diabetes. Los ratones transgénicos FGF21 también fueron resistentes a la obesidad inducida por la dieta, y, en modelos de roedores diabéticos, la administración de FGF21 redujo los niveles de glucosa en sangre y triglicéridos. Los efectos metabólicos de FGF19 y FGF21 se producen a través de sus receptores de FGF de unión, incluyendo los receptores FGFR1c, FGFR2c y FGFR3c, y se requiere beta klotho para la unión. para la unión. La unión de FGF19 y FGF21 a FGFR1c y FGFR2c es significativa. También se ha demostrado que FGF19 tiene efectos metabólicos distintos de FGF21, incluyendo la regulación de la producción de bilis por el hígado a través de sus efectos específicos del hígado, regulando negativamente la producción de bilis en respuesta a la producción de bilis posprandial, y efectos mitogénicos hepáticos que no se observan con respecto a FGF21. Por ejemplo, los ratones transgénicos FGF19 desarrollan adenocarcinoma hepático debido al aumento de la proliferación y la displasia de hepatocitos, y los ratones tratados con rhFGF19 muestran la proliferación de hepatocitos de los hepatocitos. Estas actividades adicionales de FGF19 parecen estar mediadas por su unión a FGFR4. FGF19 puede unirse a FGFR4 de manera dependiente de beta klotho e independiente de beta klotho. Aunque también se ha demostrado que FGF21 se une a FGFR4 de una manera dependiente de beta klotho, no se ha observado previamente una señalización eficiente a partir de la unión de FGF21 a FGFR4.

Las proteínas de unión, tales como los *anticuerpos* anti-beta klotho, como se describe en esta invención, pueden inducir una señalización de tipo FGF19, como se describe en esta invención. *In vivo*, la forma madura de FGF19 es la forma activa de la molécula. A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica FGF19 de longitud completa; los nucleótidos que codifican la secuencia de señal están subrayados.

atgcgggagcgggtgtgtgggtgggtccacgtatggatcctggccggcctctggctggccgtggc
cgggcgccccctcgccttctcggaacgcggggccccacgtgcactacggctggggcgacccca
tccgcctgcggaacctgtacacctccggccccacgggctctccagctgcttctgogcatc
cgtgccgacggcgctcgtggactgcgcgcggggccagagcgcgcacagtttgctggagatcaa
ggcagtcgctctgcggaacctggccatcaaggcgctgcacagcgtgcggtacctctgcatgg
gccccgacggcaagatgcaggggctgcttcagtactcggaggaagactgtgctttcgaggag
gagatccgcccagatggctacaatgtgtaccgatccgagaagcaccgcctcccggtctccct
gagcagtgccaaacagcggcagctgtacaagaacagaggctttcttccactctctcatttcc
tgcccatgctgcccattggtcccagaggagcctgaggacctcaggggccacttggaatctgac
atgttctcttcgcccctggagaccgacagcatggaccatttgggcttgtcaccggactgga
ggccgtgaggagtcccagctttgagaagtaa

(SEQ ID NO:303)

Se proporciona la secuencia de aminoácidos de FGF19 de longitud completa; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados:

mrsgcvvvhwilaglwlavagRPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRI
RADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEF
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK

(SEQ ID NO:304)

ES 2 808 340 T3

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, como se describe en esta invención, pueden inducir una señalización de tipo FGF21, como se describe en esta invención. *In vivo*, la forma madura de FGF21 es la forma activa de la molécula. Se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un FGF21 de longitud completa; los nucleótidos que codifican la secuencia de señal están subrayados:

atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac tca gga ctg tgg gtt
tct gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc cag gca cac ccc
atc cct gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc caa gtc cgg
cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa gcc cac
ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac cag
agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt
att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg
cca gat ggg gcc ctg tat gga tcg ctc cac ttt gac cct gag gcc
tgc agc ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac
cag tcc gaa gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag
tcc cca cac cgg gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg
cca cta cca ggc ctg ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc
ctg gcc ccc cag ccc ccc gat gtg ggc tcc tcg gac cct ctg agc
atg gtg gga cct tcc cag ggc cga agc ccc agc tac gct tcc tga

(SEQ ID NO:305).

A continuación, se proporciona una secuencia de aminoácidos de un FGF21 de longitud completa; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados:

m d s d e t g f e h s g l w v s v l a g l l l g a c q a H P I
P D S S P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I
R E D G T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K P G V I Q I L
G V K T S R F L C Q R P D G A L Y G S L H F D P E A C S F R E
L L L E D G Y N V Y Q S E A H G L P L H L P G N K S P H R D P
A P R G P A R F L P L P G L P P A P P E P P G I L A P Q P P D
V G S S D P L S M V G P S Q G R S P S Y A S

(SEQ ID NO:306).

Se proporciona una secuencia de ácido nucleico que también codifica un FGF21 de longitud completa; los nucleótidos que codifican la secuencia de señal están subrayados:

ES 2 808 340 T3

atggactcggacgagaccgggttcgagcactcaggactgtgggtttctgtgctggctggctctctgctgggagcc
tgccaggcaCACCCCATCCCTGACTCCAGTCTCTCTGCAATTCGGGGCCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC
ACAGATGATGCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAG
AGCCCCGAAAGTCTCTGACGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTGGGAGTCAAGACATCCAGG
TTCTTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAG
CTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAG
TCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACTCCCG
GAGCCACCCGGAATCTGGCCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCCCTGAGCATGGTGGGACCTTCC
CAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTCCTGA

(SEQ ID NO:428).

Se proporciona una secuencia de aminoácidos que también codifica un FGF21 de longitud completa; los aminoácidos que codifican la secuencia de señal están subrayados:

5

mdsdetgfehsglwwsvlaglllgacqaHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEA
CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPE
PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

(SEQ ID NO:429)

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, como se describe en esta invención, se unen a beta klotho solo o en complejo con un receptor de FGF, tal como FGFR1c. A continuación, se proporciona una
10 secuencia de ácido nucleico codificante de FGFR1c humano (número de acceso GenBank NM 023110; también designado FGFR α IIIc):

ES 2 808 340 T3

atgtggagctggaagtgcctcctcttctgggctgtgctggtcacagcc
acactctgcaccgctagggcctccccgaccttgacctgaacaagcccag
ccctggggagcccctgtggaagtggagtccttctgggtccaccccgg
gacctgctgcagcttcgctgtcggctgcgggacgatgtgcagagcatc
aactggctgcgggacggggtgcagctggcggaaagcaaccgcaccg
catcacaggggaggaggtggaggtgcaggactccgtgcccgcagact
ccggcctctatgcttgcgtaaccagcagcccctcgggcagtgacacca
cctacttctcgtcaatgtttcagatgctctcccctcctcggaggatga
tgatgatgatgatgactcctcttcagaggagaaagaaacagataaca
ccaaaccaaaccgtatgcccgtagctccatattggacatcaccagaaa
agatggaaaagaaattgcatgcagtgccggctgccaagacagtgaag
ttcaaatgcccttccagtgggacaccaaaccacactgcgctggttg
aaaaatggcaaagaattcaaacctgaccacagaattggaggctaaa
ggtccgttatgccacctggagcatcataatggactctgtggtgcctc
tgacaagggcaactacacctgcattgtggagaatgagtacggcagca
tcaaccacacataaccagctggatgtcgtggagcgggtcccctcaccgg
ccatcctgcaagcaggggtgcccgccaacaaaacagtgggcctgggt
agcaacgtggagttcatgtgtaaggtgtacagtgacccgcagccgcac
atccagtgggctaaagcacatcgaggtgaatgggagcaagattggccc
agacaacctgccttatgtccagatcttgaagactgctggagttaatac
caccgacaaagagatggaggtgcttcaactaagaaatgtctccttga
ggacgcaggggagtatacgtgcttggcgggtaactctatcggactctc
ccatcactctgcatggttgaccgttctggaagccctggaagagaggcc
ggcagtgatgacctgcacctgtacctggagatcatcatctattgcac
aggggccttctcctcatctcctgcatggtggggctcggatcatcgtctaaa
gatgaagagtggtaaccaagaagagtgacttccacagccagatggctg
tgacaagctggccaagagcatccctctgcgcagacaggtaacagtg
tctgctgactccagtgcatccatgaactctggggttcttctggttcggc
catcacggctctcctccagtgggactcccctgctagcaggggtctctg
agtatgagcttcccgaagaccctcgtcgggagctgcctcgggacagac
tggctttaggcaaaccctcgggagagggtgcttgggcaggtggtgt
tggcagaggctatcgggctggacaaggacaaacccaaccgtgtgacc

ES 2 808 340 T3

aaagtggctgtgaagatggtgaagtcggacgcaacagagaaagactt
gtcagacctgatctcagaaatggagatgatgaagatgatcgggaagc
ataagaatatcatcaacctgctggggcctgcacgcaggatggtccct
tgtatgtcatcgtggagatgacctccaagggcaacctgcgggagtacc
tgcaggccccggaggccccagggctggaatactgctacaaccccagc
cacaaccagaggagcagctctcctccaaggacctggtgtcctgcgcc
taccaggtggccccgagcatggagtatctggcctccaagaagtgcata
caccgagacctggcagccaggaatgtcctggtgacagaggacaatgt
gatgaagatagcagactttggcctgcacgggacattcaccacatcga
ctactataaaaagacaaccaacggccgactgctgtgaagtggatgg
caccgaggcattatgtgaccgatctacaccaccagagtgatgtgt
ggtctttcgggggtgctcctgtgggagatcttcaactctgggcggtcccc
ataccgccgtgtgctgtggaggaacttttcaagctgctgaaggaggg
tcaccgcatggacaagcccagtaactgcaccaacgagctgtacatgat
gatgcgggactgctggcatgcagtgccctcacagagaccaccttcaa
gcagctggtggaagacctggaccgcatcgtggccttgacctcaacca
ggagtacctggacctgtccatgcccctggaccagtactccccagctt
tcccgcaccccggagctctacgtgctcctcaggggaggattccgtctt
ctctcatgagccgctgcccgaggagccctgcctgccccgacaccagc
ccagcttgccaatggcggactcaaacgccgctga.

(SEQ ID NO:307)

La secuencia de aminoácidos de FGFR1c humano (número de acceso GenBank NM 075598; también designado FGFRaIIIc) se proporciona a continuación:

5

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPG
DLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGL
YACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNR
MPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSTPNPTLRWLKNGKEF
KPDHRIGGYKVRATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDV
VERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNG
SKIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSI
GLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEII IYCTGAFLISCMVGSVIVY
KMKSGTKKSDFHQSMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPS
RLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEA

IGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIIN
 LLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEICYNPSHNPEEQLS
 SKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEEDNVMKIADFGL
 ARDIHHIDYKKTNGRLPVKWMPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEI
 FTLGGSYPYGPVPEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVP
 SQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPFDTRSSTCSSG
 EDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR.

(SEQ ID NO:308)

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, descritos en esta invención, pueden unirse a beta klotho en complejo con la porción extracelular de un receptor de FGF tal como FGFR1c. Un ejemplo de una región
 5 extracelular de FGFR1c es:

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDL
 LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYA
 CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMP
 VAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSTPNPTLRWLKNGKEFKPD
 HRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPDCKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVER
 SPHRPILQAGLPANKTVALGNSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKI
 GPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLS
 HHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLY. (SEQ ID NO:309)

Un ejemplo de una región extracelular de FGFR1c (α IIIc) es:

10

RPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADS
 GLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAA
 KTVKFKCPSSTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPDCKGNYTCIVENEYGSINHTYQLD
 VVERSPHRPILQAGLPANKTVALGNSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDK
 EMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYE.

(SEQ ID NO:427)

Un ejemplo de una región extracelular de FGFR1c (β IIIc) es:

15

RPSPTLPEQDALPSSSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKT
 KFKCPSSTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPDCKGNYTCIVENEY
 GSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGNSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGS
 KIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLE
 ALEERPAVMTSPLYE.

(SEQ ID NO: 426)

Como se describe en esta invención, las proteínas FGFR1c también pueden incluir fragmentos. Como se usa en esta
 20 invención, los términos se utilizan indistintamente para referirse a un receptor, en particular, y a menos que se
 especifique lo contrario, un receptor humano, que al asociarse con beta klotho y FGF21 induce actividad de
 señalización de tipo FGF21.

El término FGFR1c también incluye modificaciones post-traduccionales de la secuencia de aminoácidos de FGFR1c, por ejemplo, posibles sitios de glucosilación unidos a N. Por lo tanto, las proteínas de unión a antígeno pueden unirse a o generarse a partir de proteínas glucosiladas en una o más de las posiciones.

5

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, como se describe en esta invención, se unen a beta klotho solo o en complejo con un receptor de FGF, tal como FGFR2c. A continuación, se proporciona una secuencia de ácido nucleico codificante de FGFR2c humano:

```

atggtcagctggggctggttcatctgcctggctggtggtcaccatggcaaccttgccctggc
ccggccctccttcagtttagttgaggataaccacattagagccagaagagccaccaaccaa
accaaattctctcaaccagaagtgtacgtggctgcgccaggggagtcgctagaggtgctgctg
ctgttgaaagatgccgccgtgatcagttggactaaggatgggggtgcacttggggcccaaca
taggacagtgcttattggggagtacttgcagataaaggcgccacgcctagagactccggcc
tctatgcttgactgccagtaggactgtagacagtgaaacttggacttcatggatgaatgct
acagatgccatctcatccggagatgatgaggatgacaccgatggtgcggaagatthttgtcag
tgagaacagtaacaacaagagagcaccatactggaccaacacagaaaagatggaaaagcggc
tccatgctgtgcctgcgcccaactgtcaagtttcgctgccagccggggggaacccaatg
ccaacatgcggtggctgaaaaacgggaaggagttaagcaggagcatcgcatggaggcta
caaggtacgaaaccagcactggagcctcattatggaaagtgtggtcccatctgacaaggaa
attatacctgtgtagtggaatgaatacgggtccatcaatcacacgtaccacctggatggt
gtggagcgatgcctcaccggcccatcctccaagccggactgccggcaaattgectccacagt
ggtcggaggagacgtagagtttgtctgcaaggtttacagtgatgccagccccacatccagt
ggatcaagcacgtggaaaagaacggcagtaatacgggcccgcgggctgcctacctcaag
gttctcaaggcccggtgttaacaccacggacaaagagattgaggttctctatattcgaa
tgtaacttttgaggacgctggggaatatacgtgcttggcgggtaattctattgggatccct
ttcactctgcatggttgacagttctgccagcgcctggaagagaaaaggagattacagcttcc
ccagactacctggagatagccatthtactgcataggggtcttcttaatcgctgtatggtggt

```

10

ES 2 808 340 T3

aacagtcacacctgtgccgaatgaagaacacgaccaagaagccagacttcagcagccagccgg
ctgtgcacaagctgaccaaacgtatccccctgctggagacaggtaacagtttcggctgagtc
agctcctccatgaactccaacacccccgctgggtgaggataacaacacgcctctcttcaacggc
agacacccccatgctggcaggggtctccgagtatgaacttccagaggacccaaaatgggagt
ttccaagagataagctgacactgggcaagcccctgggagaaggttgctttgggcaagtggtc
atggcggaagcagtggaattgacaaagacaagcccaaggaggcggtcaccgtggccgtgaa
gatggtgaaagatgatgccacagagaaagacctttctgatctgggtgcagagatggagatga
tgaagatgattgggaaacacaagaatatcataaatcttcttggagcctgcacacaggatggg
cctctctatgtcatagttgagtatgcctctaaaggcaacctccgagaatacctccgagccc
gagccacccccggatggagtactcctatgacattaaccgtgttctctgaggagcagatgacct
tcaaggacttgggtgcatgcacctaccagctggccagaggcatggagtacttggcttcccaa
aatgtattcatcgagatttagcagccagaaatgttttgtaacagaaaacaatgtgatgaa
aatagcagacttggactcgcagagatatcaacaatatagactattacaaaaagaccacca
atgggcggttccagtaagtggatggctccagaagccctgtttgatagagtatacactcat
cagagtgatgtctggtccttcgggggtgtaatgtgggagatcttacttttagggggctcgc
ctaccagggattcccgtggaggaactttttaagctgctgaaggaaggacacagaatggata
agccagccaactgcaccaacgaactgtacatgatgatgagggactggtggcatgcagtgcc
tcccagagaccaacggtcaagcagttggtagaagacttggatcgaattctcactctcacaac
caatgaggaataacttggacctcagccaacctctcgaacagtattcacctagttaccctgaca
caagaagttcttgttcttcaggagatgattctgtttttctccagaccccatgccttacgaa
ccatgccttctcagtatccacacataaacggcagtggttaaacatga

(SEQ ID NO:310)

La secuencia de aminoácidos de FGFR2c humano se proporcionan a continuación; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados:

5

mvswgrficlvvvvmatlslaRPSFSLVEDTTLEPEEPPTYQISQPEVYVAAPGESLEVRC
LLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLI GEYLQIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNV
TDAISSGDEDDTDGAEDFVSENSNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPM
PTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVPDKNYTCVENEYGSINHTYHLDV
VERSPHRPILQAGLPANASTVVGDDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLK
VLKAAGVNTTDKEIEVLYIRNVT FEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAWLTVLPAPGREKEITAS
PDYLEIAIYICIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLRRQVTVSAES
SSMNSNTPLVRIITRRLSSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGCFGQVV
MAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNI INLLGACTQDG

ES 2 808 340 T3

PLYVIVEYASKGNLREYLRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQ
KCIHRDLAARNVLVTENNVMKIADFLGARDINNIDYKKT'TNGRLPVKWMPEALFDRVYTH
QSDVWSFGVLMWEI'FTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDK PANCTNELYMMMRDCWHAVP
SQRPTFKQLVEDLDRILTLTTNEEYLDLSQPLEQYSPSYPDTRSSCSSGDDSVFSPDMPYE
PCLPQYPHINGSVKT

(SEQ ID NO:311)

Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, como se describe en esta invención, se unen a beta klotho solo o en complejo con un receptor de FGF, tal como FGFR3c. A continuación, se proporciona una
5 secuencia de ácido nucleico codificante de FGFR3c humano (número de acceso GenBank NM 000133):

atggggcgccccctgctgcgccctcgcgctctgcggtggccgtggccatcgtggccggcgccctc
ctcggagtccttggggacggagcagcgcgctcgtggggcgagcggcagaagtcccgggcccag
agcccggccagcaggagcagttggtcttcggcagcggggatgctgtggagctgagctgtccc
ccgcccgggggtggtcccatggggcccactgtctgggtcaaggatggcacagggctggtgccc
ctcggagcgtgtcctggtggggccccagcggctgcaggtgctgaatgcctcccacgaggact
ccggggcctacagctgccggcagcggctcacgcagcgcgtactgtgccacttcagtgtgcgg
gtgacagacgctccatcctcgggagatgacgaagacggggaggacgaggctgaggacacag
tgtggacacaggggccccttactggacacggccccgagcggatggacaagaagctgctggccc
tgccggccgccaacaccgtccgcttccgctgccagccgctggcaacccccactccctccatc
tccctggctgaagaacggcagggagttccgcgggcagcaccgcattggaggcatcaagctgcg
gcatcagcagtgaggcctggtcatggaaagcgtggtgccctcggaccgcggaactacacct
gcgtcgtggagaacaagtttggcagcatccggcagacgtacacgctggacgtgctggagcgc
tccccgcaccggcccctcctgcaggcggggctgccggccaaccagacggcggtgctggggcag
cgacgtggagttccactgcaaggtgtacagtgacgcacagccccacatccagtggctcaagc
acgtggaggtgaatggcagcaaggtggggcccgacggcacaccctacgttacogtgcctcaag
acggcggggcgctaaccaccgacaaggagctagaggttctctccttgccacaacgtcacctt
tgaggacgcccggggagtagacacctgctggcgggcaattctattgggttttctcatcactctg
cgtggctggtggtgctgccagccgaggaggagctggtggaggctgacgaggcgggcagtggtg
tatgcaggcatcctcagctacgggggtgggcttcttccctgttcatcctggtggtggcggtgtg
gacgctctgccgcctgcgcagccccccaagaaaggcctgggctccccaccgtgcacaaga
tctcccgttcccgtcaagcgacaggtgtccctggagtcacaacgcgtccatgagctccaac
acaccactggtgcgcacatcgcaaggctgtcctcaggggagggccccacgctggccaatgtctc
cgagctcgagctgcctgccgacccccaaatgggagctgtctcgggcccggctgacctggggca

ES 2 808 340 T3

agccccctggggagggtgcttcggccaggtggtcatggcggaggccatcggcattgacaag
gaccgggcccgaagcctgtcaccgtagccgtgaagatgctgaaagacgatgccactgacaa
ggacctgtcggacctggtgtctgagatggagatgatgaagatgatcgggaaacacaaaaaca
tcatcaacctgctgggcgctgcacgcagggcgggccctgtacgtgctggtggagtacgcg
gccaaaggtaacctgcgggagtttctgcgggcgcgcgcccccgggcctggactactcctt
cgacacctgcaagccgcccaggagcagctcaccttcaaggacctggtgtcctgtgcctacc
aggtggccccggggcatggagtacttggcctcccagaagtgcacccacagggacctggctgcc
cgcaatgtgctggtgaccgaggacaacgtgatgaagatcgcagacttcgggctggccccggga
cgtgcacaacctcgactactacaagaagacaaccaacggccggctgcccgtgaagtggatgg
cgctgaggccttgtttgaccgagtctacactcaccagagtgcgtctggtcctttggggctc
ctgctctgggagatcttcacgctggggggctccccgtaccccggcatccctgtggaggagct
cttcaagctgctgaaggagggccaccgcatggacaagcccgccaactgcacacacgacctgt
acatgatcatgcgggagtgtggcatgcccgcgcctcccagaggcccaccttcaagcagctg
gtggaggacctggacctgtccttaccgtgacgtccaccgacgagtacctggacctgtcggc
gcctttcgagcagtactccccgggtggccaggacacccccagctccagctcctcaggggacg
actcctgttttggccacgacctgctgcccccgccccaccagcagtgggggctcgcgggacg
tga

(SEQ ID NO:312)

Las secuencias de aminoácidos de FGFR3c humano se proporcionan a continuación; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados:

5

mgapacalalcvavaivagassESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFGSGDAVELSCP
PPGGGPMGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYSCRQLTQRVLCHFVSR
VTDAPSSGDDEDGEDEAEDTGVDTGAPYWTRPERMDKLLAVPAANTVFRFCPAAGNPTPSI
SWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQWLSLVMESVVPDRGNYTCVVENKFGSIRQTYTLVDLER
SPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVYSDAQPHIQWLKHVEVNGSKVGPDGTPTYVTVLK
TAGANTTDKELEVLSLHNVTFEDAGEYTCLAGNSIGFSHHSAWLVVLPAAEELVEADEAGSV
YAGILSYGVGFFFLFILVVAAVTLCRLRSPPKKGLGSPTVHKISRFP LKRQVSLESNASMSSN
TPLVRIARLSSGEGPTLANVSELELPADPKWELSRARLTGKPLGEGCFGQVVMMAEAIGIDK
DRAAKPVTVAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQGGPLYVLVEYA
AKGNLREFLRARRPPGLDYSFDTCKPPEEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKCIHRDLAA
RNVLVTEDNVMKIADFGLARDVHNLDYKKTNGRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVWSFGV
LLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMIMRECWHHAAPSQRPTFKQL
VEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDTPSSSSSGDSDVFAHDLLPPAPPSSGGSRT

(SEQ ID NO:313)

10 Las proteínas de unión, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, como se describe en esta invención, se unen a beta klotho solo o en complejo con un receptor de FGF, tal como FGFR4. A continuación, se proporciona una

ES 2 808 340 T3

secuencia de ácido nucleico codificante de FGFR4 humano:

```
atgCGGctgctgctggccctgTTgggggtcctgctgagTgtgctggccctccagTcttgtc
cctggaggcctctgaggaagTggagcttgagccctgctggctcccagcctggagcagcaag
agcaggagctgacagtagcccttgggcagcctgtgCGTctgtgctgtgggCGGctgagcgt
ggTggccactggTacaaggagggcagTgcctggcacctgctggccgtgtacggggctggag
gggCCgcctagagattgccagcttctacctgaggatgctggccgctacctctgctggcac
gaggctccatgatcgtcctgcagaatctcaccttgattacaggtgactccttgacctccagc
aacgatgatgaggaccccaagtcccatagggacccctcgaataggcacagttacccccagca
agcaccctactggacacacccccagcgcattggagaagaaactgcatgcagTacctgCGggga
acaccgtcaagttccgctgtccagctgcaggcaacccacgcccaccatccgctggcttaag
gatggacaggccttctcatggggagaaccgcattggaggcattcggctgCGccatcagcactg
gagTctcgtgatggagagcgtggTgCCctcggaccgCGgcacatacacctgctggtagaga
acgctgtgggcagcatccgctataactacctgctagatgtgctggagcggTccccgcaccgg
cccatcctgcaggccgggctccccggccaacaccacagccgtggTgggcagcgaCGtgagct
gctgtgcaaggtgtacagcgatgcccagccccacatccagTggctgaagcacatcgtcatca
acggcagcagcttCGgagccgacggTttccctatgtgcaagTcctaaagactgcagacatc
aatagctcagaggtggaggtcctgtacctgCGgaacgtgtcagccgaggacgcaggcgagta
cacctgctcgcaggcaattccatcggcctctcctaccagTctgctggctcaccggtgctgc
cagaggaggacccacatggaccgcagcagcgcggaggccaggtatacggacatcatcctg
tacgCGtcgggctccctggccttggctgtgctcctgctgctggccgggctgtatcaggggca
ggcgtccacggccggcacccccgcccgcccgccactgtgcagaagctctcccgttccctc
tggccccgacagTtctccctggagtcaggctcttccggcaagTcaagctcatccctggTaca
ggcgtgCGtctctcctccagcggccccgccttGctcgcCGcctcgtgagTctagatctacc
tctcgaCCactatgggagTtccccgggacaggctggTgcttgggaagccctaggcgag
gctgcttTggccaggtagTactgTgcagaggccttTggcatggaccctgcccggcctgaccaa
gccagcactgtggccgtcaagatgctcaaagacaacgcctctgacaaggacctggccgacct
ggTctcggagatggaggtgatgaagctgatcggccgacacaagaacatcatcaacctgcttG
gtgtctgcaCCcaggaaggccccctgtacgtgatcgtggagTgcgCCgccaagggaaacctg
cgggagTtctgCGggccccggcCCCCcaggccccgacctcagccccgacggTcctcggag
```

cagtgaggggcccgcctctccttcccagtcctggtctcctgcgccctaccaggtggcccaggca
 tgcagtatctggagtcccggaagtgtatccaccgggacctggctgcccgaatgtgctggtg
 actgaggacaatgtgatgaagattgctgactttgggctggcccgcggcgtccaccacattga
 ctactataagaaaaccagcaacggccgcctgcctgtgaagtggatggcgcccaggccttgt
 ttgaccgggtgtacacacaccagagtgcctgtggtcttttgggatcctgctatgggagatc
 ttcaccctcgggggctccccgtatcctggcatccccgggtggaggagctgttctcgtgctgcg
 ggagggacatcggatggaccgacccccacactgccccccagagctgtacgggctgatgctg
 agtgcctggcacgcagcgcctcccagaggcctacctcaagcagctgggtggaggcgtggac
 aaggtcctgctggcctctctgaggagtaacctcgacctccgctgaccttcggacctatc
 ccctctggtggggacgccagcagcacctgctcctccagcgattctgtcttcagccacgacc
 ccctgccattgggatccagctccttccccttcgggtctggggtgcagacatga

(SEQ ID NO:314)

La secuencia de aminoácidos de FGFR4 humano (número de acceso de GenBank NP. 002002.3) se proporciona a continuación; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados:

5

mrlllallgvllsvpgppvlsLEASEEVELEPCLAPSLEQQEQELTVALGQPVRLCCGRAER
 GGHWYKEGSRLAPAGRVRGWRGRLEIASFLPEDAGRYLCLARGSMIVLQNLTLITGDSLTS
 NDEDEPKSHRDP SNRHSYPQQAPYWTHPQRMEKKLHAVPAGNTVKFRCPAAGNPTPTIRWLK
 DGQAFHGENRIGGIRLRHQHWSLVMSVVP SDRGTYTCLVENAVGSIRYNYLLDVLERSPHR
 PILQAGLPANTTAVVGS DVELLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYVQVLKTADI
 NSSEVEVLYLRNVAEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEEDPTWTAAPARYTDIIL
 YASGSLALAVLLLLAGLYRGQALHGRHRPPATVQKLSRFPLARQFSLESGSSGKSSSSLVR
 GVRLSSSGPALLAGLVSLDLPLDPLWEFPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVRAEAFGMDPARPDQ
 ASTVAVKMLKDNASDKDLADLVSEMEVMKLI GRHKNI INLLGVCTQEGPLYVIVECAAKGNL
 REFLRARRPPGPDLS PDGPRSSEGPLSFPVLVSCAYQVARGMQYLESRKCIHRDLAARNVLV
 TEDNVMKIADFG LARGVHHIDYKKT SNGRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVWSFGIILLWEI
 FTLGGSPYPGIPVEELF SLLREGHRMDRPPHCPPELYGLMRECWHAA PSQRPTFKQLVEALD
 KVLLAVSEEYLDLRLTFGPYSPSGDASSTCSSSDSVF SHDPLPLGSSSFPPFGSGVQT

(SEQ ID NO:315)

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que un anticuerpo puede unirse selectivamente. Un antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético.
 10 Preferentemente, el antígeno diana es un polipéptido.

El término "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno", y términos similares se refieren a la porción de un anticuerpo que comprende los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad por el antígeno (*por ejemplo*, las regiones
 15 determinantes de complementariedad (CDR)).

Los términos "se une" o "que se une" se refieren a una interacción entre moléculas que incluye, por ejemplo, formar un complejo. Las interacciones pueden ser, por ejemplo, interacciones no covalentes, incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas e/o interacciones de van der Waals. Un complejo también puede incluir la
 20 unión de dos o más moléculas unidas por enlaces, interacciones o fuerzas covalentes o no covalentes. La fuerza de

las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión a antígeno en un anticuerpo y un único epítipo de una molécula diana, tal como beta klotho, es la afinidad del anticuerpo o fragmento funcional por ese epítipo. La relación de asociación (k_1) a disociación ($k-1$) de un anticuerpo a un antígeno monovalente ($k_1/k-1$) es la constante de asociación K , que es una medida de la afinidad. El valor de K varía para los diferentes complejos de anticuerpo y antígeno y depende tanto de k_1 como de $k-1$. La constante de asociación K para un anticuerpo proporcionado en esta invención puede determinarse usando cualquier procedimiento proporcionado en esta invención o cualquier otro procedimiento bien conocido para los expertos en la materia. La afinidad en un sitio de unión no siempre refleja la verdadera fuerza de la interacción entre un anticuerpo y un antígeno. Cuando los antígenos complejos que contienen múltiples determinantes antigénicos repetitivos, tales como un beta klotho polivalente, entran en contacto con anticuerpos que contienen múltiples sitios de unión, la interacción del anticuerpo con el antígeno en un sitio aumentará la probabilidad de una reacción en un segundo sitio. La fuerza de tales múltiples interacciones entre un anticuerpo multivalente y antígeno se denomina avidéz. La avidéz de un anticuerpo puede ser una mejor medida de su capacidad de unión de lo que es la afinidad de sus sitios de unión individuales. Por ejemplo, la alta avidéz puede compensar una baja afinidad como a veces se encuentra para los anticuerpos pentaméricos IgM, que pueden tener una afinidad más baja que la IgG, pero la alta avidéz de la IgM, como resultado de su multivalencia, le permite unirse al antígeno de manera efectiva.

Los términos "anticuerpos que se unen específicamente a beta klotho", "anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo beta klotho", y términos análogos también se utilizan indistintamente en esta invención y se refieren a anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido beta klotho, tal como un antígeno, o fragmento, o epítipo beta klotho (*por ejemplo*, beta klotho humano tal como un polipéptido, antígeno o epítipo beta klotho humano). Un anticuerpo que se une específicamente a beta klotho, (*por ejemplo*, beta klotho humano) se puede unir al dominio extracelular o un péptido derivado del dominio extracelular de beta klotho beta klotho. Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno beta klotho (*por ejemplo*, beta klotho humano) puede reaccionar de forma cruzada con antígenos relacionados (*por ejemplo*, beta klotho cyno). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno beta klotho no reacciona de forma cruzada con otros antígenos. Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno beta klotho puede identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, Biacore, u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Un anticuerpo se une específicamente a un antígeno beta klotho cuando se une a un antígeno beta klotho con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reacción cruzada como se determina utilizando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces señal de fondo o ruido y puede ser más de 10 veces de fondo. Véase *por ejemplo*, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology segunda edición, Raven Press, Nueva York, en las páginas 332 336 para un análisis con respecto a la especificidad del anticuerpo. Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés (*por ejemplo*, un antígeno diana tal como beta klotho) es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad tal que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico en la selección de una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a una proteína "no diana" será inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a su proteína diana particular, *por ejemplo*, como se determina por el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, *por sus siglas en inglés*) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana de polipéptido particular significa la unión que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, *por ejemplo*, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. *Por ejemplo*, la unión específica puede determinarse mediante la competencia con una molécula de control similar a la diana, *por ejemplo*, un exceso de diana sin marcar. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe de forma competitiva mediante el exceso de la diana sin marcar. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana de polipéptido particular como se usa en esta invención se puede mostrar, *por ejemplo*, mediante una molécula que tiene una K_d para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor. El término "unión específica" se refiere a la unión donde una molécula se une a un polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico. En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a beta klotho tiene una constante de disociación (K_d) inferior o igual a 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, o 0,1 nM. Cuanto menor sea la K_D , mayor será la afinidad del anticuerpo anti-beta klotho. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-beta klotho se une a un epítipo de beta klotho que se conserva entre el beta klotho de diferentes especies (*por ejemplo*, entre beta klotho humano y cyno).

El término "competir" cuando se utiliza en el contexto de anticuerpos anti-beta klotho (*por ejemplo*, anticuerpos agonistas y proteínas de unión que se unen a (i) beta klotho; o (ii) un complejo que comprende beta klotho y uno de FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, y FGFR4) que compiten por el mismo epítipo o sitio de unión en una diana significa competencia entre lo determinado por un ensayo en el que el anticuerpo (o fragmento de unión) del mismo en estudio 5 impide o inhibe la unión específica de una molécula de referencia (*por ejemplo*, un ligando de referencia, o proteína de unión a antígeno de referencia, tal como un anticuerpo de referencia) a un antígeno común (*por ejemplo*, beta klotho o un fragmento del mismo). Se pueden usar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si un anticuerpo de prueba compete con un anticuerpo de referencia para unirse a beta klotho (*por ejemplo*, beta klotho humano). Los ejemplos de ensayos que se pueden emplear incluyen radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competencia en sándwich 10 (véase, *por ejemplo*, Stahli y col., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA biotina-avidina directa en fase sólida (véase, *por ejemplo*, Kirkland y col., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619) ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo en sándwich marcado directo en fase sólida (véase, *por ejemplo*, Harlow y Lane, (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA marcado directamente en fase sólida usando 1-125 marcadores (véase, *por ejemplo*, Morel y col., (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA biotina-avidina directa en fase sólida (véase, *por ejemplo*, Cheung, y col., (1990) *Virology* 176:546-552); y RIA marcado directo (Moldenhauer y col., (1990) *Scand. Immunol.* 32:77-82). Típicamente, tal ensayo implica el uso de un antígeno purificado (*por ejemplo*, beta klotho tal como beta klotho humano) unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de una proteína de unión a antígeno de prueba no marcado (*por ejemplo*, anticuerpo de prueba anti-beta klotho) o una proteína de unión a antígeno de referencia marcado (*por ejemplo*, anticuerpo de referencia anti-beta klotho). La inhibición competitiva puede medirse determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las células en presencia de la proteína de unión al antígeno de prueba. Por lo general, la proteína de unión al antígeno de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competencia (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y/o anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente 25 próximo al epítipo unido por la referencia para que se produzca el impedimento estérico de los anticuerpos. Los detalles adicionales con respecto a los procedimientos para la determinación de la unión competitiva se describen en esta invención. Por lo general, cuando una proteína de anticuerpos competidores está presente en exceso, inhibirá la unión específica de los anticuerpos de referencia a un antígeno común en al menos 23 %, *por ejemplo* 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %]. En algún caso, la unión es inhibida en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 30 96 % o 97 %, 98 %, 99 % o más.

El término "anticuerpo anti-beta klotho" o "un anticuerpo que se une a beta klotho" incluye un anticuerpo que es capaz de unirse a beta klotho con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a beta klotho. Preferentemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-beta klotho a una 35 proteína no beta-klotho no relacionada es menor que aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a beta klotho como se mide, *por ejemplo*, por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o un inmunoensayo tal como un radioinmunoensayo (RIA). Más arriba se ilustra un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" beta klotho. Un anticuerpo que se une a beta klotho, como se define en las reivindicaciones, tiene una constante de disociación (Kd) inferior o igual a 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 40 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, o 0,1 nM y/o es superior o igual a 0,1 nM. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-beta klotho se une a un epítipo de beta klotho que se conserva entre el beta klotho de diferentes especies (*por ejemplo*, entre beta klotho humano y cyno).

Un anticuerpo "aislado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente 45 celular o tisular y/u otros componentes contaminantes de los que el anticuerpo se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpos que tienen menos de aproximadamente 50 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, o 1 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en esta invención "proteína contaminante"). En determinadas realizaciones, cuando el anticuerpo se produce de forma recombinante, el mismo está sustancialmente libre de medio de cultivo, *por ejemplo*, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 1 % del volumen de la preparación de proteína. En determinadas realizaciones, cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, está sustancialmente libre de 55 precursores químicos u otros productos químicos, *por ejemplo*, está separado de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En consecuencia, tales preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 1 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. Los componentes contaminantes también pueden incluir, pero no se limitan a, materiales que podrían interferir con los usos terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, 60 hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el procedimiento de Lowry (Lowry y col. *J. Bio. Chem.*

193: 265-275, 1951), tal como 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %, en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o internal mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. En realizaciones específicas, los anticuerpos proporcionados en esta invención están aislados.

Una unidad de anticuerpos de 4 cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente tiene aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (VH) seguido de tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios CH para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N un dominio variable (VL) seguido de un dominio constante (CL) en su otro extremo. El VL está alineado con el VH y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que los residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un VH y VL forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, *por ejemplo*, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligeras o pesadas de un anticuerpo que generalmente se encuentra en el amino-terminal de la cadena ligera o pesada y tiene una longitud de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La región variable de la cadena pesada se puede denominar "VH". La región variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de las regiones variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos. La región V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través del intervalo de 110 aminoácidos de las regiones variables. En cambio, las regiones V consisten en extensiones menos variables (*por ejemplo*, relativamente invariables) llamadas regiones de estructura (FR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de mayor variabilidad (*por ejemplo*, variabilidad extrema) llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una aproximadamente 9-12 aminoácidos de longitud. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras comprenden cada una cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase, *por ejemplo*, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)). Las regiones constantes no están involucradas directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las regiones variables difieren ampliamente en la secuencia entre los distintos anticuerpos. La variabilidad en la secuencia se concentra en las CDR, mientras que las porciones menos variables en la región variable se denominan regiones de estructura (FR). Las CDR de las cadenas ligeras y pesadas son las principales responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno. En realizaciones específicas, la región variable es una región variable humana.

El término "numeración de residuos de región variable como en Kabat" o "numeración de posiciones de aminoácidos como en Kabat", y sus variaciones, se refiere al sistema de numeración utilizado para regiones variables de la cadena pesada o regiones variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más correspondientes a un acortamiento o inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (*por ejemplo*, los residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después del residuo FR de cadena pesada 82. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena

pesada) (*por ejemplo*, , Kabat y col., Sequences of Immunological Interest. 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991)). El "sistema de numeración de la UE" o "índice de la UE" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*por ejemplo*, el índice EU indicado en Kabat y col., supra). El "índice de la UE como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG 1 EU humano. Se han descrito otros sistemas de numeración, incluyendo, por ejemplo, AbM, Chothia, Contacto, IMGT y Ahon. Diversos sistemas de números se ilustran en las figuras 1-3.

Un anticuerpo "intacto" es el que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un CL y al menos las regiones constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las regiones constantes pueden incluir regiones constantes humanas o variantes de secuencia de aminoácidos de las mismas. Preferentemente, un anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente, la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos y di-diacuerpos (véase, *por ejemplo*, Holliger, P. y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6444-8; Lu, D. y col., (2005) J. Biol. Chem. 280:19665-72; Hudson y col., Nat. Med. 9:129-134 (2003); el documento WO 93/11161; y las patentes de los EE. UU. n.º 5.837.242 y 6.492.123); moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (véase, *por ejemplo*, las patentes de los EE. UU. n.º 4.946.778; 5.260.203; 5.482.858 y 5.476.786); anticuerpos de dominio variable de dual (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 7.612.181); anticuerpos de dominio variable único (sdAbs) (véase, *por ejemplo*, Woolven y col, Immunogenetics 50: 98-101, 1999; Streltsov y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 101:12444-12449, 2004); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "fragmento funcional" o "fragmento de unión" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo terapéutico mostrará al menos una, si no algunas o todas las funciones biológicas atribuidas al anticuerpo intacto, comprendiendo la función al menos la unión al antígeno diana, (*por ejemplo*, un fragmento de unión a beta klotho o un fragmento que se une a beta klotho).

El término "proteína de fusión", como se usa en esta invención, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo y una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína heteróloga (*por ejemplo*, un polipéptido o proteína que normalmente no forman parte del anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo de unión a antígeno no anti-beta klotho)). El término "fusión" cuando se usa en relación con beta klotho o con un anticuerpo anti-beta klotho se refiere a la unión de un péptido o polipéptido, o fragmento, variante y/o derivado del mismo, con un péptido o polipéptido heterólogo. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión conserva la actividad biológica del beta klotho o el anticuerpo anti-beta klotho. La proteína de fusión comprende una región VH del anticuerpo beta klotho, la región VL, VH CDR (tres VH CDR, y/o VL CDR (tres VL CDR), como se define en las reivindicaciones donde la proteína de fusión se une a un epítipo beta klotho, un fragmento beta klotho y/o un polipéptido beta klotho.

El término "cadena pesada" cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere a una cadena polipeptídica de aproximadamente 50-70 kDa, donde la porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 120 a 130 o más aminoácidos y una porción carboxi-terminal que incluye una región constante. La región constante puede ser uno de los cinco tipos distintos, (*por ejemplo*, isotipos) denominados alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basado en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño: α , δ y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ contienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cuando se combinan con una cadena ligera, estos distintos tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases bien conocidas (*por ejemplo*, isotipos) de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Una cadena pesada puede ser una cadena pesada humana.

El término "cadena ligera" cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere a una cadena polipeptídica de aproximadamente 25 kDa, donde la porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 110 o más aminoácidos y una porción carboxi-terminal que incluye una región constante. La longitud aproximada de una cadena ligera es de entre 211 a 217 aminoácidos. Hay dos tipos distintos, denominados kappa (κ) de lambda (λ) basados en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera son bien conocidas en la técnica. Una cadena ligera puede ser una cadena ligera humana.

El término "huésped" como se usa en esta invención se refiere a un animal, tal como un mamífero (*por ejemplo*, un humano).

El término "célula huésped" como se usa en esta invención se refiere a una célula sujeto particular que puede ser transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de tal célula. La progenie de tal célula puede no ser idéntica a la célula madre transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden producirse en generaciones sucesivas o la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en esta invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *por ejemplo*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores, y cada anticuerpo monoclonal típicamente reconocerá un único epítipo en el antígeno. En realizaciones específicas, un anticuerpo monoclonal típicamente reconocerá un único epítipo en el antígeno. En realizaciones específicas, un "anticuerpo monoclonal", como se usa en esta invención, es un anticuerpo producido por un único hibridoma u otra célula, donde el anticuerpo se une solo a un epítipo beta klotho como se determina, por ejemplo, por ELISA u otra unión a antígeno o ensayo de unión competitiva conocido en la técnica. El término "monoclonal" no se limita a ningún procedimiento particular para la fabricación del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente descripción se pueden preparar mediante la metodología del hibridoma descrita por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden fabricarse usando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas de animales o plantas (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE.UU n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en (1991) Clackson y col., *Nature* 352: 624-628 y Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Otros procedimientos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados de este modo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5ª edición, Ausubel y col., eds, John Wiley and Sons, Nueva York). Se proporcionan procedimientos de producción ejemplares de anticuerpos monoclonales en los ejemplos de esta invención.

El término "nativo" cuando se utiliza en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped, y similares, se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados, modificados y/o cambiados (*por ejemplo*, aislados, purificados, seleccionados) por un ser humano.

Los anticuerpos proporcionados en esta invención pueden incluir anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase, la patente de los EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son anticuerpos quiméricos que incluyen inmunoglobulinas humanas (*por ejemplo*, anticuerpo receptor) en las que los residuos de CDR nativos se reemplazan por residuos procedentes de la correspondiente CDR de una especie no humana (*por ejemplo*, anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos aspectos, uno o más residuos de la región FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Una cadena pesada o ligera de anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todas de al menos una o más regiones variables, en las que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. En determinadas realizaciones, el anticuerpo humanizado comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:4285-4289 (1992); y la patente de los EE. UU. n.º: 6.800.738 (concedida el 05 de octubre de 2004), 6.719.971 (concedida el 27 de septiembre de 2005), 6.639.055 (concedida el 28 de octubre de 2003), 6.407.213 (concedida el 18 de junio de 2002), y 6.054.297 (concedida el 25 de abril de 2000).

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha fabricado usando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos como se describe en esta invención. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991) y las bibliotecas de presentación en levaduras (Chao col., *Nature Protocols* 1: 755-768 (2006)). También están disponibles para la preparación de

anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol* 5, 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al desafío antigénico, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, *por ejemplo*, ratones (véase, *por ejemplo*, Jakobovits, A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995, 6(5):561-6; Brüggemann y Taussing, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8(4):455-8; y las patentes de los EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, *por ejemplo*, Li y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 103: 3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de células B humanas.

10

Una "CDR" se refiere a una de las tres regiones hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región de no estructura de la estructura de lámina β VH de la inmunoglobulina (Ig o anticuerpo), o una de las tres regiones hipervariables (L1, L2 o L3) dentro de la región de no estructura de la estructura de lámina β VL del anticuerpo. En consecuencia, las CDR son secuencias de región variable intercaladas dentro de las secuencias de la región de estructura. Las regiones CDR son bien conocidas por los expertos en la materia y han sido definidas, *por ejemplo*, por Kabat como las regiones de mayor hipervariabilidad dentro de los dominios variables (V) de anticuerpos (Kabat y col., *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat, *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75 (1978)). Las secuencias de la región de CDR también se han definido estructuralmente por Chothia como aquellos residuos que no son parte de la estructura conservada de lámina β , y por lo tanto pueden adaptar diferentes conformaciones (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Ambas terminologías son bien reconocidas en la técnica. Las secuencias de la región CDR también han sido definidas por AbM, Contact e IMGT. Las secuencias de la región CDR se ilustran en las figuras 1-3. Las posiciones de las CDR dentro de una región variable de anticuerpos canónica se han determinado mediante la comparación de numerosas estructuras (Al-Lazikani y col., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); Morea y col., *Methods* 20:267-279 (2000)). Debido a que el número de residuos dentro de una región hipervariable varía en diferentes anticuerpos, los residuos adicionales relativos a las posiciones canónicas se numeran convencionalmente con a, b, c y así sucesivamente junto al número de residuo en el esquema de numeración de la región variable canónica (Al-Lazikani y col., *supra* (1997)). Los expertos en la materia conocen de forma similar esta nomenclatura.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en esta invención, se refiere a las regiones de una región variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Se están utilizando varias delineaciones de regiones hipervariables y se abarcan en esta invención. Las regiones determinantes de la complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (véase, *por ejemplo*, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991)). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (véase, *por ejemplo*, Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se enumera utilizando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si ninguno de 35A y 35B está presente, el bucle termina en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (véase, *por ejemplo*, Martin, en *Antibody Engineering*, vol. 2, capítulo 3, Springer Verlag). Las regiones hipervariables de "contact" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables o CDR se indican a continuación.

Recientemente, se ha desarrollado y adoptado ampliamente un sistema de numeración universal, (ImMunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc y col., *Dev. (Comp. Immunol.* 27(1):55-77 (2003)). IMGT es un sistema integrado de información especializada en inmunoglobulinas (IG), receptores de células T (TR) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de humanos y otros vertebrados. En esta invención, se hace referencia a las CDR en términos de la secuencia de aminoácidos y la ubicación dentro de la cadena ligera o pesada. Como la "ubicación" de las CDR dentro de la estructura del dominio variable de inmunoglobulina se conserva entre las especies y está presente en estructuras llamadas bucles, mediante el uso de sistemas de numeración que alinean las secuencias del dominio variable según las características estructurales, las CDR y los residuos de la estructura y son fácilmente identificados. Esta información se puede utilizar para injertar y reemplazar los residuos de CDR de las inmunoglobulinas de una especie en una estructura aceptora de, típicamente, un anticuerpo humano. Un sistema de numeración adicional (Aho) ha sido desarrollado por Honegger y Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309: 657-670 (2001). La correspondencia entre el sistema de numeración, incluyendo, *por ejemplo*, la numeración de Kabat y el sistema de numeración única IMGT, es bien conocida por un experto en la materia (véase, *por ejemplo*, Kabat, *supra*; Chothia y Lesk, *supra*; Martín, *supra*; Lefranc y col., *supra*) y también se ilustra en las figuras 1-3. Un sistema ejemplar, que se muestra en esta invención, combina Kabat y Chothia.

	Sistema ejemplar	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
CDR 1 V _H	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
CDR 2 V _H	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
CDR 3 V _H	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
CDR1 V _L	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
CDR2 V _L	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
CDR3 V _L	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 o 26-35A (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el VH. Como se usa en esta invención, los términos "HVR" y "CDR" se utilizan indistintamente.

El término "región constante" o "dominio constante" se refiere a una porción carboxi terminal de la cadena ligera y pesada que no está implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero muestra diversas funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor Fc. Los términos se refieren a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con la otra porción de la inmunoglobulina, la región variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. La región constante puede contener las regiones CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y la región CL de la cadena ligera.

El término "estructura" o residuos "FR" son aquellos residuos de la región variable que flanquean las CDR. Los residuos de FR están presentes, por ejemplo, en anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, de dominio, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos biespecíficos. Los residuos de FR son aquellos residuos del dominio variable diferentes a los residuos de la región hipervariable o los residuos de CDR.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones (*por ejemplo*, variaciones de la secuencia de aminoácidos, incluyendo los cambios, adiciones y/o deleciones) en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esas alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Para una revisión, véase Hudson y Souriau, *Nature Medicine* 9:129-134 (2003); Hoogenboom, *Nature Biotechnol.* 23: 1105-1116 (2005); Quiroz y Sinclair, *Revista Ingeniería Biomedica* 4: 39-51 (2010).

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas pueden inhibir sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista" es un anticuerpo que desencadena una respuesta, *por ejemplo*, aquel que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (*por ejemplo*, FGF19 o FGF21). Un anticuerpo agonista incluye un anticuerpo que es un mimético de ligando, *por ejemplo*, donde un ligando se une a un receptor de superficie celular y la unión induce señalización o actividades celulares a través de una vía de señalización celular intercelular y donde el anticuerpo induce una señalización o activación celular similar.

Un "agonista" de beta klotho se refiere a una molécula que es capaz de activar o aumentar de otro modo una o más de las actividades biológicas de beta klotho, tal como en una célula que expresa beta klotho y un receptor de FGF. Un anticuerpo de la invención puede actuar, *por ejemplo*, activando o aumentando de otro modo la activación y/o las vías de señalización celular de una célula que expresa una proteína beta klotho y un receptor de FGF, aumentando así una actividad biológica mediada por beta klotho de la célula en relación con la actividad biológica mediada por beta klotho en ausencia de agonista. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos agonistas anti-beta klotho, incluyendo los anticuerpos que inducen la señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21.

La "afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (*por ejemplo*, una proteína de unión tal como un anticuerpo) y su compañero de unión (*por ejemplo*, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en esta invención, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (*por ejemplo*, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula de unión X por su compañero de unión Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (K_D). La afinidad se puede medir utilizando procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en esta invención. Los anticuerpos de baja

afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos por más tiempo. En la técnica se conocen diversos procedimientos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los objetivos de la presente descripción. Las realizaciones ilustrativas específicas incluyen lo siguiente.

5 En una realización, la " K_D " o "el valor K_D " se puede medir mediante ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de unión. La K_D se puede medir en un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA), por ejemplo, realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno (Chen, y col., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). La K_D o el valor K_D también se puede medir mediante el uso de ensayos de resonancia de plasmón superficial por Biacore, utilizando, por ejemplo, un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), o mediante interferometría de biocapa usando, por ejemplo, el sistema OctetQK384 (ForteBio, Menlo Park, CA). También se puede determinar una "tasa de asociación" o "tasa de asociación" o "tasa de asociación" o "k asoc." con las mismas técnicas de resonancia de plasmón superficial o de interferometría de biocapa descritas anteriormente utilizando, por ejemplo, un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), o el sistema OctetQK384 (ForteBio, Menlo Park, CA).

15 La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual" denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (*por ejemplo*, uno asociado con un anticuerpo de la presente descripción y el otro asociado con un anticuerpo de referencia) de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por los valores (*por ejemplo*, valores K_D). Por ejemplo, la diferencia entre los dos valores puede ser inferior a aproximadamente 50 %, inferior a aproximadamente 40 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 5%, en función del valor para el anticuerpo de referencia.

25 La frase "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se usa en esta invención, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la presente descripción y el otro asociado con un anticuerpo de referencia) de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene importancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por los valores. Por ejemplo, la diferencia entre dichos dos valores puede ser preferentemente mayor que aproximadamente 10 %, mayor que aproximadamente 20 %, mayor que aproximadamente 30 %, mayor que aproximadamente 40 %, mayor que aproximadamente 50 %, en función del valor para el anticuerpo de referencia.

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

40 El término "región Fc" en esta invención se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, regiones Fc de secuencia nativa, regiones Fc recombinantes, y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana a menudo se define para extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo del mismo. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender las poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin los residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

50 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con una región de unión o dominio de unión (*por ejemplo*, una región o dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos como se describe.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza, y no manipulada, modificada, y/o cambiada (*por ejemplo*, aislada, purificada, seleccionada, que incluye o se combina con otras secuencias, tales como secuencias de región variable) por un ser humano. Las regiones Fc de secuencia nativa humana incluyen una región Fc de secuencia nativa de IgG1

humana (alotipos no A y A); una región Fc de secuencia nativa de IgG2 humana; una región Fc de secuencia nativa de IgG3 humana; y una región Fc de secuencia nativa de IgG4 humana, así como variantes naturales de las mismas.

Una región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, (*por ejemplo*, sustitución, adición o delección) preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en esta invención poseerá preferentemente al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología con la misma, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 % de homología con la misma. Por ejemplo, una variante con dos cambios de aminoácidos a alanina en dos posiciones en la secuencia de Fc de IgG1 humana se muestran en negrita en la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP**AL**AGGPSVFL
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:316)

Tal secuencia variante se puede utilizar en construcciones de cadena pesada humanizadas tal como se muestra a continuación para un 5H23-vH3 humanizado (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 7) designado 5H23(vH3)-hIgG1 (E233A) (L235A) como se proporciona a continuación; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados y la secuencia de la región variable está en negrita:

mdmrvpaqllgl1111w1rgarc**QVQLQDSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYDINWVRQA**
PGQGLEWIGWIYPGDGSTRKYNEKFKGKATITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSDYY
GSRSFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQOGNVFSCSV**MHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

(SEQ ID NO:317)

Una "región constante de la cadena ligera" incluye regiones constantes kappa y lambda. A continuación, se proporciona una región constante kappa ejemplar:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 318)

Tal secuencia de región constante kappa se puede utilizar en construcciones de la cadena ligera humanizada tal como se muestra a continuación para un 5H23-vL2 humanizado (véase, por ejemplo, el ejemplo 7) como se proporciona a continuación; los aminoácidos que componen la secuencia de señal están subrayados y la secuencia de la región

variable está en negrita:

mdmrvpaqlllgllllwlrgrarc**DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYVYMHWY**
QQKPGQPPKLLIYLASYLESGVPDRFSGSGSTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQHSRDLTFPF
GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 319)

- 5 El término "variante", cuando se usa en relación con beta klotho o con un anticuerpo anti-beta klotho puede referirse a un péptido o polipéptido que comprende uno o más (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5) sustituciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en comparación con una secuencia de beta klotho nativo o
- 10 sin modificar. Por ejemplo, una variante de beta klotho puede resultar de uno o más (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5) cambios a una secuencia de aminoácidos de un beta klotho nativo. También a modo de ejemplo, una variante de un anticuerpo anti-beta klotho puede resultar de uno o más (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 a
- 15 aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5) cambios a una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-beta klotho nativo o sin modificar previamente. Las variantes pueden ser de origen natural, tales como las variantes alélicas o de splicing, o pueden construirse de forma artificial. Las variantes del polipéptido pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican
- 20 las variantes. Como se describe en esta invención, la variante de beta Klotho o la variante de anticuerpo anti-beta klotho al menos conserva la actividad funcional de beta klotho o anticuerpo anti-beta klotho, respectivamente. Como se describe en esta invención, una variante de anticuerpo anti-beta klotho se une a beta klotho y/o es antagonista de la actividad beta klotho. Como se describe en esta invención, una variante de anticuerpo anti-beta klotho se une a beta klotho y/o es agonista de la actividad beta klotho. Como se describe en esta invención, la variante es codificada por
- 25 una variante de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) de una molécula de ácido nucleico que codifica regiones o subregiones VH o VL de anticuerpos beta klotho o anti-beta klotho, tal como una o más CDR.

- El término "vector" se refiere a una sustancia que se utiliza para llevar o incluir una secuencia de ácido nucleico, incluyendo por ejemplo, para introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores
- 30 aplicables para su uso incluyen, por ejemplo, vectores de expresión, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, que pueden incluir secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en el cromosoma de una célula huésped. Además, los vectores pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de expresión apropiadas. Los genes marcadores seleccionables que se pueden incluir, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan deficiencias
- 35 auxotróficas, o suministran nutrientes críticos que no están en los medios de cultivo. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares que son bien conocidos en la técnica. Cuando dos o más moléculas de ácido nucleico deben ser coexpresadas (*por ejemplo* tanto una cadena pesada y ligera de anticuerpo como un VH y VL de anticuerpo) ambas moléculas de ácido nucleico se pueden insertar, por ejemplo, en un único vector de expresión o en vectores
- 40 de expresión separados. Para la expresión de un solo vector, los ácidos nucleicos codificadores se pueden unir operativamente a una secuencia de control de expresión común o a diferentes secuencias de control de expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La introducción de moléculas de ácido nucleico en una célula huésped puede confirmarse utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos tales como Northern blots o reacción en cadena de la polimerasa
- 45 (RCP) de amplificación de ARNm, o inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros procedimientos analíticos adecuados para probar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o de su correspondiente producto génico. Los expertos en la materia entienden que las moléculas de ácido nucleico se expresan en una cantidad suficiente para producir un producto deseado (*por ejemplo* un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención), y se entiende, además, que los niveles de expresión pueden optimizarse para
- 50 obtener una expresión suficiente usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (*por ejemplo*, células citolíticas naturales (NK, por sus siglas en inglés), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras

citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para tal destrucción. Las células primarias para mediar las células ADCC, NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Se conoce la expresión de FcR en células hematopoyéticas (véase, *por ejemplo*, la tabla 3, página 464, Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC *in vitro*, (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 5.500.362o el documento 5.821.337). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés y células citolíticas naturales (NK por sus siglas en inglés). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal (véase, *por ejemplo*, Clynes y col. (*EE. UU.*) 95:652-656 (1998)). Los anticuerpos con poca o ninguna actividad ADCC pueden seleccionarse para su uso.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es unFcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (*por ejemplo*, un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas de splicing de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos (véase, *por ejemplo*, la revisión Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Se conocen los FcR (véase, *por ejemplo*, Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel y col., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)). Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, están incluidos en el término "FcR" en esta invención. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (véase, *por ejemplo*, Guyer y col., *J. Immunol.* 117:587 (1976)) y Kim y col., *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Se han descrito variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR (véase, *por ejemplo*, en el documento WO 2000/42072; las patentes de los EE. UU. n.º 7.183.387, 7.332.581 y 7.335.742; Shields y col. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afin. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC (véase, *por ejemplo*, Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)). Se han descrito variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida, (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 1999/51642, Idusogie y col. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)). Los anticuerpos con poca o ninguna actividad CDC pueden seleccionarse para su uso.

Un "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido beta klotho se refiere a una forma del polipéptido beta klotho que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico. Por ejemplo, un ECD de polipéptido beta klotho puede tener menos del 1 % de tales dominios transmembrana y/o citoplásmico y, preferentemente, puede tener menos del 0,5 % de tales dominios. El término "identidad" se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más moléculas de ácido nucleico, como se determina al alinear y comparar las secuencias. "Porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas y se calcula en función del tamaño de la más pequeña de las moléculas que se comparan. Para estos cálculos, los huecos en las alineaciones (si los hay) deben ser tratados por un procedimiento matemático o programa de ordenador (*por ejemplo*, un "algoritmo"). Los procedimientos que pueden usarse para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos alineados incluyen los descritos en *Computational Molecular Biology*, (Lesk, AM, ed.), (1988) Nueva York: Oxford University Press ; *Biocomputing Informatics and Genome Projects*, (Smith, DW, ed.), 1993, Nueva York: Academic Press ; *Computer Analysis of Sequence Data*, parte I, (Griffin, AM, y Griffin, HG, eds.), 1994, Nueva Jersey: Human Press ; von Heinje, G., (1987) *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Nueva York: Academic Press ; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, Nueva York: M. Stockton Press ; y Carillo y col., (1988) *SIAM J. Applied Math.* 48:1073 .

Al calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se comparan se pueden alinear de una manera que proporcione el mayor apareamiento entre las secuencias. Se puede utilizar un programa de ordenador para determinar el porcentaje de identidad es el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux y col., (1984) *Nucl. Acid Res.* 12:387; Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.). El algoritmo informático GAP se utiliza para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los cuales se determinará el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias pueden alinearse para un apareamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos o nucleótidos (el "intervalo apareado", como se determina por el algoritmo). Una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio, donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la

matriz de comparación que se está utilizando; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada apareamiento perfecto de aminoácidos mediante la matriz de comparación particular) y una penalización de extensión de hueco (que es por lo general 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan junto con el algoritmo. En determinadas realizaciones, el algoritmo también utiliza una matriz de comparación estándar (véase, Dayhoff y col., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros ejemplares para determinar el porcentaje de identidad para los polipéptidos o secuencias de nucleótidos utilizando el programa GAP son los siguientes: (i) algoritmo: Needleman y col., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453; (ii) matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y col., 1992, supra; (iii) penalización por hueco: 12 (pero sin penalización por huecos finales) (iv) penalización por longitud de hueco: 4; y (v) umbral de similitud: 0.

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el apareamiento de solo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. En consecuencia, el procedimiento de alineación seleccionado (*por ejemplo*, el programa GAP) se puede ajustar si se desea para dar como resultado una alineación que abarque varios aminoácidos, por ejemplo, al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

Una "modificación" de un residuo/posición de aminoácido se refiere a un cambio de una secuencia primaria de aminoácidos en comparación con una secuencia inicial de aminoácidos, donde el cambio resulta de una alteración de la secuencia que implica dichos residuos/posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones típicas incluyen la sustitución del residuo por otro aminoácido (*por ejemplo*, una sustitución conservadora o no conservadora), la inserción de uno o más (*por ejemplo*, generalmente menos de 5, 4 o 3) aminoácidos adyacente a dicho a dicho residuo/posición y/o la delección de dicho residuo/posición.

Un "epítipo" es el sitio en la superficie de una molécula de antígeno al que se une una única molécula de anticuerpo, tal como una región localizada en la superficie de un antígeno, tal como un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido de beta klotho o un epítipo beta klotho, que es capaz de unirse a una o más regiones de unión a antígeno de un anticuerpo, y que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, tal como un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano), que es capaz de provocar una respuesta inmune. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido al que se une un anticuerpo como se determina por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un ensayo inmunológico. No es necesario que los epítopos antigénicos sean necesariamente inmunogénicos. Los epítopos a menudo consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. El término "epítipo" incluye específicamente epítopos lineales y epítopos conformacionales. Una región de un polipéptido que contribuye a un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede unirse de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede o no ser una característica de la superficie tridimensional del antígeno. Un epítipo beta klotho puede ser una característica de la superficie tridimensional de un polipéptido beta klotho. Alternativamente, un epítipo beta klotho puede ser una característica lineal de un polipéptido beta klotho. Generalmente un antígeno tiene varios o muchos epítopos diferentes y puede reaccionar con muchos anticuerpos diferentes.

Un anticuerpo se une a "un epítipo" o "esencialmente el mismo epítipo" o "el mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia, cuando los dos anticuerpos reconocen epítopos idénticos, superpuestos o adyacentes en un espacio tridimensional. Los procedimientos más ampliamente utilizados y rápidos para determinar si dos anticuerpos se unen a epítopos idénticos, superpuestos o adyacentes en un espacio tridimensional son los ensayos de competencia, que

se pueden configurar en varios formatos diferentes, por ejemplo, usando antígeno marcado o anticuerpo marcado. En algunos ensayos, el antígeno se inmoviliza sobre una placa de 96 pocillos, o se expresa en una superficie celular, y la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de anticuerpos marcados se mide usando marcadores radiactivos, fluorescentes o enzimáticas.

5

El "mapeo de epítomos" es el procedimiento de identificación de los sitios de unión, o epítomos, de anticuerpos en sus antígenos diana. Los epítomos de anticuerpos pueden ser epítomos lineales o epítomos conformacionales. Los epítomos lineales están formados por una secuencia continua de aminoácidos en una proteína. Los epítomos conformacionales están formados por aminoácidos que son discontinuos en la secuencia de la proteína, pero que se unen tras el plegado de la proteína en su estructura tridimensional. Los epítomos inducidos se forman cuando la estructura tridimensional de la proteína se encuentra en una confirmación alterada, tal como después de la activación o la unión de otra proteína o ligando (*por ejemplo*, la unión de beta klotho a un receptor de FGF tal como FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c o FGFR4c.

10

La "unión de epítomos" es el procedimiento de agrupar anticuerpos basado en los epítomos que reconocen. Más particularmente, la unión de epítomos comprende procedimientos y sistemas para discriminar las propiedades de reconocimiento de epítomos de diferentes anticuerpos, utilizando ensayos de competencia combinados con procedimientos computacionales para agrupar anticuerpos basados en sus propiedades de reconocimiento de epítomos e identificar anticuerpos que tienen especificidades de unión distintas.

15

Una "enfermedad mediada por beta klotho" y un "trastorno mediado por beta klotho" y una "afección mediada por beta klotho" se usan indistintamente y se refieren a cualquier enfermedad, trastorno o afección que está completamente o parcialmente causado por o es el resultado de beta klotho o la interacción de un beta klotho con un receptor de FGF tal como FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, o FGFR4 y/o alternativamente cualquier enfermedad, trastorno o afección en el que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21.

20

El término "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en esta invención, se refiere a la cantidad de un agente (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en esta invención o cualquier otro agente descrito en esta invención) que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o duración de una enfermedad, trastorno o afección dado, y/o un síntoma relacionado con el mismo. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente, incluyendo un agente terapéutico, puede ser una cantidad necesaria para (i) reducir o mejorar el avance o la progresión de una enfermedad, trastorno, o afección dado, (ii) reducir o mejorar la reaparición, desarrollo o inicio de una enfermedad, trastorno o afecciones dados, y/o (iii) mejorar o potenciar el efecto profiláctico o terapéutico de otra terapia (*por ejemplo*, una terapia distinta de la administración de un anticuerpo proporcionado en esta invención). Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una sustancia/molécula/agente de la presente descripción (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-beta klotho) puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula/agente, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula/agente son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro agente (*por ejemplo*, un fármaco) eficaz para "tratar" una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto o mamífero.

25

30

35

40

Una "cantidad efectiva" es generalmente una cantidad suficiente para reducir la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas y/o la causa subyacente, prevenir la aparición de los síntomas y/o su causa subyacente, y/o mejorar o remediar el daño que resulta o está asociado con una enfermedad, trastorno, o afección, incluyendo, por ejemplo, diabetes, obesidad, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico o, en general, cualquier enfermedad, trastorno o afección en el que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva es una cantidad terapéuticamente efectiva o una cantidad profilácticamente efectiva. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para remediar una enfermedad, trastorno, o afección (*por ejemplo*, diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico o en general cualquier enfermedad, trastorno o afección en el que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21) o los síntomas, en particular de una enfermedad, trastorno, o afección, o los síntomas asociados con tal enfermedad, trastorno o afección, o de otro modo prevenir, impedir, retrasar o revertir la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, o cualquier otro síntoma indeseable asociado con tal enfermedad, trastorno o afección, de cualquier manera que sea. Una "cantidad profilácticamente efectiva" es una cantidad de una composición farmacéutica que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto profiláctico destinado, *por ejemplo*, prevenir o retrasar la aparición (o reaparición) de la diabetes, la obesidad o la dislipidemia, o reducir la probabilidad de la aparición (o reaparición) de una enfermedad, trastorno o afección o síntoma(s) asociado(s), incluyendo, por ejemplo, diabetes, obesidad, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico o, en general, cualquier enfermedad, trastorno, o afección en el que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21) o síntomas asociados. El efecto terapéutico o profiláctico completo no se produce necesariamente mediante la administración de una dosis, y puede producirse sólo después de la administración de una serie de dosis.

45

50

55

60

Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva puede administrarse en una o más administraciones.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de una enfermedad, trastorno o afección, una cantidad profilácticamente efectiva puede ser inferior a una cantidad terapéuticamente efectiva.

La administración "crónica" se refiere a la administración del(de los) agente(s) en un modo continuo (*por ejemplo*, durante un período de tiempo, tal como días, semanas, meses o años) en lugar de un modo agudo, a fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (*por ejemplo*, concurrente) y consecutiva en cualquier orden. El término "en combinación" en el contexto de la administración de otras terapias (*por ejemplo*, otros agentes) incluye el uso de más de una terapia (*por ejemplo*, un agente). El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que se administran las terapias a un sujeto. Se puede administrar una primera terapia (*por ejemplo*, un agente) antes (*por ejemplo*, 1 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas o 12 semanas), simultáneamente o después (*por ejemplo*, 1 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas o 12 semanas) de la administración de una segunda terapia (*por ejemplo*, un agente) a un sujeto que tuvo, tiene o es susceptible a una enfermedad mediada por beta klotho.

Cualquier terapia adicional (*por ejemplo*, un agente) se puede administrar en cualquier orden con las otras terapias adicionales (*por ejemplo*, agentes). En determinadas realizaciones, los anticuerpos se pueden administrar en combinación con una o más terapias, tales como agentes (*por ejemplo*, terapias, incluyendo los agentes, que no son los anticuerpos que se administran actualmente) para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar una enfermedad mediada por beta klotho. Los ejemplos de terapias no limitantes (*por ejemplo*, agentes) que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo incluyen, por ejemplo, agentes analgésicos, agentes anestésicos, antibióticos, o agentes inmunomoduladores o cualquier otro agente enumerado en la farmacopea de los EE. UU. y/o la referencia del escritorio del médico. Los ejemplos de agentes útiles en la terapia de combinación incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE, por sus siglas en inglés) tal como aspirina, ibuprofeno y otros derivados del ácido propiónico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclórico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno, suproprofeno, ácido tiaprofénico, y tiopiroprofeno), derivados del ácido acético (indometacina, acetmetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclórico, fentiazina, fuirofenaco, ibufenaco, isoxepac, oxpinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetina, zidometacina y zomepirac), derivados del ácido fenámico (ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflumico y ácido tolfenámico), derivados del ácido bifenilcarboxílico (diflunisal y flufenisal) oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (ácido acetilsalicílico, sulfasalazina) y las pirazonas (apazona, bezpiperilón, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona). Otras combinaciones incluyen inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Otros agentes para la combinación incluyen esteroides tales como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona o hidrocortisona. Tal combinación puede ser especialmente ventajosa, ya que uno o más efectos secundarios del esteroide pueden reducirse o incluso eliminarse disminuyendo gradualmente la dosis de esteroide requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los presentes anticuerpos. Los ejemplos adicionales de agentes para combinaciones incluyen fármacos antiinflamatorios supresores de citoquinas (CSAID, por sus siglas en inglés); anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF o PDGF. Las combinaciones de agentes pueden incluir antagonistas de TNF como anticuerpos TNF quiméricos, humanizados o humanos, REMICADE, fragmentos de anticuerpos anti-TNF (por ejemplo, CDP870) y receptores solubles p55 o p75 TNF, derivados de los mismos, p75TNFR1gG (ENBREL[®]) o p55TNFR1gG (LENERCEPT[®]), receptor soluble de IL-13 (SIL-13) y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE); de manera similar, los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina-1) pueden ser efectivos. Otras combinaciones incluyen interleuquina 11, anti-P7 y ligando de glucoproteína p-selectina (PSGL). Otros ejemplos de agentes útiles en la terapia de combinación incluyen interferón- β 1a (AVONEX); interferón- β 1b (BETASERON[®]); copaxona; oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; y anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento (*por ejemplo*, anticuerpos que se unen al ligando CD40 y CD80).

Los "vehículos" como se usa en esta invención incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular ((*por ejemplo*, menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas, tales como albúmina en suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tal como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™. El término "vehículo" también puede referirse a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo o incompleto)), excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica. Tales vehículos, incluidos los vehículos farmacéuticos, pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal, o sintético, tales como el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo, y similares. El agua es un vehículo ejemplar cuando una composición (*por ejemplo*, una composición farmacéutica) se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para las soluciones inyectables. Los excipientes adecuados (*por ejemplo*, excipientes farmacéuticos) incluyen, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerilo, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes reguladores del pH. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Las composiciones orales, incluyendo las formulaciones, pueden incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA. Las composiciones, incluyendo los compuestos farmacéuticos, pueden contener una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-beta klotho, por ejemplo, en forma aislada o purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo a fin de proporcionar la forma para la administración apropiada al sujeto (*por ejemplo*, un paciente). La formulación debe adecuarse al modo de administración.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta invención, significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea europea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-beta klotho) sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se administraría la formulación. Tal formulación puede ser estéril.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

"Los anticuerpos policlonales", como se usa en esta invención, se refiere a una población de anticuerpos generados en una respuesta inmunogénica a una proteína que tiene muchos epítopos y, por lo tanto, incluye una diversidad de diferentes anticuerpos dirigidos a la misma y a diferentes epítopos dentro de la proteína. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, capítulo 11 en: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª ed., Ausubel y col., Eds., John Wiley y Sons, Nueva York).

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan de forma natural a una secuencia nativa. Una molécula "aislada" de ácido nucleico es aquella que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula "aislada" de ácido nucleico, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización específica, una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo como se describe en esta invención se aíslan o purifican. El término abarca secuencias de ácidos nucleicos que se han eliminado de su entorno natural, e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura puede incluir formas aisladas de la molécula.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en esta invención, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender 5 nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. "Oligonucleótido", como se usa en esta invención, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que tienen, por lo general, pero no necesariamente, una longitud inferior a aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos. Una célula que produce un anticuerpo anti- 10 beta klotho de la presente descripción puede incluir una célula de hibridoma parental, así como las células huésped bacterianas y eucariotas en las que se ha introducido el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Las células huésped adecuadas se describen a continuación.

A menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de cualquier secuencia polinucleotídica monocatenaria 15 descrita en esta invención es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarios se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias aguas arriba"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están 3' al extremo 3' del transcrito 20 de ARN se denominan "secuencias aguas abajo"

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, 25 contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la inhibición total o parcial del desarrollo, reparación, inicio o propagación de una enfermedad mediada por beta klotho y/o síntoma relacionado con la misma, como resultado de la administración de una terapia o combinación de terapias proporcionadas en esta invención (*por 30 ejemplo*, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo proporcionado en esta invención).

El término "agente profiláctico" se refiere a cualquier agente que puede inhibir total o parcialmente el desarrollo, reparación, inicio o propagación de una enfermedad mediada por beta klotho y/o síntoma relacionado con la misma en un sujeto. En determinadas realizaciones, el término "agente profiláctico" se refiere a un anticuerpo anti-beta klotho 35 como se describe en esta invención. En determinadas otras realizaciones, el término "agente profiláctico" se refiere a un agente distinto de un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención. En determinadas realizaciones, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil para o ha sido o está siendo utilizado actualmente para prevenir una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho y/o un síntoma relacionado con el mismo o impedir el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad, trastorno o afección mediado 40 por beta klotho, y/o un síntoma relacionado con el mismo. En realizaciones específicas, el agente profiláctico es un anticuerpo anti-beta klotho humanizado, tal como un anticuerpo monoclonal anti-beta klotho humanizado.

En determinadas realizaciones, un "título de suero profilácticamente efectivo" es el título del suero en un sujeto, preferentemente un ser humano, que inhibe total o parcialmente el desarrollo, reparación, inicio o propagación de una 45 enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho, y/o síntoma relacionado con el mismo en el sujeto.

En determinadas realizaciones, un "título de suero terapéuticamente efectivo" es el título del suero en un sujeto, preferentemente un ser humano, que reduce la gravedad, la duración y/o los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho, en el sujeto. 50

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se prepara, expresa, crea o aísla por medios recombinantes. Los anticuerpos recombinantes pueden ser anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos recombinantes, combinatoria, anticuerpos aislados de un animal (*por ejemplo*, un ratón o una vaca) que es 55 transgénico y/o transcromosómico para los genes de la inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, Taylor, LD y col. (1992) Nucl. Res ácidos. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el splicing de secuencias génicas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes, incluyendo las derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase Kabat, EA y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological 60 Interest, quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos, publication NIH n.º 91-3242). Sin embargo, como se describe en esta invención, tales anticuerpos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando

se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, en mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

5

El término "título de suero" se refiere a un título del suero promedio en un sujeto a partir de múltiples muestras (*por ejemplo*, en un momento presente o múltiples puntos de tiempo) o en una población de menos 10, tal como al menos 20, o al menos 40 sujetos, de hasta aproximadamente 100, 1000 o más.

- 10 El término "efectos secundarios" abarca los efectos no deseados y/o adversos de una terapia (*por ejemplo*, un agente profiláctico o terapéutico). Los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso de una terapia (*por ejemplo*, un agente profiláctico o terapéutico) puede ser dañino o incómodo o arriesgado. Los ejemplos de efectos secundarios incluyen, diarrea, tos, gastroenteritis, sibilancias, náuseas, vómitos, anorexia, calambres abdominales, fiebre, dolor, pérdida de peso corporal, deshidratación, alopecia, dispnea, insomnio, mareo, mucositis, efectos nerviosos y musculares, fatiga, sequedad de boca y pérdida de apetito, erupciones cutáneas o hinchazón en el sitio de administración, síntomas parecidos a la gripe tales como fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo y reacciones alérgicas. Los efectos no deseados adicionales experimentados por los pacientes son numerosos y conocidos en la técnica. Muchos se describen en la referencia del escritorio del médico (68ª ed., 2014).

- 20 Los términos "sujeto" y "paciente" pueden usarse indistintamente. Como se usa en esta invención, en determinadas realizaciones, un sujeto es un mamífero, tal como un no primate (*por ejemplo*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (*por ejemplo*, un mono y un ser humano). En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano. En una realización, el sujeto es un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) que tiene una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho. En otra realización, el sujeto es un mamífero (*por ejemplo*, un ser humano) en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho.

- 30 "Sustancialmente todo" se refiere a se refiere a al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 %.

- El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que se puede utilizar para tratar, impedir o aliviar una enfermedad, trastorno o afección, incluyendo en el tratamiento, prevención o alivio de uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho y/o un síntoma relacionado con el mismo. Un agente terapéutico se refiere a un anticuerpo anti-beta klotho de la invención. Un agente terapéutico también puede referirse a un agente que no sea un anticuerpo proporcionado en esta invención. Un agente terapéutico puede ser un agente que se sabe que es útil para, o ha sido o está siendo utilizado actualmente para el tratamiento, prevención o alivio de uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho, o un síntoma relacionado con el mismo.

40

- La combinación de terapias (*por ejemplo*, el uso de agentes, incluyendo los agentes terapéuticos) puede ser más efectiva que los efectos aditivos de cualquier terapia de dos o más terapias individuales (*por ejemplo*, sinérgico). Un efecto sinérgico es inesperado y no se puede predecir. Por ejemplo, un efecto sinérgico de una combinación de agentes terapéuticos permite el uso de dosis más bajas de uno o más de los agentes y/o la administración menos frecuente de los agentes a un sujeto con una enfermedad mediada por beta klotho. La capacidad de utilizar dosis más bajas de tratamientos terapéuticos y/o administrar las terapias con menos frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de las terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de las terapias en la prevención, tratamiento o alivio de uno o más síntomas. de una enfermedad mediada por beta klotho. Además, un efecto sinérgico puede resultar en una mejor eficacia de las terapias en la prevención, tratamiento o alivio de uno o más síntomas de una enfermedad mediada por beta klotho. Finalmente, el efecto sinérgico de una combinación de terapias (*por ejemplo*, agentes terapéuticos) puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual.

- El término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, procedimiento y/o agente que se pueda utilizar en la prevención, gestión, tratamiento y/o mejora de una enfermedad, trastorno o afecciones mediado por beta klotho. En determinadas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en la prevención, gestión, tratamiento y/o mejora de una enfermedad, trastorno o afección mediado por beta klotho, conocidas por un experto en la materia tales como el personal médico.

- 60 El término "sonda detectable" se refiere a una composición que proporciona una señal detectable. El término incluye, sin limitación, cualquier fluoróforo, cromóforo, radiomarcador, enzima, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y

similares, que proporcionan una señal detectable a través de su actividad.

El término "agente de diagnóstico" se refiere a una sustancia administrada a un sujeto que ayuda en el diagnóstico de una enfermedad, trastorno, o afecciones. Tales sustancias pueden utilizarse para poner de manifiesto, identificar y/o definir la localización de un procedimiento que causa enfermedad. Un agente de diagnóstico es una sustancia que se conjuga con un anticuerpo anti-beta klotho de la invención, que cuando se administra a un sujeto o se pone en contacto con una muestra de un sujeto ayuda en el diagnóstico de una enfermedad mediada por beta klotho.

El término "agente detectable" se refiere a una sustancia que se puede utilizar para determinar la existencia o presencia de una molécula deseada, tal como un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención, en una muestra o sujeto. Un agente detectable puede ser una sustancia que es capaz de visualizarse o una sustancia que de otro modo puede determinarse y/o medirse (*por ejemplo*, por cuantificación).

El término "codificar" o equivalentes gramaticales del mismo, como se utiliza en referencia a la molécula de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico en su estado nativo o cuando se manipula por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia que puede ser transcrita para producir ARNm, que a continuación se traduce en un polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de tal molécula de ácido nucleico, y la secuencia codificante puede deducirse de ella.

El término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se utiliza comúnmente como un diluyente, vehículo, conservante, aglutinante, o agente estabilizador, e incluye, pero no se limita a, proteínas (*por ejemplo*, albúmina de suero, etc.), aminoácidos (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos grasos y fosfolípidos (*por ejemplo*, sulfonatos de alquilo, caprilato, etc.), tensioactivos (*por ejemplo*, SDS, polisorbato, tensioactivo no iónico, etc.), sacáridos (*por ejemplo*, sacarosa, maltosa, trehalosa, etc.) y polioles (*por ejemplo*, manitol, sorbitol, etc.). Véase, también, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

En el contexto de un péptido o polipéptido, el término "fragmento" como se usa en esta invención, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Tal fragmento puede surgir, por ejemplo, de un truncamiento en el extremo amino, un truncamiento en el extremo carboxi y/o una delección interna de un(os) residuo(s) de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden resultar, por ejemplo, de un splicing de ARN alternativo o de la actividad de la proteasa *in vivo*. Como se describe en esta invención, los fragmentos beta klotho incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 250, al menos 300, en menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 550, al menos 600, al menos 650, al menos 700, al menos 750, al menos 800, al menos 850, al menos 900, o al menos 950, residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido beta klotho o un anticuerpo que se une a un polipéptido beta klotho. Como se describe en esta invención, un fragmento de un polipéptido beta klotho o un anticuerpo que se une a un antígeno beta klotho conserva al menos 1, al menos 2, o al menos 3 o más funciones del polipéptido o anticuerpo.

Los términos "gestionar", "que gestiona" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia (*por ejemplo*, un agente profiláctico o terapéutico), que no da como resultado una cura de la enfermedad. A un sujeto se le administra una o más terapias (*por ejemplo*, agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo proporcionado en esta invención) para "gestionar" una enfermedad mediada por beta klotho, uno o más síntomas de la misma, a fin de impedir la progresión o empeoramiento de la enfermedad.

Los términos "sobre" o "aproximadamente" significa dentro del 20 %, dentro del 15 %, dentro del 10 %, dentro del 9 %, dentro del 8 %, dentro del 7 %, dentro del 6 %, dentro del 5 %, dentro del 4 %, dentro del 3 %, dentro del 2 %, dentro del o el 1 % o menos de un valor o intervalo dado.

"Administrar" o "administración" se refiere al acto de inyectar o de otro modo suministrar físicamente una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención) en un paciente, tal como por vía mucosal, intradérmica, intravenosa, intramuscular y/o cualquier otro procedimiento de suministro físico descrito en esta invención o conocido en la técnica. Cuando se está tratando una enfermedad, trastorno, o afección, o un síntoma del mismo, la administración de la sustancia típicamente se produce después del

inicio de la enfermedad, trastorno, o afección, o síntomas del mismo. Cuando se previene una enfermedad, trastorno, o afección o síntomas del mismo, la administración de la sustancia típicamente se produce antes del inicio de la enfermedad, trastorno, o afección, o síntomas del mismo.

- 5 En el contexto de un polipéptido, el término "análogo" como se usa en esta invención, se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo anti-beta klotho pero no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica de un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo anti-beta klotho, o posee una estructura similar o idéntica de un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo anti-beta klotho. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un polipéptido que satisface al menos uno de los siguientes: (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido beta-klotho (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:297, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo anti-beta klotho descrito en esta invención; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho o un anticuerpo anti-beta klotho (o región VH o VL del mismo) descrito en esta invención de al menos 5 residuos de aminoácidos, al menos 10 residuos de aminoácidos, al menos 15 residuos de aminoácidos, al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 25 residuos de aminoácidos, al menos 40 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 60 residuos de aminoácidos, al menos 70 residuos de aminoácidos, al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 90 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 125 residuos de aminoácidos o al menos 150 residuos de aminoácidos (*véase, por ejemplo*, Sambrook y col. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Maniatis y col. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY); y (c) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo anti-beta klotho (o región VH o VL del mismo) descrito en esta invención. Un polipéptido con estructura similar a un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo anti-beta klotho descrito en esta invención se refiere a un polipéptido que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar de un polipéptido beta klotho, un fragmento de un beta klotho, o un anticuerpo beta klotho descrito en esta invención. La estructura de un polipéptido puede determinarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo pero no se limita a, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica cristalográfica.

El término "composición" pretende abarcar un producto que contiene los ingredientes especificados (*por ejemplo*, un anticuerpo proporcionado en esta invención) en, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en, opcionalmente, las cantidades especificadas.

En el contexto de un polipéptido, el término "derivado", como se usa en esta invención, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo que se une a un polipéptido beta klotho que ha sido alterado por la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término "derivado", como se usa en esta invención también se refiere a un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo que se une a un polipéptido beta klotho que se ha modificado químicamente, *por ejemplo*, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo beta klotho puede modificarse químicamente, *por ejemplo*, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Los derivados se modifican de una manera que es diferente del péptido o polipéptidos de partida o naturales, ya sea en el tipo o la ubicación de las moléculas unidas. Los derivados incluyen además la deleción de uno o más grupos químicos que se encuentran naturalmente presentes en el péptido o polipéptido. Un derivado de un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo beta klotho pueden modificarse químicamente mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo beta klotho pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos. Un derivado de polipéptido posee una función similar o idéntica que un polipéptido beta klotho, un fragmento de un polipéptido beta klotho, o un anticuerpo beta klotho descrito en esta invención.

COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DE LOS MISMOS

Se describen proteínas de unión, tales como los anticuerpos que se unen a beta klotho, (por ejemplo, beta klotho humano y/o cyno). Los anticuerpos de la presente descripción son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la expresión de beta klotho. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, tal como diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico o, en general, cualquier enfermedad, trastorno o afección en la que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21.

10

En esta invención se describen los anticuerpos que se unen a un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un péptido beta klotho o un epítipo beta klotho. Los anticuerpos anti-beta klotho se unen al dominio extracelular (ECD) de beta klotho. También se describen anticuerpos que bloquean de forma competitiva un anticuerpo anti-beta klotho proporcionado en esta invención para que no se una a un polipéptido beta klotho. Los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención también pueden conjugarse o fusionarse de forma recombinante a un agente de diagnóstico, agente detectable o agente terapéutico. Además se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo beta klotho de la invención.

También se proporcionan en esta invención moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una cadena pesada, cadena ligera, región VH, región VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL de inmunoglobulina de anticuerpos anti-beta klotho que se unen a un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un péptido beta klotho o un epítipo beta klotho como se define en las reivindicaciones. Además se proporcionan vectores y células huésped que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-beta klotho que se unen a un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un péptido beta klotho o un epítipo beta klotho como se define en las reivindicaciones. También se describen procedimientos de fabricación de anticuerpos que se unen a un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un péptido beta klotho o un epítipo beta klotho.

Se proporcionan procedimientos de uso de los anticuerpos anti-beta klotho de la invención. Los procedimientos incluyen tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o afección, incluyendo tratar, prevenir o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. Los ejemplos no limitantes de enfermedades, trastornos o afecciones incluyen trastornos de utilización de la glucosa y las secuelas asociadas con la misma, incluyendo diabetes mellitus (tipo I y tipo 2), diabetes gestacional, hiperglucemia, resistencia a la insulina, metabolismo anormal de la glucosa, "pre-diabetes" (alteración de la glucosa en ayunas (IFG, por sus siglas en inglés) o intolerancia a la glucosa (IGT, por sus siglas en inglés)), u otros trastornos fisiológicos asociados con o que resultan de, el estado hiperglucémico, incluyendo, por ejemplo, cambios histopatológicos tales como la destrucción de células β pancreáticas. Por ejemplo, los sujetos con enfermedades, trastornos, o afección, que necesitan tratamiento pueden tener un nivel de glucosa en plasma en ayunas (FPG, por sus siglas en inglés) superior a aproximadamente 100 mg/dl. Otros trastornos relacionados con la hiperglucemia, incluyen daño renal (*por ejemplo*, daño de los túbulos o nefropatía), degeneración del hígado, daño a los ojos (*por ejemplo*, retinopatía diabética o cataratas) y trastornos del pie diabético. Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen dislipidemias y sus secuelas tales como, por ejemplo, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, trastornos cerebrovasculares y similares u otras enfermedades, trastornos o afecciones que pueden estar asociados con el síndrome metabólico, tales como la obesidad y la masa corporal elevada (incluyendo las afecciones comórbidas de la misma tales como, pero no se limitan a, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y el síndrome de ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés)), o trombosis, estados de hipercoagulabilidad y protrombóticos (arteriales y venosos), hipertensión, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca. Estas enfermedades, trastornos o afecciones incluyen aterosclerosis, enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (*por ejemplo*, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), asma, lupus eritematoso, artritis u otros trastornos reumáticos inflamatorios. Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen tumores de células adiposas, carcinomas lipomatosos incluyendo, por ejemplo, liposarcomas, tumores sólidos y neoplasias. Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen enfermedades neurodegenerativas y/o trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico y/o enfermedades neurológicas que implican procedimientos neuroinflamatorios y/u otras neuropatías periféricas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la leucoencefalopatía multifocal progresiva y el síndrome de Guillian-Barre. Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen trastornos de la piel y dermatológicas y/o trastornos de procedimientos de curación de heridas, incluyendo dermatosis eritematoescamosas. Otras enfermedades, trastornos o afecciones incluyen el síndrome X, la osteoartritis, y el síndrome de dificultad respiratoria aguda. Como se usa en esta invención, el término "hiperglucémico" o "hiperglucemia", cuando se usa en referencia a una enfermedad, trastorno o afección de un sujeto, se refiere a un nivel transitorio o crónico anormalmente alto de glucosa presente en la sangre de un sujeto. La enfermedad, trastorno o afección puede ser causado por un retraso en el metabolismo o la absorción de la glucosa, de modo que el sujeto

muestra intolerancia a la glucosa o un estado de glucosa elevada que no se encuentra típicamente en sujetos normales (*por ejemplo*, en sujetos pre-diabéticos intolerantes a la glucosa con riesgo de desarrollar diabetes, o en sujetos diabéticos). Por ejemplo, los niveles de glucosa en plasma en ayunas (FPG) para la normogluceemia pueden ser inferiores a aproximadamente 100 mg/dl, para el metabolismo de glucosa alterado, entre aproximadamente 100 y 126 mg/dl, y para diabéticos mayores de aproximadamente 126 mg/dl. Los procedimientos de prevención (*por ejemplo*, en sujetos con predisposición a tener uno más trastornos particulares, se refieren a retrasar, ralentizar o inhibir la progresión de, el inicio de, o tratar (*por ejemplo*, mejorar) la obesidad o una masa corporal indeseable (*por ejemplo*, un índice de masa corporal o "IMC" mayor que el normal, en relación con un sujeto compatible apropiado de edad comparable, género, raza, etc.). Los procedimientos para tratar la obesidad o una masa corporal indeseable (incluyendo las condiciones comórbidas de la obesidad, por ejemplo, la apnea del sueño obstructiva, artritis, cáncer (*por ejemplo*, mama, endometrio y colon), cálculos biliares o hipergluceemia, incluyen poner en contacto o administrar una proteína de unión tal como un anticuerpo anti-beta klotho como se describe en esta invención en una cantidad efectiva para tratar la obesidad o una masa corporal indeseable. Por ejemplo, un sujeto puede tener un índice de masa corporal mayor que 25, por ejemplo, 25-30, 30-35, 35-40, o mayor que 40. Los procedimientos de prevención (*por ejemplo*, en sujetos con predisposición a tener uno o más trastornos particulares), se refieren a retrasar, ralentizar o inhibir la progresión de, el inicio de, o tratar niveles indeseables de LDL, VLDL, triglicéridos o colesterol en suero/plasma anormalmente elevados, los cuales, solos o en combinación, pueden dar lugar a, por ejemplo, la formación de placas, estrechamiento o bloqueo de los vasos sanguíneos, y a un mayor riesgo de hipertensión, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial coronaria. Tales enfermedades, trastornos o afecciones pueden deberse, por ejemplo, a la predisposición genética o la dieta.

Anticuerpos anti-beta klotho

La presente descripción proporciona anticuerpos anti-beta klotho que pueden encontrar uso en esta invención como agentes terapéuticos. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecíficos y heteroconjugados, así como variantes de los mismos que tienen afinidad mejorada u otras propiedades.

En esta invención se proporcionan anticuerpos como se define en las reivindicaciones que se unen a beta klotho, que incluyen un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un péptido beta klotho o un epítipo beta klotho. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-beta klotho son anticuerpos humanizados (*por ejemplo*, que comprenden regiones constantes humanas) que se unen a beta klotho, incluyendo un polipéptido beta klotho, un fragmento de polipéptido beta klotho, un péptido beta klotho o un epítipo beta klotho.

El anticuerpo anti-beta klotho comprende una región VH, región VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL como se define en las reivindicaciones. En consecuencia, el anticuerpo aislado o fragmento funcional del mismo proporcionado en esta invención comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera del anticuerpo designado 5H23 como se muestra en las tablas 1.

El anticuerpo designado 5H23 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:25 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:26.

El anticuerpo designado 1C17 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:51 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:52.

El anticuerpo designado 1D19 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:77 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:78.

El anticuerpo designado 2L12 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:103 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:104.

El anticuerpo designado 3L3 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:129 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:130.

El anticuerpo designado 3N20 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:155 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:156.

El anticuerpo designado 4P5 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:181 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:182.

El anticuerpo designado 5C23 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:207 y una secuencia de VL que

es la SEQ ID NO:208.

El anticuerpo designado 5F7 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:233 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:234.

5

El anticuerpo designado IG19 comprende una secuencia de VH que es la SEQ ID NO:259 y una secuencia de VL que es la SEQ ID NO:260.

Tabla 1: Secuencias de CDR del anticuerpo 5H23

Sec. de CDR VH	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
CDR1 VH	GYTFTSYDIN (SEQ ID NO:1)	GYTFTSYD (SEQ ID NO:7)	SYDIN (SEQ ID NO:12)	GYTFTSY (SEQ ID NO:13)	TSYDIN (SEQ ID NO:18)	GYTFTSYDIN (SEQ ID NO:1)
CDR2 VH	WIYPGDGSKYNEKFKG (SEQ ID NO:2)	IYPGDGST (SEQ ID NO:8)	WIYPGDGSKYNEKFKG (SEQ ID NO:2)	PGDG (SEQ ID NO:14)	WIGWIYPGDGSK (SEQ ID NO:19)	WIYPGDGSK (SEQ ID NO:24)
CDR3 VH	SDYYGSRSFAY (SEQ ID NO:3)	ARSDYYGSRSFAY (SEQ ID NO:9)	SDYYGSRSFAY (SEQ ID NO:3)	DYYGSRFA (SEQ ID NO:15)	ARSDYYGSRSFA (SEQ ID NO:20)	SDYYGSRSFAY (SEQ ID NO:3)
Sec. de CDR VL	RASKSVSTSGYVYMH (SEQ ID NO:4)	KSVSTSGYVY (SEQ ID NO:10)	RASKSVSTSGYVYMH (SEQ ID NO:4)	SKSVSTSGYVY (SEQ ID NO:16)	STSGYVYMHWN (SEQ ID NO:21)	RASKSVSTSGYVYMH (SEQ ID NO:4)
CDR2 VL	LASYLES (SEQ ID NO:5)	LAS (SEQ ID NO:11)	LASYLES (SEQ ID NO:5)	LAS (SEQ ID NO:11)	LLIYLASYLE (SEQ ID NO:22)	LASYLES (SEQ ID NO:5)
CDR3 VL	QHSRDLTFP (SEQ ID NO:6)	QHSRDLTFP (SEQ ID NO:6)	QHSRDLTFP (SEQ ID NO:6)	SRDLTF (SEQ ID NO:17)	QHSRDLTF (SEQ ID NO:23)	QHSRDLTFP (SEQ ID NO:6)
Secuencia de VH:						
QVQLQQSGPELVKPGALVKISKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIPGDGSKYNEKFKGKATLTADKSSRTAYMQLSSTSENSAVYFCARSDYYGSRRS						
FAYWGGGLVTVSA (SEQ ID NO: 25)						
Secuencia de VL:						
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYVYMHWNQQKPGQPPLIYLASYLESGVPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAAIYQCQHSRDLTFPFGGGTKL						
EIK (SEQ ID NO:26)						

Tabla 2: Secuencias de CDR del anticuerpo 1C17

Sec. de CDR	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
CDR1 VH	GYSITSGYYWN (SEQ ID NO:27)	GYSITSGYY (SEQ ID NO:33)	SGYYWN (SEQ ID NO:38)	GYSITSGY (SEQ ID NO:39)	TSGYYWN (SEQ ID NO:44)	GYSITSGYYWN (SEQ ID NO:27)
CDR2 VH	YINYDGNSTYPSLKN (SEQ ID NO:28)	INYDGN (SEQ ID NO:34)	YINYDGNSTYPSLKN (SEQ ID NO:28)	YDG (SEQ ID NO:40)	WMGYINYDGN (SEQ ID NO:45)	YINYDGN (SEQ ID NO:50)
CDR3 VH	KGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:29)	ARKGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:35)	KGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:29)	GAYYSNYDSFD (SEQ ID NO:41)	ARKGAYYSNYDSFD (SEQ ID NO:46)	KGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:29)
CDR1 VL	KASODINSYLS (SEQ ID NO:30)	QDINSY (SEQ ID NO:36)	KASODINSYLS (SEQ ID NO:30)	SODINSY (SEQ ID NO:42)	NSYLSWV (SEQ ID NO:47)	KASODINSYLS (SEQ ID NO:30)
CDR2 VL	RANRLVD (SEQ ID NO:31)	RAN (SEQ ID NO:37)	RANRLVD (SEQ ID NO:31)	RAN (SEQ ID NO:37)	TLIYRANRLV (SEQ ID NO:48)	RANRLVD (SEQ ID NO:31)
CDR3 VL	LQYDEFPFT (SEQ ID NO:32)	LQYDEFPFT (SEQ ID NO:32)	LQYDEFPFT (SEQ ID NO:32)	YDEFPF (SEQ ID NO:43)	LQYDEFPF (SEQ ID NO:49)	LQYDEFPFT (SEQ ID NO:32)
Secuencia de VH:						
QVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYINYDGNSTYPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTPEDTATYYCARKGAYYSNYD						
SFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:51)						
Secuencia de VL:						
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWVQQKPKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFRSGSGGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK						
(SEQ ID NO:52)						

Tabla 3: Secuencias de CDR del anticuerpo 1D19

Sec. de CDR VH	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
CDR1 VH	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:53)	GYTFTRYD (SEQ ID NO:59)	RYDIN (SEQ ID NO:64)	GYTFTRY (SEQ ID NO:65)	TRYDIN (SEQ ID NO:70)	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:53)
CDR2 VH	WIYPGDSSTKFNENFKD (SEQ ID NO:54)	IYPGDSST (SEQ ID NO:60)	WIYPGDSSTKFNENFKD (SEQ ID NO:54)	PGDS (SEQ ID NO:66)	WIGWIYPGDSSTK (SEQ ID NO:71)	WIYPGDSSTK (SEQ ID NO:78)
CDR3 VH	SDYYGSRSTY (SEQ ID NO:55)	ARSDYYGSRSTY (SEQ ID NO:61)	SDYYGSRSTY (SEQ ID NO:55)	DYYGSRST (SEQ ID NO:67)	ARSDYYGSRST (SEQ ID NO:72)	SDYYGSRSTY (SEQ ID NO:55)
CDR1 VL	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:56)	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:62)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:56)	SKSVSTSGYSY (SEQ ID NO:68)	STSGYSYMHY (SEQ ID NO:73)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:56)
CDR2 VL	LASNLES (SEQ ID NO:57)	LAS (SEQ ID NO:63)	LASNLES (SEQ ID NO:57)	LAS (SEQ ID NO:63)	LLIYASNLE (SEQ ID NO:74)	LASNLES (SEQ ID NO:57)
CDR3 VL	QHSRELPTY (SEQ ID NO:58)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:58)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:58)	SRELPTY (SEQ ID NO:69)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:75)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:58)
Secuencia de VH:						
QVQPQESGPELVKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWMKQRPGQGLEWIGWIYPGDSSTKFNENFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSTVYFCARSDYYGSRRS						
FTYWGGGLTVTSA (SEQ ID NO:77)						
Secuencia de VL:						
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPARFSGSGSDFTLNIIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYTFGGGTKL						
EIK (SEQ ID NO:78)						

Tabla 4: Secuencias de CDR del anticuerpo 2L12

Sec. de CDR	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	Abm
CDR1 VH	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:79)	GYTFTRYD (SEQ ID NO:85)	RYDIN (SEQ ID NO:90)	GYTFTRY (SEQ ID NO:91)	TRYDIN (SEQ ID NO:96)	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:79)
CDR2 VH	WIYPGDDSTKYNEKFKG (SEQ ID NO:80)	IYPGDDST (SEQ ID NO:86)	WIYPGDDSTKYNEKFKG (SEQ ID NO:80)	PGDD (SEQ ID NO:92)	WIGWIYPGDDSTK (SEQ ID NO:97)	WIYPGDDSTK (SEQ ID NO:102)
CDR3 VH	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:81)	ARSDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:87)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:81)	DYYGSRSFV (SEQ ID NO:93)	ARSDYYGSRSFV (SEQ ID NO:98)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:81)
CDR1 VL	RASKSVSTSGYSYLH (SEQ ID NO:82)	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:88)	RASKSVSTSGYSYLH (SEQ ID NO:82)	SKSVSTSGYSY (SEQ ID NO:94)	STSGYSYLHWY (SEQ ID NO:99)	RASKSVSTSGYSYLH (SEQ ID NO:82)
CDR2 VL	LASNLES (SEQ ID NO:83)	LAS (SEQ ID NO:89)	LASNLES (SEQ ID NO:83)	LAS (SEQ ID NO:89)	LLIYLASNLE (SEQ ID NO:100)	LASNLES (SEQ ID NO:83)
CDR3 VL	QHSGELPYT (SEQ ID NO:84)	QHSGELPYT (SEQ ID NO:84)	QHSGELPYT (SEQ ID NO:84)	SGELPY (SEQ ID NO:95)	QHSGELPY (SEQ ID NO:101)	QHSGELPYT (SEQ ID NO:84)
Secuencia de VH:						
QVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWYKKRPGQGLEWIGWIYPGDDSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRSF						
VYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:103)						
Secuencia de VL:						
DIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYLHWYQQKPGQPPELLIYASNLESGVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSGELPYTFGGGTKL						
EIK (SEQ ID NO:104)						

Tabla 5: Secuencias de CDR del anticuerpo 3L3

	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Sec. de CDR1 VH	GYTFTSYDIN (SEQ ID NO:105)	GYTFTSYD (SEQ ID NO:111)	SYDIN (SEQ ID NO:116)	GYTFTSY (SEQ ID NO:117)	TSYDIN (SEQ ID NO:122)	GYTFTSYDIN (SEQ ID NO:105)
CDR2 VH	WIYPGDGSPKYDEKFKG (SEQ ID NO:106)	IYPGDGSP (SEQ ID NO:112)	WIYPGDGSPKYDEKFKG (SEQ ID NO:106)	PGDG (SEQ ID NO:118)	WIGWIYPGDGSPK (SEQ ID NO:123)	WIYPGDGSPK (SEQ ID NO:128)
CDR3 VH	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:107)	ARSDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:113)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:107)	DYYGSRSFV (SEQ ID NO:119)	ARSDYYGSRSFV (SEQ ID NO:124)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:107)
Sec. de CDR1 VL	RASKSVSTSGYSYVH (SEQ ID NO:108)	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:114)	RASKSVSTSGYSYVH (SEQ ID NO:108)	SKSVSTSGYSY (SEQ ID NO:120)	STSGYSYVHWY (SEQ ID NO:125)	RASKSVSTSGYSYVH (SEQ ID NO:108)
CDR2 VL	LASNLES (SEQ ID NO:109)	LAS (SEQ ID NO:115)	LASNLES (SEQ ID NO:109)	LAS (SEQ ID NO:115)	LLIYLASNLE (SEQ ID NO:126)	LASNLES (SEQ ID NO:109)
CDR3 VL	QHSGELPYT (SEQ ID NO:110)	QHSGELPYT (SEQ ID NO:110)	QHSGELPYT (SEQ ID NO:110)	SGELPY (SEQ ID NO:121)	QHSGELPY (SEQ ID NO:127)	QHSGELPYT (SEQ ID NO:110)
Secuencia de VH:						
QYQPQESGPELVKPGTLVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWYPGDGSPPKYDEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAYYFCARSDYYGSRRS						
FYWGGQGLVTYSA (SEQ ID NO:129)						
Secuencia de VL:						
DVLITQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYVHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGLVPAFSGRGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSGLPELPTFGGGTKL						
EIK (SEQ ID NO:130)						

Tabla 6: Secuencias de CDR del anticuerpo 3N20

Sec. de VH	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
CDR1 VH	GYIFTNYGIS (SEQ ID NO:131)	GYIFTNYG (SEQ ID NO:137)	NYGIS (SEQ ID NO:142)	GYIFTNY (SEQ ID NO:143)	TNYGIS (SEQ ID NO:148)	GYIFTNYGIS (SEQ ID NO:131)
CDR2 VH	EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO:132)	IYPRSGNT (SEQ ID NO:138)	EIYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO:132)	PRSG (SEQ ID NO:144)	WIGEYPRSGNTY (SEQ ID NO:149)	EIYPRSGNTY (SEQ ID NO:154)
CDR3 VH	HWDGVLDFDY (SEQ ID NO:133)	ARHWDGVLDFDY (SEQ ID NO:139)	HWDGVLDFDY (SEQ ID NO:133)	WDGVLDFD (SEQ ID NO:145)	ARHWDGVLDFD (SEQ ID NO:150)	HWDGVLDFDY (SEQ ID NO:133)
CDR1 VL	KSSQSLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:134)	QSLNSGNQKNY (SEQ ID NO:140)	KSSQSLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:134)	SQSLNSGNQKNY (SEQ ID NO:146)	LNSGNQKNYLAWY (SEQ ID NO:151)	KSSQSLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:134)
CDR2 VL	GASTRES (SEQ ID NO:135)	GAS (SEQ ID NO:141)	GASTRES (SEQ ID NO:135)	GAS (SEQ ID NO:141)	LLIYGASTRE (SEQ ID NO:152)	GASTRES (SEQ ID NO:135)
CDR3 VL	LNDHSPFT (SEQ ID NO:136)	LNDHSPFT (SEQ ID NO:136)	LNDHSPFT (SEQ ID NO:136)	DHSPFT (SEQ ID NO:147)	LNDHSPFT (SEQ ID NO:153)	LNDHSPFT (SEQ ID NO:136)
Secuencia de VH:						
QVQLQESGAEELARPGASVKLSCKYSVGYIFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADMSSSTAYMDLRLTSEDSAVYFCARHWDGVLDFDYWG						
QGTSLTVSS (SEQ ID NO:155)						
Secuencia de VL:						
DIVMTQSPSSLSVAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISIVQAEDLAVYYCLNDHSPFTFGAGTKLEL						
K (SEQ ID NO:156)						

Tabla 7. Secuencias de CDR del anticuerpo 4P5

Sec. de CDR VH	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
CDR1 VH	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:157)	GYTFTRYD (SEQ ID NO:163)	RYDIN (SEQ ID NO:168)	GYTFTRY (SEQ ID NO:169)	TRYDIN (SEQ ID NO:174)	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:157)
CDR2 VH	WIYPGDDSTKYNEKFKG (SEQ ID NO:158)	IYPGDDST (SEQ ID NO:164)	WIYPGDDSTKYNEKFKG (SEQ ID NO:158)	PGDD (SEQ ID NO:170)	WIGWIYPGDDSTK (SEQ ID NO:175)	WIYPGDDSTK (SEQ ID NO:180)
CDR3 VH	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:159)	ARSDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:165)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:159)	DYYGSRSFV (SEQ ID NO:171)	ARSDYYGSRSFV (SEQ ID NO:176)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:159)
Sec. de CDR VL	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:160)	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:166)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:160)	SKSVSTSGYSY (SEQ ID NO:172)	STSGYSYMHWY (SEQ ID NO:177)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:160)
CDR2 VL	LASNLES (SEQ ID NO:161)	LAS (SEQ ID NO:167)	LASNLES (SEQ ID NO:161)	LAS (SEQ ID NO:167)	LLIYASNLE (SEQ ID NO:178)	LASNLES (SEQ ID NO:161)
CDR3 VL	HHSGELPYT (SEQ ID NO:162)	HHSGELPYT (SEQ ID NO:162)	HHSGELPYT (SEQ ID NO:162)	SGELPY (SEQ ID NO:173)	HHSGELPY (SEQ ID NO:179)	HHSGELPYT (SEQ ID NO:162)
Secuencia de VH:						
QVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWVKRPGQGLEWIGWIYPGDDSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVYFCARSDYYGSRSF						
VYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:181)						
Secuencia de VL:						
DILLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPARFSGRGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCHHSGELPYTFGGGTKL						
EIK (SEQ ID NO:182)						

Tabla 8: Secuencias de CDR del anticuerpo 5C23

Sec. de CDR VH	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
CDR1 VH	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:183)	GYTFTRYD (SEQ ID NO:189)	RYDIN (SEQ ID NO:194)	GYTFTRY (SEQ ID NO:195)	TRYDIN (SEQ ID NO:200)	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:183)
CDR2 VH	WIYPGDGSKYNEKFEG (SEQ ID NO: 184)	IYPGDGST (SEQ ID NO:190)	WIYPGDGSKYNEKFEG (SEQ ID NO:184)	PGDG (SEQ ID NO:196)	WIGWIYPGDGSK (SEQ ID NO:201)	WIYPGDGSK (SEQ ID NO:206)
CDR3 VH	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:185)	ARSDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:191)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:185)	DYYGSRSFV (SEQ ID NO:197)	ARSDYYGSRSFV (SEQ ID NO:202)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:185)
Sec. de CDR VL	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:186)	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:192)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:186)	SKSVSTSGYSY (SEQ ID NO:198)	STSGYSYMHWY (SEQ ID NO:203)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:186)
CDR2 VL	LASNLES (SEQ ID NO:187)	LAS (SEQ ID NO:193)	LASNLES (SEQ ID NO:187)	LAS (SEQ ID NO:193)	LLYLASNLE (SEQ ID NO:204)	LASNLES (SEQ ID NO:187)
CDR3 VL	QHSRELPYT (SEQ ID NO:188)	QHSRELPYT (SEQ ID NO:188)	QHSRELPYT (SEQ ID NO:188)	SRELPY (SEQ ID NO:199)	QHSRELPY (SEQ ID NO:205)	QHSRELPYT (SEQ ID NO:188)
Secuencia de VH:						
QVQPSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWVKRPQGQGLEWIGWYIPGDGSKYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSENSAVVFCARSDYYGSRSF						
VYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:207)						
Secuencia de VL:						
DIWLTQSPDSLTVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKL						
EIK (SEQ ID NO:208)						

Tabla 9: Secuencias de CDR del anticuerpo 5F7

Sec. de CDR	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Sec. de CDR1 VH	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:209)	GYTFTRYD (SEQ ID NO:215)	RYDIN (SEQ ID NO:220)	GYTFTRY (SEQ ID NO:221)	TRYDIN (SEQ ID NO:226)	GYTFTRYDIN (SEQ ID NO:209)
CDR2 VH	WIYPGDISTKYNEKFKG (SEQ ID NO:210)	IYPGDIST (SEQ ID NO:216)	WIYPGDISTKYNEKFKG (SEQ ID NO:210)	PGDI (SEQ ID NO:222)	WIGWIYPGDISTK (SEQ ID NO:227)	WIYPGDISTK (SEQ ID NO:232)
CDR3 VH	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:211)	ARSDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:217)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:211)	DYYGSRSFV (SEQ ID NO:223)	ARSDYYGSRSFV (SEQ ID NO:228)	SDYYGSRSFVY (SEQ ID NO:211)
Sec. de CDR1 VL	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:212)	KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:218)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:212)	SKSVSTSGYSY (SEQ ID NO:224)	STSGYSYMHWY (SEQ ID NO:229)	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:212)
CDR2 VL	LASNLES (SEQ ID NO:213)	LAS (SEQ ID NO:219)	LASNLES (SEQ ID NO:213)	LAS (SEQ ID NO:219)	LLIYLASNLE (SEQ ID NO:230)	LASNLES (SEQ ID NO:213)
CDR3 VL	QHSRELPTY (SEQ ID NO:214)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:214)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:214)	SRELPTY (SEQ ID NO:225)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:231)	QHSRELPTY (SEQ ID NO:214)
Secuencia de VH:						
QVQPQESGPELVKPGALVKISCKASGYTFTRYDINWVKQRPQGGLWIGWIYPGDISTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSENSAVYFCARSDYYGSRSF						
VYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:233)						
Secuencia de VL:						
DJMLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPKPQLLIYLASNLESVYPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYTFGGGTKV						
EIK (SEQ ID NO:234)						

Tabla 10: Secuencias de CDR del anticuerpo 1G19

	Secuencia ejemplar	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
Sec. de CDR1 CDR VH	GYSITSGYYWN (SEQ ID NO:235)	GYSITSGYY (SEQ ID NO:241)	SGYYWN (SEQ ID NO:246)	GYSITSGY (SEQ ID NO:247)	TSGYYWN (SEQ ID NO:252)	GYSITSGYYWN (SEQ ID NO:235)
CDR2 VH	YINYGGSNINYPSLKN (SEQ ID NO:236)	INYGGSN (SEQ ID NO:242)	YINYGGSNINYPSLKN (SEQ ID NO:236)	YGG (SEQ ID NO:248)	WMGYINYGGSN (SEQ ID NO:253)	YINYGGSN (SEQ ID NO:258)
CDR3 VH	RGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:237)	ARRGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:243)	RGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:237)	GAYYSNYDSFD (SEQ ID NO:249)	ARRGAYYSNYDSFD (SEQ ID NO:254)	RGAYYSNYDSFDV (SEQ ID NO:237)
Sec. de CDR1 CDR VL	KASQDINSYLS (SEQ ID NO:238)	QDINSY (SEQ ID NO:244)	KASQDINSYLS (SEQ ID NO:238)	SQDINSY (SEQ ID NO:250)	NSYLSWF (SEQ ID NO:255)	KASQDINSYLS (SEQ ID NO:238)
CDR2 VL	RANRLVD (SEQ ID NO:239)	RAN (SEQ ID NO:245)	RANRLVD (SEQ ID NO:239)	RAN (SEQ ID NO:245)	TLIYRANRLV (SEQ ID NO:256)	RANRLVD (SEQ ID NO:239)
CDR3 VL	LQYDEFFPYT (SEQ ID NO:240)	LQYDEFFPYT (SEQ ID NO:240)	LQYDEFFPYT (SEQ ID NO:240)	YDEFFY (SEQ ID NO:251)	LQYDEFFPY (SEQ ID NO:257)	LQYDEFFPYT (SEQ ID NO:240)
Secuencia de VH:						
QVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYINYGGSNINYPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTTEDTATYYCARRGAYYSNYD						
SFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:259)						
Secuencia de VL:						
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWVQKPKGKPKTIYRANRLVDGVPSPRFSGSGGQDYSLTISSLEIYEEMGIYCLQYDEFFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:260)						

Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una región VH o dominio VH. Los anticuerpos descritos en esta invención también pueden comprender una región VL o una cadena VL. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden tener una combinación de (i) un dominio VH o región VH; y/o (ii) un dominio VL o región VL.

- 5 Un anticuerpo descrito en esta invención comprende o consiste en seis CDR, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL identificadas en las tablas 2-10. Un anticuerpo descrito en esta invención puede comprender menos de seis CDR. Como se describe en esta invención, el anticuerpo puede comprender o consistir en una, dos, tres, cuatro, o cinco CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL identificadas en las tablas 1-10. Como se describe en esta invención, el anticuerpo
- 10 puede comprender o consistir en una, dos, tres, cuatro, o cinco CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL del anticuerpo monoclonal murino seleccionado de entre el grupo que consiste en: (a) el anticuerpo designado 5H23; (b) el anticuerpo designado 1C17; (c) el anticuerpo designado 1D19; (d) el anticuerpo designado 2L12; (e) el anticuerpo designado 3L3; (f) el anticuerpo designado 3N20; (g) el anticuerpo designado 4P5; (h) el anticuerpo designado 5C23; (i) el anticuerpo denominado 5F7; (j) el anticuerpo
- 15 designado 1G19 descrito en esta invención. En consecuencia, el anticuerpo descrito en esta invención puede comprender o consistir en una, dos, tres, cuatro, o cinco CDR de cualquiera de las CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y/o CDR3 VL identificadas en las tablas 1-10.

- Los anticuerpos descritos en esta invención comprenden una o más (*por ejemplo*, una, dos o tres) CDR VH
- 20 enumeradas en las tablas 1-10. Los anticuerpos descritos en esta invención también pueden comprender una o más (*por ejemplo*, una, dos o tres) CDR VL enumeradas en las tablas 1-10. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una o más (*por ejemplo*, una, dos o tres) CDR VH enumeradas en las tablas 1-10 y una o más CDR VL enumeradas en las tablas 1-10. En consecuencia, los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR1 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 7, 12, 13, 18,
- 25 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 8, 14, 19, 24, 28, 34, 40, 45, 50, 54, 60, 66, 71, 76, 80, 86, 92, 97, 102, 106, 112, 118, 123, 128, 132, 138, 144, 149, 154, 158, 164, 170, 175, 180, 184, 190, 196, 201, 206, 210, 216, 222, 227, 232, 236, 242, 248, 253 y 258.
- 30 Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR1 VH y/o una CDR2 VH y/o una CDR3 VH seleccionada independientemente de entre una CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH como se muestra en cualquiera de las secuencias
- 35 de aminoácidos representadas en la tabla 1-10. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109,
- 40 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257. Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una CDR1 VL y/o una CDR2 VL y/o una CDR3 VL seleccionada independientemente de entre una CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL como se
- 45 muestra en cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas en las tablas 1-10.

- Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende: (1) una CDR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO: 1, 27, 53, 79, 105, 131, 157, 183, 209 y/o 235, (ii) la SEQ ID NO: 7, 33, 59, 85, 111, 137, 163, 189,
- 50 215 o 241, (iii) la SEQ ID NO: 12, 38, 64, 90, 116, 142, 168, 194, 220 o 246, (iv) la SEQ ID NO: 13, 39, 65, 91, 117, 143, 169, 195, 221 o 247, y (v) la SEQ ID NO: 18, 44, 70, 96, 122, 148, 174, 200, 226 o 252; (2) una CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO: 2, 28, 54, 80, 106, 132, 158, 184, 210 y/o 236, (ii) la SEQ ID NO: 8, 34, 60, 86, 112, 138, 164, 190, 216 o 242, (iii) la SEQ ID NO: 14, 40, 66, 92, 118, 144, 170, 196, 222 o 248, (iv) la SEQ ID NO: 19, 45, 71, 97, 123, 149, 175, 201, 227 o 253, y (v) la SEQ
- 55 ID NO: 24, 50, 76, 102, 128, 154, 180, 206, 232 o 258; y (3) una CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO: 3, 29, 55, 81, 107, 133, 159, 185, 211 y o 237, (ii) la SEQ ID NO: 9, 35, 61, 87, 113, 139, 165, 191, 217 o 243, (iii) la SEQ ID NO: 15, 41, 67, 93, 119, 145, 171, 197, 223 o 249, y (iv) la SEQ ID NO: 20, 46, 72, 98, 124, 150, 176, 202, 228 o 254; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende: (1) una CDR1 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que
- 60 consiste en: (i) la SEQ ID NO: 4, 30, 56, 82, 108, 134, 160, 186, 212 y o 238, (ii) la SEQ ID NO: 10, 36, 52, 88, 114, 140, 166, 192, 218 o 244, (iii) la SEQ ID NO: 16, 42, 68, 94, 120, 146, 172, 198, 224 o 250, y (iv) la SEQ ID NO: 21, 47,

73, 99, 125, 151, 177, 203, 229 o 255; (2) una CDR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:5, 31, 57, 83, 109, 135, 161, 187, 213 y o 239, (ii) la SEQ ID NO:11, 37, 63, 89, 115, 141, 167, 193, 219 o 245, y (iii) la SEQ ID NO:22, 48, 74, 100, 126, 152, 178, 204, 230 o 256; y (3) una CDR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:6, 32, 58, 84, 110, 136, 162, 188, 214 y/o 240, (ii) la SEQ ID NO:17, 43, 69, 95, 121, 147, 173, 199, 225 o 251, y (iii) la SEQ ID NO:23, 49, 75, 101, 127, 153, 179, 205, 231 o 257.

Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una región variable de cadena pesada (VH) que comprende: (1) una CDR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:1, 27, 53, 79, 105, 131, 157, 183, 209 y o 235, (ii) la SEQ ID NO:7, 33, 59, 85, 111, 137, 163, 189, 215 o 241, (iii) la SEQ ID NO:12, 38, 64, 90, 116, 142, 168, 194, 220 o 246, (iv) la SEQ ID NO:13, 39, 65, 91, 117, 143, 169, 195, 221 o 247, y (v) la SEQ ID NO:18, 44, 70, 96, 122, 148, 174, 200, 226 o 252; (2) una CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:2, 28, 54, 80, 106, 132, 158, 184, 210 y o 236, (ii) la SEQ ID NO:8, 34, 60, 86, 112, 138, 164, 190, 216 o 242, (iii) la SEQ ID NO:14, 40, 66, 92, 118, 144, 170, 196, 222 o 248, (iv) la SEQ ID NO:19, 45, 71, 97, 123, 149, 175, 201, 227 o 253, y (v) la SEQ ID NO:24, 50, 76, 102, 128, 154, 180, 206, 232 o 258; y (3) una CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO: 3, 29, 55, 81, 107, 133, 159, 185, 211 y/o 237, (ii) la SEQ ID NO:9, 35, 61, 87, 113, 139, 165, 191, 217 o 243, (iii) la SEQ ID NO:15, 41, 67, 93, 119, 145, 171, 197, 223 o 249, y (iv) la SEQ ID NO:20, 46, 72, 98, 124, 150, 176, 202, 228 o 254.

Los anticuerpos descritos en esta invención pueden comprender una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende: (1) una VL CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:4, 30, 56, 82, 108, 134, 160, 186, 212 y o 238, (ii) la SEQ ID NO:10, 36, 52, 88, 114, 140, 166, 192, 218 o 244, (iii) la SEQ ID NO:16, 42, 68, 94, 120, 146, 172, 198, 224 o 250, y (iv) la SEQ ID NO:21, 47, 73, 99, 125, 151, 177, 203, 229 o 255; (2) una VL CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:5, 31, 57, 83, 109, 135, 161, 187, 213 y o 239, (ii) la SEQ ID NO:11, 37, 63, 89, 115, 141, 167, 193, 219 o 245, y (iii) la SEQ ID NO:22, 48, 74, 100, 126, 152, 178, 204, 230 o 256; y (3) una VL CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) la SEQ ID NO:6, 32, 58, 84, 110, 136, 162, 188, 214 y o 240, (ii) la SEQ ID NO:17, 43, 69, 95, 121, 147, 173, 199, 225 o 251, y (iii) la SEQ ID NO:23, 49, 75, 101, 127, 153, 179, 205, 231 o 257.

También se describen en esta invención anticuerpos que comprenden una o más CDR VH y una o más CDR VL (*por ejemplo*, una, dos o tres) enumeradas en las tablas 1-10. En particular, se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una CDR1 VH (SEQ ID NO:1, 7, 12, 13, 18, 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252.) y una CDR1 VL (SEQ ID NO:4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255); una CDR1 VH (SEQ ID NO:1, 7, 12, 13, 18, 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252); una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256) y una CDR1 VH (SEQ ID NO:1, 7, 12, 13, 18, 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252) CDR3 VL (SEQ ID NO:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257) y una CDR2 VH (SEQ ID NO:2, 8, 14, 19, 24, 28, 34, 40, 45, 50, 54, 60, 66, 71, 76, 80, 86, 92, 97, 102, 106, 112, 118, 123, 128, 132, 138, 144, 149, 154, 158, 164, 170, 175, 180, 184, 190, 196, 201, 206, 210, 216, 222, 227, 232, 236, 242, 248, 253 y 258); CDR1 VL (SEQ ID NO:4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255) y una CDR2 VH (SEQ ID NO:2, 8, 14, 19, 24, 28, 34, 40, 45, 50, 54, 60, 66, 71, 76, 80, 86, 92, 97, 102, 106, 112, 118, 123, 128, 132, 138, 144, 149, 154, 158, 164, 170, 175, 180, 184, 190, 196, 201, 206, 210, 216, 222, 227, 232, 236, 242, 248, 253 y 258); y una CDR3 VL (SEQ ID NO:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257); una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254) y una CDR1 VL (SEQ ID NO:4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255); una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254) y una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256); y una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254) y una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256); y una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254) y una CDR3 VL (SEQ ID NO:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101,

120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255) y una CDR3 VL (SEQ ID NOS:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257); una CDR1 VH (SEQ ID NO:1, 7, 12, 13, 18, 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252), una CDR2 VH (SEQ ID NO:2, 8, 14, 19, 24, 28, 34, 40, 45, 50, 54, 60, 66, 71, 76, 80, 86, 92, 97, 102, 106, 112, 118, 123, 128, 132, 138, 144, 149, 154, 158, 164, 170, 175, 180, 184, 190, 196, 201, 206, 210, 216, 222, 227, 232, 236, 242, 248, 253 y 258), una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254), una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256) y una CDR3 VL (SEQ ID NO:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257); una CDR1 VH (SEQ ID NO:1, 7, 12, 13, 18, 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252), una CDR2 VH (SEQ ID NO:2, 8, 14, 19, 24, 28, 34, 40, 45, 50, 54, 60, 66, 71, 76, 80, 86, 92, 97, 102, 106, 112, 118, 123, 128, 132, 138, 144, 149, 154, 158, 164, 170, 175, 180, 184, 190, 196, 201, 206, 210, 216, 222, 227, 232, 236, 242, 248, 253 y 258), una CDR1 VL (SEQ ID NO:4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255), una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256), y una CDR3 VL (SEQ ID NO:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257); una CDR1 VH (SEQ ID NO:1, 7, 12, 13, 18, 27, 33, 38, 39, 44, 53, 59, 64, 65, 70, 79, 85, 90, 91, 96, 105, 111, 116, 117, 122, 131, 137, 142, 143, 148, 157, 163, 168, 169, 174, 183, 189, 194, 195, 200, 209, 215, 220, 221, 226, 235, 241, 246, 247 y 252), una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254), una CDR1 VL (SEQ ID NO:4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255), una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256), y una CDR3 VL (SEQ ID NO:6, 17, 23, 32, 43, 49, 58, 69, 75, 84, 95, 101, 110, 121, 127, 136, 147, 153, 162, 173, 179, 188, 199, 205, 214, 225, 231, 240, 251 y 257); una CDR2 VH (SEQ ID NO:2, 8, 14, 19, 24, 28, 34, 40, 45, 50, 54, 60, 66, 71, 76, 80, 86, 92, 97, 102, 106, 112, 118, 123, 128, 132, 138, 144, 149, 154, 158, 164, 170, 175, 180, 184, 190, 196, 201, 206, 210, 216, 222, 227, 232, 236, 242, 248, 253 y 258), una CDR3 VH (SEQ ID NO:3, 9, 15, 20, 29, 35, 41, 46, 55, 61, 67, 72, 81, 87, 93, 98, 107, 113, 119, 124, 133, 139, 145, 150, 159, 165, 171, 176, 185, 191, 197, 202, 211, 217, 223, 228, 237, 243, 249 y 254), una CDR1 VL (SEQ ID NOS:4, 10, 16, 21, 30, 36, 42, 47, 56, 62, 68, 73, 82, 88, 94, 99, 108, 114, 120, 125, 134, 140, 146, 151, 160, 166, 172, 177, 186, 192, 198, 203, 212, 218, 224, 229, 238, 244, 250 y 255), una CDR2 VL (SEQ ID NO:5, 11, 22, 31, 37, 48, 57, 63, 74, 83, 89, 100, 109, 115, 126, 135, 141, 152, 161, 167, 178, 187, 193, 204, 213, 219, 230, 239, 245 y 256) o cualquier combinación de las mismas de las CDR VH y las CDR VL enumeradas en las tablas 1-10.

En otro aspecto más, las CDR descritas en esta invención incluyen secuencias de consenso derivadas de grupos de anticuerpos relacionados (véase, *por ejemplo*, las tablas 1-10). Como se describe en esta invención, una "secuencia de consenso" se refiere a secuencias de aminoácidos que tienen aminoácidos conservados comunes entre varias secuencias y aminoácidos variables que varían dentro de una secuencia de aminoácidos dada. Las secuencias de consenso de CDR proporcionadas incluyen las CDR correspondientes a CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y/o CDRL3. Las secuencias de consenso de las CDR de anticuerpos anti-beta klotho se muestran en la figura 2.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención comprende una región VH que comprende: (1) una FR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378; (2) una FR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:281, 282, y 283; (3) una FR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381; y/o (4) una FR4 VH que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO:288. En consecuencia, en algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región VH que incluye una FR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378. En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región VH que incluye una FR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:281, 282 y 283. En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región VH que incluye una FR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381. En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región VH que incluye una FR4 VH que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO:288.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención comprende una región VL que comprende: (1) una FR1 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID

NO:289, 290 y 382-384; (2) una FR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:291, 292, y 385-392; (3) una FR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:293, 294, 295, y 393-404; y/o (4) una FR4 VL que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO:296 y 405-407. En consecuencia, en algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una
 5 región VL que incluye una FR1 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:289, 290 y 382-384. En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región VL que incluye una FR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:291, 292, y 385-392. En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una
 10 región VL que incluye una FR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404. En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región VL que incluye una FR4 VL que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO:296 Y 405-407.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención comprende una región VH y una región VL, donde la región VH comprende además: (1) una FR1 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de
 15 entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378; (2) una FR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:281, 282, y 283; (3) una FR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381; y/o (4) una FR4 VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:288; y donde la región VL comprende además: (1) una FR1 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que
 20 consiste en las SEQ ID NO:289, 290 y 382-384; (2) una FR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:291, 292 y 385-392; (3) una FR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 293, 294, 295 y 393-404; y/o (4) una FR4 VL que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO:296 y 405-407.

25 También se proporcionan en esta invención anticuerpos que comprenden una o más (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro) FR VH y una o más FR VL enumeradas en la tabla 19. En particular, se proporciona en esta invención un anticuerpo que comprende una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378) y una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) y una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) u y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282, y283) y una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384), una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y385-392); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR1 VH (SEQ ID NO:278, 279, 280 y 378), una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR2 VH (SEQ ID NO:281, 282 y 283), una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392) y una FR4 VL (SEQ ID NO:296 y 405-407); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR2 VL (SEQ ID NO:291, 292 y 385-392); una FR3 VH (SEQ ID NO:284, 285, 286, 287 y 379-381), una FR1 VL (SEQ ID NO:289, 290 y 382-384) y una FR3 VL (SEQ ID NO:293, 294, 295 y 393-404); una FR3

ejemplificados en esta invención, o un epítopo de la superposición. Se espera que los anticuerpos y fragmentos que compiten o se unen al mismo epítopo que los anticuerpos ejemplificados muestren propiedades funcionales similares. Las proteínas y fragmentos de unión a antígeno ejemplificados incluyen aquellos con las regiones VH y VL, y las CDR descritas en esta invención, incluyendo las de las tablas 1-10. Por lo tanto, como un ejemplo específico, los anticuerpos que se describen incluyen aquellos que compiten con un anticuerpo que comprende: (a) 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 CDR enumeradas para un anticuerpo enumerado en las tablas 1-10; (b) una VH y una VL seleccionadas de entre las regiones VH y VL enumeradas para un anticuerpo enumerado en las tablas 1-10, tal como para el anticuerpo 5H23 (tabla 1) o (c) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden una VH y una VL como se especifica para un anticuerpo enumerado en las tablas 1-10.

10

En otro aspecto adicional más, los anticuerpos se describen en esta invención que se unen a una región, que incluye un epítopo, de beta klotho humano o beta klotho cyno. Por ejemplo, un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un dominio KLB2 de beta klotho humano que comprende los residuos de aminoácidos 509 a 1, 044 de la SEQ ID NO:297. Como otro ejemplo, un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a una región de glicosil hidrolasa 1 de un dominio KLB2 de beta klotho humano que comprende los residuos de aminoácidos 517 a 967 de la SEQ ID NO:297. El anticuerpo de la presente invención se une a una región de beta klotho humano que comprende los residuos de aminoácidos 657 a 703 de la SEQ ID NO:297. Como otro ejemplo más, un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a una región de beta klotho cyno que comprende los residuos de aminoácidos 657 a 703 de la SEQ ID NO:299.

20

En otro aspecto, los anticuerpos se describen en esta invención que se unen a un epítopo específico de beta klotho humano. Por ejemplo, un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano que comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos 657, 701 y/o 703 de beta klotho humano (SEQ ID NO:297). En consecuencia, un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos el residuo de aminoácido 657 de la SEQ ID NO:297. Un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos el residuo de aminoácido 701 de la SEQ ID NO:297. Un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos el residuo de aminoácido 703 de la SEQ ID NO:297. Un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos los residuos de aminoácidos 657 y 701 de la SEQ ID NO:297. Un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos los residuos de aminoácidos 657 y 703 de la SEQ ID NO:297. Un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos los residuos de aminoácidos 701 y 703 de la SEQ ID NO:297. Un anticuerpo proporcionado en esta invención se une a un epítopo de beta klotho humano, donde el epítopo de beta klotho humano comprende al menos los residuos de aminoácidos 657, 701 y 703 de la SEQ ID NO:297. Tales anticuerpos proporcionados anteriormente pueden inducir señalización de tipo FGF19 y/o señalización de tipo FGF21 en una célula que expresa beta klotho humano y un receptor de FGF. Además, en algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, humano o quimérico.

40

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos de la presente descripción pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir un polipéptido beta klotho o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza o inmunizar al mamífero con la proteína y uno o más adyuvantes. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa californiana, albúmina en suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen Ribí, CpG, Poly 1C, adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Un experto en la materia puede seleccionar el protocolo de inmunización sin experimentación indebida. El mamífero puede a continuación ser sangrado, y el suero analizado para el título de anticuerpos beta klotho. Si se desea, el mamífero puede ser estimulado hasta que el título de anticuerpos aumente o se estabilice. Adicionalmente o alternativamente, se pueden obtener linfocitos del animal inmunizado para la fusión y la preparación de anticuerpos monoclonales a partir de hibridoma como se describe a continuación.

2. Anticuerpos monoclonales

60

Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser alternativamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos

monoclonales se pueden fabricar utilizando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden fabricar por procedimientos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 4.816.567).

- 5 En el procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, como se describió anteriormente para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y a continuación se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, 10 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también denominada compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma 15 parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la 20 producción estable de anticuerpos de alto nivel por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE. UU. y las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU. También 25 se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromioma humano de ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J., Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos 30 monoclonales dirigidos contra el antígeno. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson y col., 35 Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad 35 deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, 40 las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección ip de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido 45 ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (*por ejemplo*, usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia mediante procedimientos 50 convencionales (*por ejemplo*, con sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteínas de anticuerpos, para obtener la síntesis 55 de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) y Plückerthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992).

Como se describe en esta invención, un anticuerpo que se une a un epítipo beta klotho comprende una secuencia de 60 aminoácidos de un dominio VH y/o una secuencia de aminoácidos de un dominio VL codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con (1) el complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica uno cualquiera de los dominios VH y/o VL descrito en esta invención en condiciones rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ADN unido a

5 filtro en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2xSSC/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C) en condiciones muy rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ácido nucleico unido a filtro en 6xSSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,1xSSC/SDS al 0,2 % a aproximadamente 68 °C), o en otras condiciones de hibridación rigurosas que son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, FM y col., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3).

10 Como se describe en esta invención, un anticuerpo que se une a un epítipo beta klotho comprende una secuencia de aminoácidos de una CDR VH o una secuencia de aminoácidos de una CDR VL codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las CDR VH y/o CDR VL representadas en las tablas 1-10 en condiciones rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ADN unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2xSSC/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C) en condiciones muy rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ácido nucleico unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,1xSSC/SDS al 0,2 % a aproximadamente 68 °C), o en otras condiciones de hibridación rigurosas que son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, FM y col., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3)

20 Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Antibody Phage Display: Methods and Protocols, PM O'Brien y R. Aitken, eds, Humana Press, Totawa NJ, 2002. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen fagos que muestran diversos fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de la cubierta del fago. Tales bibliotecas de fagos se criban para contra el antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben en el antígeno y por lo tanto se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. A continuación, los clones de unión se eluyen del antígeno y se pueden enriquecer aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno.

30 Los dominios variables se pueden visualizar funcionalmente en fagos, ya sea como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) , en los que VH y VL están unidos covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado a un dominio constante e Interactúan de forma no covalente, como se describe, por ejemplo, en Winter y col., Ann. Rev. Immunol, 12.: 433-455 (1994).

35 Los repertorios de genes VH y VL pueden clonarse por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que a continuación pueden buscarse para clones de unión a antígeno como se describe en Winter y col., *supra*. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin que sea necesaria la construcción de hibridomas. Alternativamente, el repertorio no tratado previamente se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos a una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths y col., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas no tratadas previamente también se pueden fabricar sintéticamente clonando los segmentos del gen V no reorganizados a partir de células madre, y usando cebadores de RCP que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr la reorganización *in vitro* como se describe, por ejemplo, en Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

45 El cribado de las bibliotecas se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el beta klotho, (*por ejemplo*, un polipéptido beta klotho, fragmento o epítipo) se puede utilizar para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresarse en las células huésped fijadas a placas de adsorción o utilizarse en la clasificación de células, o conjugarse con biotina para la captura con perlas recubiertas con estreptavidina, o utilizarse en cualquier otro procedimiento para el barrido de bibliotecas de presentación. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (*por ejemplo*, buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass y col., Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690 y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks y col, Biotechnol, 10: 779-783 (1992).

55 Los anticuerpos anti-beta klotho se pueden obtener mediante el diseño de un procedimiento de cribado de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-beta klotho completo usando secuencias de VH y/o de VL (*por ejemplo*, las secuencias de Fv), o diversas secuencias de CDR de las secuencias de VH y VL, a partir del clon de fago de interés y secuencias de región constante adecuadas (*por ejemplo*, Fc) descritas en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

3. Fragmentos de anticuerpos

La presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a beta klotho. En determinadas circunstancias, existen ventajas de usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos.

- 5 El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede conducir a un mejor acceso a las células, tejidos u órganos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson y col. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ejemplo*, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli* o células de levadura, lo que permite la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos que se analizaron anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semividua *in vivo* aumentada que comprende residuos de epítipo de unión al receptor de rescate, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el facultativo experto. En determinadas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) (véase, *por ejemplo*, el documento WO 93/16185; las patentes de los EE. UU. n.º 5.571.894; y 5.587.458). Fv y scFv tienen sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un scFv. (Véase, *por ejemplo*, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*). El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en las referencias citadas anteriormente. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos, tales como los biespecíficos.

- 30 Las estructuras de unión derivadas de anticuerpos más pequeñas son los dominios variables separados (dominios V) también denominados anticuerpos de dominio variable único (sdAbs). Determinados tipos de organismos, los camélidos y los peces cartilaginosos, poseen dominios simples tipo V de alta afinidad montados sobre una estructura de dominio equivalente Fc como parte de su sistema inmune. (Woolven y col, Immunogenetics 50.: 98-101, 1999; Streltsov y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 101:12444-12449, 2004). Los dominios similares a V (llamados VhH en camélidos y V-NAR en tiburones) típicamente muestran largos bucles de superficie, que permiten la penetración de cavidades de antígenos diana. También estabilizan dominios VH aislados enmascarando parches de superficie hidrófobos.

- Estos dominios VhH y V-NAR se han utilizado para diseñar sdAbs. Las variantes del dominio V humano se han diseñado utilizando la selección de bibliotecas de fagos y otras estrategias que han dado como resultado dominios derivados de VL y VH estables y de alta unión.

Los anticuerpos que se unen a beta klotho como se proporciona en esta invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo los anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos funcionales (*por ejemplo*, fragmentos de unión a beta klotho) de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos no limitados de fragmentos funcionales (*por ejemplo*, fragmentos que se unen a beta klotho) incluyen Fvs de cadena sencilla (scFv) (*por ejemplo*, incluyendo los monoespecíficos, biespecíficos, etc.), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(ab)₂, fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos Fd, fragmentos Fv, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo y minicuerpo.

Los anticuerpos proporcionados en esta invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une a un epítipo beta klotho. Las moléculas de inmunoglobulina proporcionadas en esta invención pueden ser de cualquier tipo (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Las variantes y derivados de anticuerpos incluyen fragmentos funcionales de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse a un epítipo de beta Klotho. Los fragmentos funcionales ejemplares incluyen fragmentos Fab (*por ejemplo*, un fragmento de anticuerpo que contiene el dominio de unión a antígeno y comprende una cadena ligera y parte de

una cadena pesada unida por un enlace disulfuro); Fab '(*por ejemplo*, un fragmento de anticuerpo que contiene un único dominio anti-unión que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra); F(ab')₂ (*por ejemplo*, dos moléculas Fab' unidas por enlaces disulfuro intercadena en las regiones articuladas de las cadenas pesadas; las moléculas Fab' pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos); un Fab biespecífico (*por ejemplo*, una molécula Fab que tiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede dirigirse a un epítomo diferente); una cadena Fab de cadena única que comprende una región variable, también conocida como sFv (*por ejemplo*, la región determinante variable de unión a antígeno de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unido por una cadena de 10-25 aminoácidos); un Fv unido por disulfuro, o dsFv (*por ejemplo*, la región determinante variable de unión a antígeno de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unido por un enlace disulfuro); un VH camelizado (*por ejemplo*, la región determinante variable de unión a antígeno de una cadena pesada única de un anticuerpo en el que algunos aminoácidos en la interfaz VH son los que se encuentran en la cadena pesada de los anticuerpos de camélido naturales); un sFv biespecífico (*por ejemplo*, una molécula sFv o dsFv que tiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede dirigirse a un epítomo diferente); un diacuerpo (*por ejemplo*, un sFv dimerizado formado cuando el dominio VH de un primer sFv se ensambla con el dominio VL de un segundo sFv y el dominio VL del primer sFv se ensambla con el dominio VH del segundo sFv; las dos regiones de unión a antígeno del diacuerpo puede dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos); y un triacuerpo (*por ejemplo*, un sFv trimerizado, formado de manera similar a un diacuerpo, pero en el que se crean tres dominios de unión a antígeno en un solo complejo; los tres dominios de unión a antígeno pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítomos). Los derivados de anticuerpos también incluyen una o más secuencias de CDR de un sitio de combinación de anticuerpos. Las secuencias de CDR se pueden unir entre sí en un andamio cuando hay dos o más secuencias de CDR. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende un Fv de cadena sencilla ("scFv"). Los scFv son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. El polipéptido scFv puede comprender además un enlazador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFvs véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, eds. Rosenburg y Moore. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

4. Anticuerpos humanizados

La presente descripción proporciona anticuerpos humanizados que se unen a beta klotho, incluyendo beta klotho humano y cyno. Los anticuerpos humanizados de la presente descripción pueden comprender una o más CDR como se muestra en las tablas 1-10. Se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar, por ejemplo, siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., 1986, *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col., 1988, *Nature*, 332: 323-327; Verhoeyen y col., 1988, *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano.

En algunos casos, los anticuerpos humanizados se construyen por injerto de CDR, en el que las secuencias de aminoácidos de las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo no humano parental (*por ejemplo*, roedor) son injertadas en una estructura de anticuerpo humano. Por ejemplo, Padlan y col. (FASEB J. 9:133-139, 1995) determinó que sólo aproximadamente un tercio de los residuos en las CDR realmente contactan con el antígeno, y los denominó "residuos determinante de especificidad", o SDR (por sus siglas en inglés). En la técnica del injerto de SDR, sólo los residuos de SDR se injertan en la estructura de anticuerpo humano (véase, *por ejemplo*, Kashmiri y col., *Methods* 36.: 25-34, 2005).

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la fabricación de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Por ejemplo, según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano (*por ejemplo*, roedor) se criba al compararla con la biblioteca completa de secuencias humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor puede seleccionarse como estructura humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col., (1993), *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia y col., (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 901. Otro procedimiento utiliza una estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89: 4285; Presta y col., (1993), *J. Immunol.* 151:2623. En algunos casos, la estructura se deriva de las secuencias de consenso de las subclases humanas más abundantes, el subgrupo V_L 6 I (V_L 6I) y el subgrupo V_H III (V_H III). En otro procedimiento, los genes de la línea germinal humana se utilizan en la fuente de las regiones de estructura.

En un paradigma alternativo basado en la comparación de CDR, llamado superhumanización, la homología FR es

irrelevante. El procedimiento consiste en la comparación de la secuencia no humana con el repertorio de genes de línea germinal humana funcional. A continuación, se seleccionan aquellos genes que codifican las mismas estructuras canónicas estrechamente relacionadas con las secuencias murinas. A continuación, dentro de los genes que comparten las estructuras canónicas con el anticuerpo no humano, aquellos con mayor homología dentro de las CDR se eligen como donantes FR. Finalmente, las CDR no humanas se injertan en estas FR (véase, *por ejemplo* Tan y col., J. Immunol. 169: 1119-1125, 2002).

Además, generalmente es deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de su afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. Estos incluyen, por ejemplo, WAM (Whitelegg y Rees, Protein Eng. 13: 819-824, 2000), Modeller (Sali y Blundell, J. Mol. Biol. 234: 779-815, 1993), y Swiss PDB Viewer (Guex y Peitsch, Electrophoresis 18: 2714-2713, 1997). La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la posible función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, *por ejemplo*, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras e importadas, de tal forma que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el o los antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Otro procedimiento para la humanización de anticuerpos se basa en una métrica de la humanidad del anticuerpo denominada contenido de cadena humana (HSC, por sus siglas en inglés). Este procedimiento compara la secuencia de ratón con el repertorio de genes de la línea germinal humana y las diferencias se puntúan como HSC. La secuencia diana a continuación se humaniza mediante la maximización de su HSC en lugar de utilizar una medida de la identidad global para generar múltiples variantes humanizadas. (Lazar y col., Mol. Immunol. 44: 1986-1998, 2007).

Además de los procedimientos descritos anteriormente, se pueden usar procedimientos empíricos para generar y seleccionar anticuerpos humanizados. Estos procedimientos incluyen los que se basan en la generación de grandes bibliotecas de variantes humanizadas y la selección de los mejores clones usando tecnologías de enriquecimiento o técnicas de cribado de alto rendimiento. Las variantes de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de presentación en fagos, ribosomas y levaduras, así como por cribado de colonias bacterianas (véase, *por ejemplo*, Hoogenboom, Nat. Biotechnol. 23: 1105-1116, 2005; Dufner y col., Trends Biotechnol. 24: 523-529, 2006; Feldhaus y col., Nat. Biotechnol. 21: 163-70, 2003; Schlapschy y otros., Protein Eng. Des. Sel. 17: 847-60, 2004).

En la estrategia de biblioteca FR, se introduce una colección de variantes de residuos en posiciones específicas en la FR seguido por la selección de la biblioteca para seleccionar la FR que mejor respalde la CDR injertada. Los residuos a sustituir pueden incluir algunos o todos de los residuos "Vernier" identificados como potencialmente contribuyentes a la estructura de CDR (véase, *por ejemplo*, Foote y Winter, J. Mol. Biol. 224: 487-499, 1992), o del conjunto más limitado de residuos diana identificados por Baca y col. (J. Biol Chem 272: 10678-10684, 1997).

En el barajado de FR, las FR completas se combinan con CDR no humanas en lugar de crear bibliotecas combinatorias de variantes de residuos seleccionados (véase, *por ejemplo*, Dall'Acqua y col., Methods 36.: 43-60, 2005). Las bibliotecas se pueden cribar para la unión en un procedimiento de selección de dos etapas, primero humanizando VL, seguido de VH. Alternativamente, se puede usar un procedimiento de barajado de FR de una etapa. Se ha demostrado que dicho procedimiento es más eficiente que el cribado en dos etapas, ya que los anticuerpos resultantes mostraron propiedades bioquímicas y fisicoquímicas mejoradas, incluyendo una expresión mejorada, una mayor afinidad y estabilidad térmica (véase, *por ejemplo*, Damschroder y col., Mol. Immunol. 44: 3049-60, 2007).

El procedimiento de "modificación por ingeniería genética" se basa en la identificación experimental de determinantes esenciales de especificidad mínima (MSDS, por sus siglas en inglés) y se basa en el reemplazo secuencial de fragmentos no humanos en las bibliotecas de FR humanas y la evaluación de la unión. Comienza con las regiones de la CDR3 de las cadenas VH y VL no humanas y reemplaza progresivamente otras regiones del anticuerpo no humano en las FR humanas, incluyendo la CDR1 y CDR2 de ambos VH y VL. Esta metodología típicamente da como resultado la retención de epítipo y la identificación de anticuerpos de múltiples subclases con distintas CDR del segmento V humano. La modificación por ingeniería genética permite el aislamiento de anticuerpos que son 91-96 % homólogos a los anticuerpos de genes de línea germinal humana. (véase, *por ejemplo*, Alfenito, tercera PEGS anual de Cambridge Healthtech Institute, IThe Protein Engineering Summit, 2007).

El procedimiento de "modificación por ingeniería genética" implica alterar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de ratón o quimérico, haciendo cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un ser humano que, no obstante, conserva las propiedades de unión deseables de los anticuerpos no humanos
 5 originales. En general, la técnica implica clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano (*por ejemplo*, ratón) como residuos de "bajo riesgo", "riesgo moderado", o "alto riesgo". La clasificación se realiza utilizando un cálculo global de riesgo/recompensa que evalúa los beneficios previstos de realizar una sustitución particular (*por ejemplo*, para inmunogenicidad en seres humanos) contra el riesgo de que la sustitución afecte el plegamiento del anticuerpo resultante y/o se sustituyan con residuos humanos. El residuo de aminoácido humano particular que se
 10 sustituirá en una posición dada (*por ejemplo*, riesgo bajo o moderado) de una secuencia de anticuerpo no humano (*por ejemplo*, ratón) se puede seleccionar alineando una secuencia de las regiones variables del anticuerpo no humano con la región correspondiente de una secuencia de anticuerpos humanos específica o de consenso. Los residuos de aminoácidos en posiciones de riesgo bajo o moderado en la secuencia no humana se pueden sustituir por los residuos correspondientes en la secuencia de anticuerpos humanos según la alineación. Las técnicas para la fabricación de
 15 proteínas por ingeniería genética se describen con mayor detalle en Studnicka y col., *Protein Engineering*, 7: 805-814 (1994), las patentes de los EE. UU. n.º 5.766.886, 5.770.196, 5.821.123 y 5.869.619 y la publicación de solicitud PCT WO 93/11794.

5. Anticuerpos humanos

20 Los anticuerpos anti-beta klotho humanos pueden construirse combinando secuencia(s) de dominios variables de clon Fv seleccionada(s) de bibliotecas de presentación en fagos derivadas de humanos con secuencia(s) de dominio constante humanas conocida(s). Alternativamente, los anticuerpos anti-beta klotho monoclonales humanos de la presente descripción se pueden fabricar por el procedimiento del hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano
 25 y heteromioma humano de ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos han sido descritas, por ejemplo, por Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

También es posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de
 30 producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Los ratones transgénicos que expresan repertorios de anticuerpos humanos se han utilizado para generar anticuerpos monoclonales de secuencia humana de alta afinidad contra una amplia diversidad de posibles dianas farmacológicas (véase, *por ejemplo*, Jakobovits, A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995, 6(5):561-6; Brüggemann y Taussing, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8(4):455-8; las patentes de los EE. UU. n.º 6.075.181y 6.150.584; y Lonberg y col., *Nature*
 35 *Biotechnol.* 23: 1117-1125, 2005).

Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (*por ejemplo*, dichos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*) (véase, *por ejemplo*, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer*
 40 *Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); y la patente de los EE. UU. n.º 5.750.373).

El barajado de genes también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano
 45 inicial. Según este procedimiento, que también se denomina "impresión de epitopos" o "selección guiada", la región variable de la cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en esta invención se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana donde
 50 la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, (*por ejemplo*, el epítipo guía (imprime) la elección del compañero de la cadena humana). Cuando se repite el procedimiento para reemplazar la cadena no humana restante,, se obtiene un anticuerpo humano (véase, *por ejemplo*, el documento PCT WO 93/06213; y Osbourn y col., *Methods.*, 36, 61-68, 2005). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta
 55 técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano. Los ejemplos de selección guiada para humanizar anticuerpos de ratón contra antígenos de la superficie celular incluyen la proteína de unión a folato presente en las células de cáncer de ovario (véase, *por ejemplo*, Figini y col., *Cancer Res.*, 58, 991-996, 1998) y CD147, que es altamente expresado en el carcinoma hepatocelular (véase, *por ejemplo*, Bao y col., *Cancer Biol. Ther.*, 4, 1374-1380, 2005).

60 Una posible desventaja de la estrategia de selección guiada es que el barajado de una cadena de anticuerpos mientras

se mantiene constante la otra podría resultar en la deriva de epítopo. Para mantener el epítopo reconocido por el anticuerpo no humano, se puede aplicar la retención de CDR (véase, *por ejemplo*, Klimka y col., Br. J. Cancer., 83, 252-260, 2000; VH CDR2 Beiboer y coll., J. Mol. Biol., 296, 833-49, 2000) En este procedimiento, la CDR3 VH no humana se conserva comúnmente, ya que esta CDR puede estar en el centro del sitio de unión a antígeno y puede ser que sea la región más importante del anticuerpo para el reconocimiento del antígeno. En algunos casos, sin embargo, pueden conservarse CDR3 VH y CDR3 VL, así como CDR3 VH, CDR3 VL y CFR1 VL, del anticuerpo no humano.

6. Anticuerpos biespecíficos

10

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Como se describe en esta invención, los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos humanos o humanizados. Una de las especificidades de unión puede ser para beta klotho y la otra puede ser para cualquier otro antígeno. Una de las especificidades de unión puede ser para beta klotho, y la otra puede ser para otro antígeno de superficie expresado en células que expresan beta klotho y un receptor de FGF (*por ejemplo*, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4). Los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de beta klotho. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

15

20 Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante la expresión conjunta de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (véase, *por ejemplo*, Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Bispecific Antibodies, Kontermann, ed., Springer-Verlag, Hiedelberg (2011).

25

7. Anticuerpos multivalentes

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

40

45

8. Ingeniería Fc

50

Puede ser deseable modificar un anticuerpo que se une a beta klotho mediante ingeniería Fc, incluyendo, con respecto a la función efectora, por ejemplo, para disminuir o eliminar la citotoxicidad de células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, se demostró que las sustituciones en IgG1 humana usando residuos de IgG2 como las posiciones 233-236 y residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331, reducen en gran medida ADCC y CDC (véase, *por ejemplo*, Armor y col., Eur. J. Immunol. 29(8):2613-24 (1999); Shields y col., J. Biol.Chem. 276(9): 6591-604 (2001).

55

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), por ejemplo, como se describe en la patente de los EE. UU. n.º 5.739.277. El término "epítopo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una

60

molécula de IgG (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable del aumento de la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

9. Agentes de unión alternativos

5

La presente descripción abarca agentes de unión no inmunoglobulina que se unen específicamente al mismo epítipo que un anticuerpo anti-beta klotho descrito en esta invención. Como se describe en esta invención, un agente de unión no inmunoglobulina se identifica como un agente que se desplaza o es desplazado por un anticuerpo anti-beta-klotho de la presente descripción en un ensayo de unión competitivo. Estos agentes de unión alternativos pueden incluir, *por ejemplo*, cualquiera de los andamios de proteínas modificados por ingeniería conocidos en la técnica. Tales andamios pueden comprender una o más CDR como se muestra en las tablas 1-10. Tales andamios incluyen, *por ejemplo*, anticualinas, que se basan en el andamio lipocalina, una estructura de proteína caracterizada por un barril beta rígido que soporta cuatro bucles hipervariables que forman el sitio de unión a ligando. Las especificidades de unión novedosas se pueden modificar por ingeniería mediante mutagénesis aleatoria dirigida en las regiones de bucle, en combinación con la visualización funcional y la selección guiada (*véase, por ejemplo*, Skerra (2008) FEBS J. 275: 2677-2683). Otros andamios adecuados pueden incluir, *por ejemplo*, adnectinas o monocuerpos, basados en el décimo dominio extracelular de fibronectina III humana (*véase, por ejemplo*, Koide y Koide (2007) Methods Mol. Biol. 352: 95-109); aficuerpos, basados en el dominio Z de la proteína estafilocócica A (*véase, por ejemplo*, Nygren y col. (2008) FEBS J. 275: 2668-2676); DARPin, basadas en proteínas de repetición de anquirina (*véase, por ejemplo*, Stump y col. (2008) Drug. Discov. Today 13: 695-701); finómeros, basados en el dominio SH3 de la proteína quinasa Fyn humana Grabulovski y col. (2007) J. Biol. Chem. 282: 3196-3204); afitinas, basadas en Sac7d de *Sulfolobus acidolarius* (*véase, por ejemplo*, Krehenbrink y col. (2008) J. Mol. Biol. 383: 1058-1068); afillinas, basadas en γ -B-cristalina humana (*véase, por ejemplo*, Ebersbach y col. (2007) J. Mol. Biol. 372: 172-185); avímeros, basados en los dominios A de las proteínas del receptor de membrana (*véase, por ejemplo*, Silverman y col. (2005) Biotechnol. 23: 1556-1561); péptidos de knotina ricos en cisteína (*véase, por ejemplo*, Kolmar (2008) FEBS J. 275: 2684-2690); e inhibidores de tipo Kunitz modificados por ingeniería (*véase, por ejemplo*, Nixon y Wood (2006) Curr. Opin. Drug. Discov. Dev. 9: 261-268) Para una revisión, véase, *por ejemplo*, Gebauer y Skerra (2009) Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 245-255.

30 Variantes de anticuerpos

Como se describe en esta invención, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos que se unen a beta klotho o descritos en esta invención. *Por ejemplo*, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo, que incluyen pero no se limitan a la especificidad, termoestabilidad, nivel de expresión, funciones efectoras, glucosilación, inmunogenicidad reducida o solubilidad. Esto, además de los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención, se contempla que se pueden preparar variantes de anticuerpos anti-beta klotho. *Por ejemplo*, las variantes de anticuerpos anti-beta klotho se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificador, y/o mediante la síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procedimientos posttraduccionales del anticuerpo anti-beta klotho, tal como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje de membrana.

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse químicamente, *por ejemplo*, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Los derivados de anticuerpos pueden incluir anticuerpos que han sido modificados químicamente, *por ejemplo*, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de bloqueo/protección conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

50

Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o polipéptido que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leuquina con una serina, *por ejemplo*, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La sustitución, delección o inserción puede incluir menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la molécula original. La sustitución puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos realizada en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

60

La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

- 5 Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para la terapia con profármacos enzimáticos dirigida por anticuerpos) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

- Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Alternativamente, se pueden realizar sustituciones conservadoras (*por ejemplo*, dentro de un grupo de aminoácidos con propiedades y/o cadenas laterales similares), para mantener o no cambiar significativamente las propiedades. Los aminoácidos se pueden agrupar según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (véase, *por ejemplo*, A.L. Lehninger, en *Biochemistry*, 2ª ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)): (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); y (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H).

- Alternativamente, los residuos de naturales pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

- Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios restantes (no conservados). En consecuencia, como se describe en esta invención, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un epítipo beta klotho comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal murino descrito en esta invención. Como se describe en esta invención, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un epítipo beta klotho comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos representada en las tablas 1-10. Como se describe en esta invención, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un epítipo beta klotho comprende una secuencia de aminoácidos CDR VH y/o CDR VL que es al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos CDR VH representada en las tablas 1-10 y/o una secuencia de aminoácidos CDR VL representada en las tablas 1-10. Las variaciones pueden realizarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), exploración de alanina y mutagénesis por RCP. La mutagénesis dirigida al sitio (véase, *por ejemplo*, Carter y coll., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller y col., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)), la mutagénesis en casete (véase, *p.ej.*, Wells y col., *Gene*, 34:315 (1985)), la mutagénesis de selección de restricción (véase, *por ejemplo*, Wells y col., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)) u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN variante del anticuerpo anti-beta klotho.

- 50 Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo anti-beta klotho también puede ser sustituido, por ejemplo, con otro aminoácido tal como alanina o serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir la reticulación aberrante. A la inversa, pueden añadirse enlaces de cisteína al anticuerpo anti-beta klotho para mejorar su estabilidad (*por ejemplo*, cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

- Una molécula de anticuerpo anti-beta klotho de la presente descripción puede ser anticuerpo "desinmunizado". Un anticuerpo anti-beta klotho "desinmunizado" es un anticuerpo derivado de un anticuerpo anti-beta klotho humanizado o quimérico, que tiene una o más alteraciones en su secuencia de aminoácidos que resulta en una reducción de la inmunogenicidad del anticuerpo, en comparación con el anticuerpo original no inmunizado respectivo. Uno de los procedimientos para generar tales anticuerpos mutantes implica la identificación y eliminación de epítopos de células

T de la molécula de anticuerpo. En una primera etapa, la inmunogenicidad de la molécula de anticuerpo se puede determinar por varios procedimientos, por ejemplo, mediante la determinación *in vitro* de epítomos de células T o la predicción *in silico* de tales epítomos, como se conoce en la técnica. Una vez que se han identificado los residuos críticos para la función del epítomo de células T, se pueden realizar mutaciones para eliminar la inmunogenicidad y conservar la actividad de anticuerpos. Para una revisión, véase, por ejemplo, Jones y col., *Methods in Molecular Biology* 525: 405-423, 2009.

1. Maduración de afinidad *in vitro*

10 Como se describe en esta invención, las variantes de anticuerpo que tiene una propiedad mejorada tal como la afinidad, la estabilidad, o el nivel de expresión en comparación con un anticuerpo parental se pueden preparar por maduración de la afinidad *in vitro*. Al igual que el prototipo natural, la maduración de la afinidad *in vitro* se basa en los principios de la mutación y la selección. Las bibliotecas de anticuerpos se muestran como fragmentos de dominio Fab, scFv o V, ya sea en la superficie de un organismo (*por ejemplo*, fagos, bacterias, levaduras o células de mamíferos) o en asociación (*por ejemplo*, covalente o no covalente) con su ARNm o ADN codificante. La selección por afinidad de los anticuerpos mostrados permite el aislamiento de organismos o complejos que llevan la información genética que codifica los anticuerpos. Dos o tres rondas de mutación y selección a través de los procedimientos de visualización, tales como la presentación en fagos por lo general dan como resultado fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo nanomolar bajo. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana.

La presentación en fagos es un procedimiento extendido para la visualización y la selección de anticuerpos. Los anticuerpos se muestran en la superficie de los bacteriófagos Fd o M13 como fusiones a la proteína de la cubierta del bacteriófago. La selección implica la exposición al antígeno para permitir que los anticuerpos presentados en fagos se unan a sus dianas, un procedimiento denominado "barrido". Los fagos unidos al antígeno se recuperan e infectan en bacterias para producir fagos para rondas adicionales de selección. Para su revisión, véase, por ejemplo, Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178: 1-37, 2002; Bradbury y Marks, *J. Immuno. Methods* 290: 29-49, 2004).

En un sistema de presentación en levaduras (véase, *por ejemplo*, Boder y col., *Nat. Biotech.* 15: 553-57, 1997; Chao y col., *Nat. Protocols* 1:755-768, 2006), el anticuerpo puede mostrarse como fusiones variables de cadena sencilla (scFv) en las que las cadenas pesadas y ligeras están conectadas por un enlazador flexible. El scFv está fusionado a la subunidad de adhesión de la proteína de aglutinina de levadura Aga2p, que se une a la pared celular de la levadura a través de enlaces disulfuro a Aga1p. La visualización de una proteína a través de Aga2p proyecta la proteína lejos de la superficie celular, minimizando las posibles interacciones con otras moléculas sobre la pared celular de la levadura. La separación magnética y la citometría de flujo se utilizan para cribar la biblioteca para seleccionar anticuerpos con afinidad o estabilidad mejoradas. La unión a un antígeno soluble de interés se determina marcando la levadura con antígeno biotinilado y un reactivo secundario, tal como estreptavidina conjugada con un fluoróforo. Las variaciones en la expresión de la superficie del anticuerpo se pueden medir mediante el marcado de inmunofluorescencia del marcador de hemaglutinina o el epítomo de c-Myc que flanquea el scFv. Se ha demostrado que la expresión se correlaciona con la estabilidad de la proteína que se muestra, y por lo tanto los anticuerpos se pueden seleccionar para mejorar la estabilidad, así como la afinidad (véase, *por ejemplo*, Shusta y col., *J. Mol. Biol.* 292: 949-956, 1999). Una ventaja adicional de la presentación en levaduras es que las proteínas mostradas están plegadas en el retículo endoplasmático de las células de levadura eucariotas, aprovechando las chaperonas del retículo endoplasmático y la maquinaria de control de calidad. Una vez que la maduración se completa, la afinidad de anticuerpos se puede "titular" convenientemente mientras se muestra en la superficie de la levadura, eliminando la necesidad de expresión y purificación de cada clon. Una limitación teórica de la presentación de superficie de levaduras es el tamaño de biblioteca funcional potencialmente más pequeño que la de otros procedimientos de visualización; sin embargo, una estrategia reciente utiliza el sistema de apareamiento las células de levadura para crear una diversidad combinatoria que se estima en un tamaño de 10^{14} (véase, *por ejemplo*, la publicación de patente de los EE. UU. 2003/0186.374; Blaise y col, *Gene* 342.: 211-218, 2004).

En la presentación en ribosomas, se generan complejos anticuerpo-ribosoma-ARNm (ARM) para la selección en un sistema libre de células. La biblioteca de ADN que codifica para una biblioteca particular de anticuerpos está genéticamente fusionada a una secuencia espaciadora que carece de un codón de parada. Esta secuencia espaciadora, cuando se traduce, todavía está unida al ARNt de peptidilo y ocupa el túnel ribosómico, y por lo tanto permite que la proteína de interés sobresalga del ribosoma y se pliegue. El complejo resultante de ARNm, ribosoma, y la proteína puede unirse al ligando unido a la superficie, lo que permite el aislamiento simultáneo del anticuerpo y su ARNm codificador a través de la captura por afinidad con el ligando. El ARNm unido al ribosoma se invierte de nuevo y se transcribe nuevamente en ADNc, que a continuación puede experimentar mutagénesis y usarse en la siguiente ronda de selección (véase, *por ejemplo*, Fukuda y coll., *Nucleic Acids Res.* 34, E127, 2006). En la visualización de ARNm, se establece un enlace covalente entre el anticuerpo y el ARNm utilizando puomicina como molécula

adaptadora (Wilson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98, 3750-3755, 2001).

- Como estos procedimientos se realizan completamente *in vitro*, proporcionan dos ventajas principales sobre otras tecnologías de selección. En primer lugar, la diversidad de la biblioteca no está limitada por la eficiencia de transformación de las células bacterianas, sino sólo por el número de ribosomas y las diferentes moléculas de ARNm presentes en el tubo de ensayo. En segundo lugar, las mutaciones aleatorias pueden introducirse fácilmente después de cada ronda de selección, por ejemplo, mediante polimerasas sin corrección de pruebas, ya que ninguna biblioteca debe transformarse después de cualquier etapa de diversificación.
- 10 La diversidad puede introducirse en las CDR o en los genes V completos de las bibliotecas de anticuerpos de forma dirigida o mediante introducción aleatoria. La primera estrategia incluye el direccionamiento secuencial de todas las CDR de un anticuerpo mediante un nivel alto o bajo de mutagénesis o el direccionamiento de puntos calientes aislados de hipermutación somáticas (véase, *por ejemplo*, Ho, y col., J. Biol. Chem. 280: 607-617, 2005) o residuos sospechosos de afectar la afinidad sobre bases experimentales o razones estructurales. Se pueden introducir mutaciones aleatorias en todo el gen V utilizando cepas mutantes de *E. coli*, replicación propensa a errores con ADN polimerasas (véase, *por ejemplo*, Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226: 889-896, 1992) o replicasas de ARN. La diversidad también puede introducirse mediante el reemplazo de las regiones que son naturalmente diversas a través de barajado de ADN o técnicas similares (véase, *por ejemplo*, Lu y col., J. Biol. Chem. 278: 43496-43507, 2003; la patente de los EE. UU. n.º 5.565.332; la patente de los EE. UU. n.º 6.989.250). Las técnicas alternativas se dirigen a bucles hipervariables que se extienden en los residuos de la región de estructura (véase, *por ejemplo*, Bond y col., J. Mol. Biol. 348: 699-709, 2005) emplean deleciones e inserciones de bucle en CDR o utilizan la diversificación basada en hibridación (véase, *por ejemplo*, la publicación de patente de los EE. UU. n.º 2004/0005709). Se describen procedimientos adicionales para generar diversidad en CDR, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 7.985.840.
- 25 El cribado de las bibliotecas se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el beta klotho se puede inmovilizar en soportes sólidos, columnas, clavijas o membranas de celulosa/poli(fluoruro de vinilideno)/otros filtros, expresarse en células huésped fijadas a placas de adsorción o usarse en la clasificación de células, o conjugarse con biotina para su captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o se utilizan en cualquier otro procedimiento para barrer bibliotecas de visualización.
- 30 Para la revisión de los procedimientos de maduración de la afinidad *in vitro*, véase, *por ejemplo*, Hoogenboom, Nature Biotechnology 23: 1105-1116, 2005 y Quiroz y Sinclair, revista Ingeniería Biomedica 4: 39-51, 2010y las referencias en los mismos.
- 35 2. Modificaciones de anticuerpos antibeta-klotho
- Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-beta klotho incluyen la reacción de residuos de aminoácidos dirigidos de un anticuerpo anti-beta klotho con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los- residuos terminales N o C del anticuerpo anti-beta klotho. Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (véase, *por ejemplo*, TE Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, WH Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.
- 45 Otros tipos de modificación covalente del anticuerpo anti-beta klotho incluyen la alteración del patrón de glucosilación nativo del anticuerpo o polipéptido (véase, *por ejemplo*, Beck y col., Curr. Pharm. Biotechnol. 9: 482-501, 2008; Walsh, Drug Discov. Today 15: 773-780, 2010), y la unión del anticuerpo a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera establecida, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192o 4.179.337.
- 50 Un anticuerpo anti-beta klotho de la presente descripción también puede modificarse para formar moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti-beta klotho fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos, por ejemplo, un marcador de epítipo (véase, *por ejemplo*, Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 523-533, 2003) o la región Fc de una molécula de IgG (véase, *por ejemplo*, Aruffo, "Immunoglobulin fusion proteins" en Antibody Fusion Proteins, SM Chamow y A. Ashkenazi, eds., Wiley-Liss, Nueva York, 1999, págs. 221-242).
- 55 También se describen en esta invención proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo proporcionado en esta invención que se une a un antígeno beta klotho y un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo al que se fusiona el anticuerpo es útil para dirigir el anticuerpo a células que tienen beta klotho expresado en la superficie celular.
- 60

También se describen en esta invención paneles de anticuerpos que se unen a un antígeno beta klotho. Los paneles de anticuerpos tienen constantes de velocidad de asociación diferentes, constantes de velocidad de disociación diferentes, afinidades diferentes para el antígeno beta klotho, y/o diferentes especificidades para un antígeno beta klotho. Los paneles pueden comprender o consistir en aproximadamente 10, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700, aproximadamente 750, aproximadamente 800, aproximadamente 850, aproximadamente 900, aproximadamente 950, o aproximadamente 1.000 anticuerpos o más. Los paneles de anticuerpos se pueden utilizar, por ejemplo, en placas de 96 pocillos o 384 pocillos, tales como para ensayos tales como ELISA.

Preparación de los anticuerpos antibeta-klotho

Los anticuerpos anti-beta klotho se pueden producir cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-beta klotho. Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo de la presente descripción se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridomas. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de RCP. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en células huésped. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica se pueden utilizar para el objeto de la presente descripción. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula huésped particular que se transformará con el vector. Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos de la presente descripción incluyen procariontes tales como arqueobacterias y eubacterias, que incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras, células de invertebrados tales como células de insectos o de plantas, y células de vertebrados tales como líneas de células huésped de mamíferos. Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Los anticuerpos producidos por las células huésped se purifican usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales como se conocen en la técnica.

Los procedimientos para la producción de anticuerpos, que incluyen la construcción, expresión y purificación del vector se describen adicionalmente, en Plückthun y col., (1996) en *Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation* (McCafferty, J., Hoogenboom, H. R., and Chiswell, D. J., eds), 1 ed., págs. 203-252, IRL Press, Oxford; Kwong, K. & Rader, C., *E. coli*, expression and purification of Fab antibody fragments *Current protocols in protein science* editorial board John E Coligan y col., capítulo 6, unidad 6.10 (2009); Tachibana and Takekoshi, "Production of Antibody Fab Fragments in *Escherichia coli*," in *Antibody Expression and Production*, M. Al-Rubeai, Ed., Springer, New York, 2011; *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (ed Z. An), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, EE. UU.

Por supuesto, se contempla que se puedan emplear procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar anticuerpos anti-beta klotho. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véase, *por ejemplo*, Stewart y col., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. Diversas partes del anticuerpo anti-beta klotho pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-beta klotho deseado. Alternativamente, los anticuerpos pueden purificarse a partir de células o fluidos corporales, tales como la leche, de un animal transgénico modificado por ingeniería genética para expresar el anticuerpo, como se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 5.545.807 y la patente de los EE. UU. n.º 5.827.690.

Inmunoconjugados

La presente descripción también proporciona conjugados que comprenden un anticuerpo anti-beta klotho de la presente invención unido covalentemente por un enlazador sintético a uno o más agentes que no son anticuerpos.

Hay disponibles una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At ²¹¹, I4, I4, Y4, Re4, Re4, SM4, Bi4, P4, Pb4 e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de centellografía, por ejemplo tc4 o 14, o un marcador giratorio para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocidas como

imágenes de resonancia magnética, IRM), tal como el yodo-123 nuevamente, el yodo-131, el indio-111, el flúor-19, el carbono-13, el nitrógeno-15, el oxígeno-17, el gadolinio, el manganeso o el hierro. Los radioisótopos se pueden incorporar en el conjugado de maneras conocidas como se describe, *por ejemplo*, en Reilly, "The radiochemistry of monoclonal antibodies and peptides," in *Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer*, R.M. Reilly, ed., Wiley, Hoboken N.J., 2010.

Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse o fusionarse de forma recombinante a un agente de diagnóstico, detectable o terapéutico o cualquier otra molécula. Los anticuerpos conjugados o fusionados de forma recombinante pueden ser útiles, por ejemplo, para controlar o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad mediada por beta klotho como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia particular.

Tal diagnóstico y detección se pueden lograr, por ejemplo, acoplado el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, pero no se limitan a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina y aequorina; material quimioluminiscente, tal como, pero no se limita a, un compuesto basado en acridinio o una HALOTAG; materiales radioactivos, tales como, pero no se limitan a, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, y ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, y ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, y ¹¹⁷Sn; y metales que emiten positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

También se proporcionan en esta invención anticuerpos de la presente invención que se conjugan o se fusionan de forma recombinante a un resto terapéutico (o uno o más restos terapéuticos), así como usos de los mismos. El anticuerpo puede conjugarse o fusionarse de forma recombinante a un resto terapéutico, incluyendo una citotoxina tal como un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo tal como emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células.

Además, un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse o fusionarse de forma recombinante a un resto terapéutico o resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. Los restos terapéuticos o restos farmacológicos no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón γ , interferón α , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, *por ejemplo*, TNF- γ , TNF- β , AIM I (véase, *por ejemplo*, la publicación internacional n.º WO 97/33899), AIM II (véase, *por ejemplo*, la publicación internacional n.º WO 97/34911), ligando de Fas (véase, *por ejemplo*, Takahashi y col., 1994, J. Immunol., 6:1567-1574), y VEGF (véase, *por ejemplo*, la publicación internacional n.º WO 99/23105), un agente antiangiogénico, incluyendo, por ejemplo, angiostatina, endostatina o un componente de la vía de coagulación (*por ejemplo*, factor tisular); o un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina (*por ejemplo*, interferón gamma, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-5 ("IL-5"), interleuquina-6 ("IL-6"), interleuquina-7 ("IL-7"), interleuquina 9 ("IL-9"), interleuquina-10 ("IL-10"), interleuquina-12 ("IL-12"), interleuquina-15 ("IL-15"), interleuquina-23 ("IL-23"), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (*por ejemplo*, la hormona del crecimiento ("GH")), o un agente de coagulación (*por ejemplo*, calcio, vitamina K, factores tisulares, tales como, pero no se limitan a, factor de Hageman (factor XII), quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína (PK), proteínas de coagulación factores II (protrombina), factor V, X, VIII, XIIIa, XI, Xla, IX, IXa, X, fosfolípidos y monómero de fibrina).

También se proporcionan en esta invención anticuerpos de la presente invención que se fusionan de forma recombinante o se conjugan químicamente (conjugaciones covalentes o no covalentes) con una proteína o polipéptido heterólogo (o un fragmento del mismo, por ejemplo, a un polipéptido de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90 o aproximadamente 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión, así como usos de las mismas. En particular, se proporcionan en esta invención proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención (*por ejemplo*, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, un dominio VH, una VH CDR, un dominio VL o una VL CDR) y una

proteína, polipéptido o péptido heterólogo. La proteína, el polipéptido o el péptido heterólogo al que se fusiona el anticuerpo puede ser útil para dirigir el anticuerpo a un tipo de célula particular, tal como una célula que expresa beta klotho o un receptor beta klotho. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a un receptor de superficie celular expresado por un tipo de célula particular (*por ejemplo*, una célula inmune) puede fusionarse o conjugarse con un anticuerpo modificado descrito en esta invención.

Además, un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con restos terapéuticos tales como un ion de metal radiactivo, tal como emisores alfa tal como ^{213}Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, que incluyen pero no se limitan a, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , con polipéptidos. El quelante macrocíclico puede ser ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Tales moléculas enlazadoras son conocidas comúnmente en la técnica y se describen, por ejemplo, en Denardo y col., 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson y col., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; y Zimmerman y col., 1999, Nucl. Medicina. Biol. 26(8):943-50.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse con secuencias de marcador o "etiqueta", tales como un péptido para facilitar la purificación. La secuencia de aminoácidos del marcador o etiqueta puede ser un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (*véase, por ejemplo*, QIAGEN, Inc.), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Por ejemplo, como se describe en Gentz y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86:821-824, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., 1984, Cell 37: 767), y la etiqueta "FLAG".

Los procedimientos para fusionar o conjugar restos terapéuticos (incluyendo polipéptidos) con anticuerpos son bien conocidos, (*véase, por ejemplo*, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" en, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col. (Eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson y coll. (Eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col. (Eds.), págs. 475-506 (1985); "analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col. (Eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), Thorpe y col., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58; las patentes de los EE. UU. n.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.723.125, 5.783.181, 5.908.626, 5.844.095 y 5.112.946; los documentos EP 307 434; EP 367 166; EP 394 827; las publicaciones PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 y WO 99/04813; Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88: 10535-10539, 1991; Traunecker y col., Nature, 331:84-86, 1988; Zheng y col., J. Immunol., 154:5590-5600, 1995; Vil y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89:11337-11341, 1992).

Las proteínas de fusión se pueden generar, por ejemplo, mediante las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominados colectivamente "barajado de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos anti-beta klotho como se describe en esta invención, incluyendo, por ejemplo, los anticuerpos con afinidades más altas y velocidades de disociación más bajas (*véase, por ejemplo*, las patentes de los EE. UU. N.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458; Patten y col., 1997, Curr. Opinión Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson y col., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313). Los anticuerpos, o los anticuerpos codificados, pueden alterarse al ser sometidos a mutagénesis aleatoria por RCP propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros procedimientos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo proporcionado en esta invención puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Un anticuerpo proporcionado de la presente invención también se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 4.676.980.

El resto terapéutico o el fármaco conjugado o fusionado de forma recombinante a un anticuerpo de la presente invención que se une a beta klotho (*por ejemplo*, un polipéptido beta klotho, fragmento, epítipo) debe elegirse para conseguir el(los) efectos profiláctico(s) o terapéutico(s) deseado(s). El anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado. Un médico u otro personal médico pueden considerar, por ejemplo, lo siguiente al decidir sobre qué resto terapéutico o fármaco conjugar o fusionar de forma recombinante a un anticuerpo proporcionado en esta invención: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, y el estado del sujeto.

Los anticuerpos que se unen a beta klotho como se proporciona en esta invención también se pueden unir a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos

incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del agente conjugado en la célula, pero los enlazadores no escindibles también se contemplan en esta invención. Los enlazadores para su uso en los conjugados de la presente descripción incluyen, sin limitación, enlazadores lábiles a ácidos (*por ejemplo*, enlazadores de hidrazona), enlazadores que contienen disulfuro, enlazadores sensibles a peptidasa (*por ejemplo*, enlazadores peptídicos que comprenden aminoácidos, por ejemplo, valina y/o citrulina tales como citrulina-valina o fenilalanina-lisina), enlazadores fotolábiles, enlazadores de dimetilo (véase, *por ejemplo*, Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); la patente de los EE. UU. n.º 5.208.020), enlazadores de tioéter o enlazadores hidrófilos diseñados para evadir la resistencia mediada por transportadores de múltiples fármacos (véase, *por ejemplo*, Kovtun y col., *Cancer Res.* 70: 2528-2537, 2010).

Los conjugados del anticuerpo y el agente se pueden fabricar utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 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). La presente descripción contempla además que los conjugados de anticuerpos y los agentes se pueden preparar usando cualquier procedimiento adecuado como se describe en la técnica, (véase, *por ejemplo*, en *Bioconjugate Techniques*, 2ª ed., GT Hermanson, ed., Elsevier, San Francisco, 2008).

Las estrategias de conjugación convencionales para anticuerpos y agentes se han basado en químicas de conjugación aleatorias que implican el grupo ε-amino de residuos de Lys o el grupo tiol de residuos de Cys, que da como resultado conjugados heterogéneos. Las técnicas recientemente desarrolladas permiten la conjugación de anticuerpos específicos del sitio, lo que resulta en una carga homogénea y evita las subpoblaciones conjugadas con unión a antígeno alterada o farmacocinética. Estos incluyen la ingeniería de "thiomabs" que comprende sustituciones de cisteína en las posiciones en las cadenas pesadas y ligeras que proporcionan grupos tiol reactivos y no interrumpen el plegamiento y el ensamblaje de inmunoglobulina ni alteran la unión al antígeno (véase, *por ejemplo*, Junutula y col., *J. Immunol. Meth.* 332: 41-52 (2008); Junutula y col., *Nat. Biotechnol.* 26: 925-932, 2008). En otro procedimiento, la selenocisteína se inserta de manera cotraduccional en una secuencia de anticuerpos recodificando el codón de parada UGA desde la terminación hasta la inserción de selenocisteína, lo que permite la conjugación covalente específica de sitio en el grupo de selenocisteína nucleófilo de selenol en presencia de los demás aminoácidos naturales (véase, *por ejemplo*, Hofer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 105: 12451-12456 (2008); Hofer y col., *Biochemistry* 48 (50): 12047-12057, 2009).

Formulaciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-beta klotho de la presente descripción se pueden administrar por cualquier vía apropiada para la afección a tratar. El anticuerpo se administrará típicamente por vía parenteral, por ejemplo, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural. La dosis de anticuerpo variará, incluyendo, dependiendo de la naturaleza y/o gravedad de la enfermedad, así como del estado del sujeto, pueden incluir dosis entre 1 mg y 100 mg. Las dosis también pueden incluir aquellas entre 1 mg/kg y 15 mg/kg. La dosis puede ser entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 7,5 mg/kg. La dosis puede ser de aproximadamente 5 mg/kg. La dosis puede ser de aproximadamente 7,5 mg/kg. Las dosis fijas seleccionadas de ente el grupo que consiste en: (a) 375-400 mg cada dos semanas y (b) 550-600 mg cada tres semanas. La dosis fija puede ser de 375-400 mg cada dos semanas. La dosis fija puede ser de 550-600 mg cada tres semanas. La dosis fija puede ser de 400 mg cada dos semanas. La dosis fija puede ser de 600 mg cada tres semanas. En el transcurso de la dosificación secuencial, una primera dosis y una segunda dosis pueden ser cada una de entre 1 mg/kg y 15 mg/kg con la segunda dosis después de la primera a las entre 1 y 4 semanas. La primera dosis y la segunda dosis pueden ser cada una entre 5 mg/kg y 7,5 mg/kg y la segunda dosis sigue a la primera dosis a las entre 2 y 3 semanas. La primera dosis y la segunda dosis pueden ser cada una de 5 mg/kg y la segunda dosis sigue a la primera dosis a las 2 semanas. La primera dosis y la segunda dosis pueden ser cada una de 7,5 mg/kg y la segunda dosis sigue a la primera dosis a las 3 semanas.

Para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, el anticuerpo puede administrarse mediante infusión intravenosa. La dosificación administrada por infusión está en el intervalo de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 10.000 µg/m² por dosis, en general, una dosis por semana durante un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el intervalo de dosificación es de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 1000 µg/m², de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 800 µg/m², de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 600 µg/m², de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 400 µg/m²; alternativamente, de aproximadamente 10 µg/m² a aproximadamente 500 µg/m², de aproximadamente 10 µg/m² a aproximadamente 300 µg/m², de aproximadamente 10 µg/m² a aproximadamente 200 µg/m², y de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 200 µg/m². La dosis se puede administrar una vez al día, una vez por semana, varias veces por semana, pero menos de una vez al día, varias veces al mes, pero menos de una vez al día, varias veces al mes, pero

menos de una vez a la semana, una vez al mes o de forma intermitente para mitigar o aliviar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. La administración puede continuar en cualquier de los intervalos descritos hasta la mejora de la enfermedad, trastorno o afección, o la mejora de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La administración puede continuar después de que se logra la remisión o alivio de los síntomas cuando dicha remisión o alivio se prolonga por tal administración continua.

En un aspecto, la presente descripción proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-beta klotho de la presente invención. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-beta klotho de la presente invención, y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10 Una formulación farmacéutica también puede comprender 1) un anticuerpo anti-beta klotho de la presente invención y/o un inmunoconjugado del mismo, y opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional.

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (véase, *por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980))
15 en forma de soluciones acuosas o formulaciones liofilizadas u otras formulaciones secas. Las formulaciones en esta invención también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-beta klotho, puede ser deseable incluir en la una formulación un anticuerpo adicional, *por ejemplo*, un segundo anticuerpo anti-beta klotho que se une a un epítipo diferente en el
20 polipéptido beta klotho, o un anticuerpo para alguna otra diana. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además otro agente, incluyendo, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal y/o cardioprotector. La formulación puede incluir un agente de alquilación (*por ejemplo*, clorambucilo, clorhidrato de bendamustina o ciclofosfamida) un nucleósido análogo
25 (*por ejemplo*, fludurabina, pentostatina, cladribina o citarabina) un corticosteroide (*por ejemplo*, prednisona, prednisolona o metilprednisolona), un agente inmunomodulador (*por ejemplo*, lenalidomida), un antibiótico (*por ejemplo*, doxorubicina, daunorrubicina idarubicina o mitoxentrona), una flavona sintética (*por ejemplo*, flavopiridol), un antagonista Bcl2, (*por ejemplo*, oblimersen o ABT-263), un agente de hipometilación (*por ejemplo*, azacitidina o decitabina), un inhibidor de FLT3 (*por ejemplo*, midostaurina, sorafenib y AC220). Tales moléculas están presentes
30 de forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el fin deseado.

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden formular en cualquier forma adecuada para la administración a una célula/tejido diana, *por ejemplo*, como microcápsulas o macroemulsiones (Remington Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980); Park y col, *Molecules* 10: 146-161 (2005); Malik y col., *Curr. Drug. Deliv.* 4: 141-151
35 (2007)); como formulaciones de liberación sostenida (Putney y Burke, *Nature Biotechnol.* 16: 153-157, (1998)) o en liposomas (Maclean y col., *Int. J. Oncol.* 11: 235-332 (1997); Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8: 39-45 (2006)).

Un anticuerpo proporcionado en esta invención también puede quedar atrapado en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o
40 microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo que se une a beta klotho como se describe en esta invención), que incluyen, pero no se limita a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, *por ejemplo*, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Un agente profiláctico o
50 terapéutico, o una composición descrita en esta invención se puede suministrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase, *por ejemplo*, Langer, supra; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald y col., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek y col., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). Los materiales poliméricos se pueden usar para lograr la liberación controlada o sostenida de un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo que se une a beta klotho como se describe en esta invención) o una composición de la invención (véase, *por ejemplo*, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véase también Levy y col., 1985, *Science* 228:190; During y col., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard y col., 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); la patente de los EE. UU. n.º 5.679.377; la patente de los EE. UU. n.º 5.916.597; la patente de los EE. UU. n.º 5.912.015; la patente de los EE. UU. n.º 5.989.463; la patente de los EE. UU. n.º 5.128.326; la publicación PCT n.º WO 99/15154; y la publicación PCT n.º WO 99/20253).

Los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. El polímero usado en una formulación de liberación sostenida puede ser inerte, libre de impurezas lixiviables, estable al almacenamiento, estéril y biodegradable.

Se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida cerca de la diana terapéutica, por ejemplo, las fosas nasales o los pulmones, lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se analizan, por ejemplo, en Langer (Science 249:1527-1533 (1990)). Cualquier técnica conocida para un experto en la materia puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos que se unen a beta klotho como se describe en esta invención. (Véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, la publicación PCT WO 96/20698, Ning y col., 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song y col., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Tecnología 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 y Lam y col., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760).

Procedimientos terapéuticos

Un anticuerpo de la presente descripción puede utilizarse, por ejemplo, en procedimientos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En un aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos para su uso en procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección, ya sea *in vivo* o *in vitro*, comprendiendo el procedimiento exponer una célula a un anticuerpo anti-beta klotho.

En un aspecto, un anticuerpo de la presente descripción se usa para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección, incluyendo, por ejemplo, diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico o, en general, cualquier enfermedad, trastorno, o afección en la que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos para su uso en procedimientos para tratar una enfermedad, trastorno o afección que comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-beta klotho o fragmento del mismo. El uso de un anticuerpo en un procedimiento para tratar una enfermedad, trastorno, o afección comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-beta klotho de la presente invención y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, tal como los descritos en esta invención.

Un anticuerpo anti-beta klotho o fragmento del mismo se puede administrar a un ser humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-beta klotho o fragmento del mismo se puede administrar a un mamífero no humano que expresa beta klotho con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (*por ejemplo*, un primate, cerdo, rata o ratón) con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la presente descripción (*por ejemplo*, pruebas de dosis y ciclos de administración en el tiempo).

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo anti-beta klotho de la presente invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En algunas realizaciones, el compuesto adicional es un anticuerpo terapéutico distinto de un anticuerpo anti-beta klotho.

Tales terapias de combinación mencionadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos están incluidos en las mismas formulaciones o por separado), y la administración separada, en cuyo caso, puede producirse la administración de un anticuerpo anti-beta klotho o fragmento del mismo de la presente descripción antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos de la presente descripción también se pueden usar en combinación con regímenes terapéuticos adicionales, incluyendo, sin limitación, los descritos en esta invención.

Se puede administrar un anticuerpo de la presente descripción (y cualquier agente terapéutico adicional o adyuvante) por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, 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. Además, el anticuerpo o el conjugado se administra adecuadamente mediante infusión de pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo o fragmento del mismo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Los anticuerpos de la presente descripción se formularían, dosificarían y administrarían de manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los facultativos médicos. El anticuerpo anti-beta klotho no necesita, pero está formulado opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Por lo general, estos se utilizan en las mismas dosificaciones y mediante las vías de administración descritas en esta invención, o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosificaciones descritas en esta invención, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía empíricamente/clínicamente determinada como adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, la dosis adecuada de un anticuerpo anti-beta klotho de la presente descripción (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos, tales como los agentes descritos en esta invención) dependerá del tipo de enfermedad, trastorno o afección a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, trastorno o afección, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico y la respuesta del paciente al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo anti-beta klotho se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (*por ejemplo*, 0,1 mg/kg-20 mg/kg, 1 mg/kg-15 mg/kg, etc.) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede 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 generalmente hasta que se produzca la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Las dosis ejemplares del anticuerpo pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10,0 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg o 10,0 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo pueden administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse de forma intermitente, *por ejemplo*, cada semana o cada tres semanas (*por ejemplo*, de 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. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial, seguida de una dosis de mantenimiento (*por ejemplo*, semanal) del anticuerpo. La dosis de carga inicial puede ser mayor que la dosis de mantenimiento. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Procedimientos de diagnóstico y procedimientos de detección

En un aspecto, los anticuerpos anti-beta klotho y fragmentos de los mismos de la presente descripción son útiles para detectar la presencia de beta klotho en una muestra biológica. Tales anticuerpos anti-beta klotho pueden incluir aquellos que se unen a beta klotho humano y/o cyno, pero no inducen señalización de tipo FGF19 y/o actividad de señalización de tipo FGF21. El término "detectar" como se usa en esta invención abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una muestra biológica puede comprender una célula o tejido.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para detectar la presencia de beta klotho en una muestra biológica. El procedimiento puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-beta klotho en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-beta klotho a beta klotho, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-beta klotho y beta klotho.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión de beta klotho. El procedimiento puede comprender poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-beta klotho; determinar el nivel de expresión (cuantitativa o cualitativamente) de beta klotho por la célula de prueba mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-beta klotho a beta klotho; y comparar el nivel de expresión de beta klotho por la célula de prueba con el nivel de expresión de beta klotho por una célula de control (*por ejemplo*, una célula normal del mismo origen de tejido que la célula de prueba o una célula que expresa beta

- klotho a niveles comparables a tal célula normal), donde un mayor nivel de expresión de beta klotho por la célula de prueba en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con una mayor expresión de beta klotho. La célula de prueba se puede obtener de un individuo sospechoso de tener una enfermedad, trastorno o afección asociado con la expresión de beta klotho y/o una enfermedad, trastorno o afección en el que es deseable imitar o aumentar los efectos *in vivo* de FGF19 y/o FGF21. La enfermedad, trastorno o afección puede ser, por ejemplo, diabetes tipo 2, obesidad, dislipidemia, NASH, enfermedad cardiovascular o síndrome metabólico. Tales enfermedades, trastornos o afecciones ejemplares se pueden diagnosticar usando un anticuerpo anti-beta klotho de la presente descripción.
- 10 Un procedimiento de diagnóstico o detección, tales como los descritos anteriormente, puede comprender detectar la unión de un anticuerpo anti-beta klotho a beta klotho expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que expresa beta klotho en su superficie. El procedimiento puede comprender poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-beta klotho en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-beta klotho a beta klotho, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-beta klotho y beta klotho en la superficie de la célula. Un ensayo ejemplar para detectar la unión de un anticuerpo anti-beta klotho a beta klotho expresado beta klotho en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Se pueden utilizar otros procedimientos para detectar la unión de los anticuerpos anti-beta klotho a beta klotho. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la técnica, tales como Western blot, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

Anticuerpos anti-beta klotho marcados Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes, y marcadores 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 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , and ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, *por ejemplo*, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasa heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Anticuerpos anti-beta klotho inmovilizados en una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-beta klotho de cualquier beta klotho que permanezca libre en solución. Esto se logra convencionalmente al insolubilizar el anticuerpo anti-beta klotho antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (véase, *por ejemplo*, Bennich y col., el documento US 3.720.760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación de glutaraldehído), o insolubilizando el anticuerpo anti-beta klotho después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-beta klotho y beta klotho, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

Cualquiera de los procedimientos de diagnóstico o detección descritos anteriormente se puede llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la presente descripción en lugar de o además de un anticuerpo anti-beta klotho.

Ensayos

Los anticuerpos anti-beta klotho de la presente descripción pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de actividad

En un aspecto, se describen ensayos para identificar anticuerpos anti-beta klotho de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, los ensayos que miden los efectos sobre la glucosa y/o el metabolismo de los lípidos. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de glucosa en sangre. La glucosa en sangre (*por ejemplo*, en el recorte de la cola del ratón o en una muestra de sangre humana) se puede medir utilizando las tiras reactivas ACCU-CHEK Active leídas por el medidor activo ACCU-CHEK (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, por ejemplo, se puede usar un ensayo de perfil de lípidos. La sangre entera (por ejemplo, de los recortes de la cola del ratón o de una muestra de sangre humana) puede recogerse en tubos capilares simples (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickenson y Co. Sparks, MD). El suero y las células de

sangre se pueden separar haciendo girar los tubos en un Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson y Co. Sparks, MD). Las muestras de suero se pueden analizar para determinar el perfil de lípidos (triglicéridos, colesterol total, HDL, y no HDL) utilizando el analizador clínico Integra 400 (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5

2. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo anti-beta klotho se prueba para determinar su actividad de unión al antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo anti-beta klotho se puede probar para determinar su capacidad para unirse a beta klotho exógeno o endógeno expresado en la superficie de una célula. Se puede utilizar un ensayo FACS para tales pruebas.

10

Se puede agrupar un panel de anticuerpos monoclonales generados contra beta klotho basándose en los epítomos que reconocen, un procedimiento conocido como unión de epítomos. La unión de epítomos se lleva a cabo típicamente mediante ensayos de competencia, que evalúan la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno en presencia de otro anticuerpo. En un ensayo de competencia ejemplar, el beta klotho inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a beta klotho y un segundo anticuerpo no marcado que se está probando para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo para unirse al beta klotho. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, el beta klotho inmovilizado se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a beta klotho, se elimina el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con beta klotho inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con beta klotho inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, a continuación eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para unirse a beta klotho. El beta klotho inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa beta klotho en su superficie.

15

20

25

Los procedimientos de alto rendimiento de unión de epítomos también se conocen en la técnica (véase, *por ejemplo*, Jia y col., J. Immunol. Methods 2004, 288(1-2):91-98, que describe un procedimiento de unión competitiva y multiplexada de anticuerpos para la caracterización de anticuerpos monoclonales; y Miller y col., J. Immunol. Methods 2011, 365(1-2):118-25, que describe la unión de epítomos de anticuerpos monoclonales murinos mediante un ensayo de apareamiento multiplexado).

30

3. Mapeo de epítomos

El "mapeo de epítomos" es el procedimiento de identificar los sitios de unión, o epítomos, de un anticuerpo en su antígeno diana. Los epítomos de anticuerpos pueden ser epítomos lineales o epítomos conformacionales. Los epítomos lineales están formados por una secuencia continua de aminoácidos en una proteína. Los epítomos conformacionales están formados por aminoácidos que son discontinuos en la secuencia de la proteína, pero que se unen tras el plegado de la proteína en su estructura tridimensional.

35

40

Se conoce una diversidad de procedimientos en la técnica para mapear epítomos de anticuerpos en antígenos proteicos diana. Estos incluyen procedimientos de mutagénesis, procedimientos de exploración de péptidos, procedimientos de visualización, procedimientos de espectroscopía de masas y participación, y determinación estructural.

45

El procedimiento de mutagénesis dirigida a sitio implica la mutagénesis dirigida al sitio dirigido donde los aminoácidos críticos se identifican mediante la introducción sistemática de sustituciones a lo largo de la secuencia de la proteína y a continuación determinando los efectos de cada sustitución en la unión del anticuerpo. Esto puede hacer mediante "mutagénesis de exploración de alanina", como se describe, por ejemplo, por Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de residuos de aminoácidos en beta klotho humano. Sin embargo, los estudios de mutagénesis, también pueden poner de manifiesto residuos de aminoácidos que son cruciales para la estructura tridimensional general de beta klotho, pero que no están directamente involucrados en los contactos anticuerpo-antígeno, y por lo tanto, pueden ser necesarios otros procedimientos para confirmar un epítomo funcional determinado utilizando este procedimiento.

50

55

El mapeo de mutagénesis con escopeta utiliza una biblioteca exhaustiva de mutación de plásmidos para el gen diana, con cada clon en la biblioteca portando una mutación de aminoácidos única e incluyendo la biblioteca completa cada aminoácido en la proteína diana. Los clones que constituyen la biblioteca de mutación se disponen individualmente en microplacas, se expresan dentro de las células de mamíferos vivos, y se prueban para determinar su inmunorreactividad con anticuerpos de interés. Los aminoácidos críticos para los epítomos de anticuerpos se identifican por una pérdida de reactividad y a continuación se mapean en una estructura de proteína para visualizar los epítomos.

60

Al automatizar el análisis, se pueden derivar nuevos mapas de epítopenos días o semanas. Debido a que utiliza la estructura nativa de las proteínas dentro de las células de mamíferos, la técnica permite mapear estructuras de epítopenos lineales y conformacionales en proteínas complejas. (Véase, *por ejemplo*, Paes y col., J. Am. Chem. Soc. 131 (20): 6952-6954 (2009); Banik y Doranz, Genetic Engineering and Biotechnology News 3 (2): 25-28 (2010)).

5

El epítopeno unido por un anticuerpo anti-beta klotho también se puede determinar usando procedimientos de exploración de péptidos. En la exploración de péptidos, las bibliotecas de secuencias de péptidos cortas a partir de segmentos superpuestos de la proteína diana, beta klotho, se prueban para determinar su capacidad para unir anticuerpos de interés. Los péptidos se sintetizan y se criban para la unión, por ejemplo, usando ELISA o BIACORE, o en un chip, por cualquiera de los múltiples procedimientos para el cribado en fase sólida (véase, *por ejemplo*, Reineke y col., Curr. Opin. Biotechnol. 12: 59-64, 2001) como en la metodología "Pepscan" (véase, *por ejemplo*, los documentos WO 84/03564; WO 93/09872). Tales procedimientos de cribado de péptidos pueden no ser capaces de detectar algunos epítopenos funcionales discontinuos, es decir, epítopenos funcionales que involucran residuos de aminoácidos que no son contiguos a lo largo de la secuencia primaria de la cadena de polipéptido beta klotho.

10

15

Se puede utilizar una tecnología desarrollada recientemente denominada CLIPS (enlace químico de péptidos en andamios) para mapear epítopenos conformacionales. Los extremos sueltos de los péptidos se fijan en andamios sintéticos, de modo que el péptido andamiado pueda adoptar la misma estructura espacial que la secuencia correspondiente en la proteína intacta. La tecnología CLIPS se utiliza para fijar péptidos lineales en estructuras cíclicas (formato de 'bucle único'), y para unir diferentes partes de un sitio de unión a proteínas (formato de 'bucle doble', 'bucle triple', etc.), para crear epítopenos conformacionales que puedan analizarse para determinar la unión de anticuerpos (véase, *por ejemplo*, la patente de los EE. UU. n.º 7.972.993).

20

Los epítopenos unidos por anticuerpos de la presente descripción también se pueden mapear usando técnicas de visualización, incluyendo, por ejemplo, presentación en fagos, presentación microbiana, y presentación de ribosomas/ARNm como se describió anteriormente. En estos procedimientos, las bibliotecas de fragmentos de péptidos se muestran en la superficie del fago o célula. A continuación, los epítopenos se mapean mediante el cribado de mAbs contra estos fragmentos usando ensayos de unión selectivos. Se han desarrollado una serie de herramientas computacionales que permiten la predicción de epítopenos conformacionales basados en péptidos lineales seleccionados por afinidad obtenidos mediante presentación en fagos (véase, *por ejemplo* Mayrose y col., Bioinformatics 23: 3244-3246 2007). Los procedimientos también están disponibles para la detección de epítopenos conformacionales mediante la presentación en fagos. Los sistemas de presentación microbiana también se pueden utilizar para expresar fragmentos antigénicos plegados adecuadamente en la superficie celular para la identificación de epítopenos conformacionales (véase, *por ejemplo*, Cochran y col., J. Immunol. Meth. 287: 147-158, 2004; Rockberg y col., Nature Methods 5: 1039-1045, 2008).

30

35

Los procedimientos que implican la proteólisis y espectroscopía de masas también se pueden usar para determinar epítopenos de anticuerpos (véase, *por ejemplo* Baerga-Ortiz y col., Protein Sci. 2002 junio; 11 (6): 1300-1308). En la proteólisis limitada, el antígeno se escinde por diferentes proteasas, en presencia y en ausencia del anticuerpo, y los fragmentos se identifican por espectrometría de masas. El epítopeno es la región del antígeno que se protege contra la proteólisis tras la unión del anticuerpo (véase, *por ejemplo*, Suckau y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87:9848-9852, 1990). Los procedimientos adicionales basados en la proteólisis incluyen, por ejemplo, modificación química selectiva (véase, *por ejemplo*, Fiedler y coll, Bioconjugate Chemistry 1998, 9 (2): 236-234, 1998), escisión del epítopeno (véase, *por ejemplo*, Van de Water y col., Clin. Immunol. Immunopathol. 1997, 85 (3): 229-235, 1997), y el procedimiento recientemente desarrollado de intercambio de hidrógeno-deuterio (H/D) (véase, *por ejemplo*, Flanagan, N., Genetic Engineering and Biotechnology News 3 (2): 25-28, 2010).

40

45

El epítopeno unido por los anticuerpos de la presente descripción también se puede determinar por procedimientos estructurales, tales como determinación de la estructura cristalina por rayos X (véase, *por ejemplo*, el documento WO 2005/044853), modelado molecular y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo la determinación de RMN de las velocidades de intercambio de H-D de hidrógenos de amida lábiles cuando está libre y cuando se une en un complejo con un anticuerpo de interés (véase, *por ejemplo*, Zinn-Justin y col. (1992) Biochemistry 31:11335-11347; Zinn-Justin y col. (1993) Biochemistry 32:6884-6891).

50

55

Se pueden obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítopeno que un anticuerpo de la presente descripción, por ejemplo, mediante el cribado de anticuerpos generados contra beta klotho para la unión al epítopeno, por inmunización de un animal con un péptido que comprende un fragmento de beta klotho humano que comprende la secuencia del epítopeno, o mediante la selección de anticuerpos usando la presentación en fagos para la unión a la secuencia del epítopeno. Se podría esperar que los anticuerpos que se unen al mismo epítopeno funcional muestren actividades biológicas similares, tal como el bloqueo de una actividad biológica de beta klotho, y tales actividades pueden confirmarse mediante ensayos funcionales de los anticuerpos.

60

Ensayos de actividad adicionales

Un anticuerpo anti-beta klotho de la presente descripción puede ser un anticuerpo antagonista que inhibe una actividad biológica de beta klotho. Los anticuerpos anti-beta klotho de la presente descripción pueden analizarse para determinar si inhiben una actividad biológica de beta klotho.

En un aspecto, los anticuerpos anti-beta klotho purificados se pueden caracterizar además por una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de exclusión de tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión de papaína.

La presente descripción contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Las actividades Fc del anticuerpo pueden medirse para asegurar que solo se mantengan las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* e/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente no tenga actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el descrito en Clynes y col., PNAS (EE.UU) 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, por lo tanto, carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo, Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). La unión a FcRn y las determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* también se pueden realizar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

30 EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la presente descripción.

EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS QUE SE UNEN A BETA KLOTHO

Los anticuerpos que se unen a beta klotho se generaron, por ejemplo, mediante inmunizaciones de ratones (i) con células que expresan beta klotho humano (HuKLB) y el receptor FGF 1c (FGFR1c o RIC) y (ii) con HuKLB y proteína beta klotho cinomóloga (KLB cyno).

Por ejemplo, las células que expresan beta klotho se prepararon como sigue. Las células 293EXPI (Invitrogen) se cotransfectaron transitoriamente con secuencias de ácido nucleico que codifican una variante de FGFR1c con una mutación en la posición de aminoácido 623 (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO:308 pero con una mutación D623N) y HuKLB (SEQ ID NO:297). Las células se analizaron para la expresión de R1c y HuKLB por los respectivos anticuerpos específicos por FACS. Las células se lavaron 2 veces en PBS, se sedimentaron por centrifugación y se congelaron en viales individuales en 6×10^7 células para la inmunización. 129/B6 animales fueron inmunizados con 1×10^7 células con adyuvantes (Ribi, CpG, y PolyLC). Los animales fueron estimulados cada 2 semanas durante el tiempo necesario para inducir un título adecuado. Los animales se estimularon con la proteína HuKLB y CyKLB después de 4 estímulos con células R1c y HuKLB que sobreexpresan células 293EXPI. Los títulos se determinaron por ELISA y FACS. Se obtuvieron suspensiones de células individuales de linfocitos a partir de bazo y drenaje de ganglios linfáticos de animales con títulos adecuados. Las células se fusionaron con células de mieloma SP2/0 en una proporción de 1:2 por electrofusión. Las células fusionadas se colocaron en placas a $2,5 \times 10^6$ células por placa en 70 µl en placas de veinticuatro x 384 pocillos en presencia de selección HAT. Después de 7 días, se retiraron 50 µl de sobrenadante y se reemplazaron con medio fresco que contenía HAT. Después de 10-14 días de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a cribado por FACS utilizando células R1c y HuKLB que sobreexpresan células 293EXPI o por Biacore utilizando proteína HuKLB para confirmar la unión. Los clones positivos se seleccionaron adicionalmente y se sometieron a subclonación.

En una primera campaña de inmunizaciones y fusiones, se cribaron al menos 25-30 placas de 384 pocillos para la unión a HuKLB (por ejemplo, proteína HuKLB y/o células que expresan HuKLB). En una segunda campaña para las inmunizaciones y fusiones, se cribó un número similar de placas como se describe para la primera campaña. Se cribaron miles de clones y se seleccionaron cientos de clones para el estudio adicional, incluyendo en los ensayos de

unión, la afinidad y especificidad del epítipo como se describe en los ejemplos 2 y 3. Cientos de sobrenadantes de hibridoma también se probaron en ensayos funcionales como se describe, en los ejemplos 4 y 5, incluyendo una actividad agonista similar a los ligandos del receptor de FGF FGF19 y/o FGF21 (*por ejemplo*, actividad de señalización de tipo FGF19 y/o FGF21).

5

EJEMPLO 2: CRIBADO Y SELECCIÓN DE ANTICUERPOS QUE SE UNEN A BETA KLOTHO

Los anticuerpos que se unen a beta klotho se generaron a partir de hibridomas, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para la unión a beta klotho (*por ejemplo*, a beta klotho humano y/o cyno) en ensayos basados en FACS y/o Biacore.

10

Por ejemplo, después de 2 semanas de cultivo, los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para detectar anticuerpos monoclonales que se unen a beta klotho humano mediante una pantalla de unión basada en FACS. Brevemente, los sobrenadantes de hibridoma se incubaron conjuntamente con células que sobreexpresan beta klotho humano durante 15 30 minutos a 4 °C. Después de lavar con PBS/BSA al 1%/azida al 0,1 %, las células que sobreexpresan beta klotho humano se incubaron conjuntamente con Fc anti-ratón marcado (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar con PBS/BSA al 1%/azida al 0,1 %, las células se adquirieron en un citómetro de flujo (FACS Calibur) y se analizaron mediante software de análisis de citometría de (FlowJo). Un anticuerpo de unión es aquel que muestra un cambio de las células incubadas con Fc anti-ratón marcado solamente.

20

Por ejemplo, después de 2 semanas de cultivo, los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para detectar anticuerpos monoclonales que se unen a beta klotho humano mediante una pantalla de unión basada en Biacore. Brevemente, el anticuerpo Fc anti-ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se inmovilizó en las cuatro células de flujo de un chip CM5 utilizando reactivos de acoplamiento de amina (GE Healthcare LifeSciences, Piscataway, NJ). Los sobrenadantes de 25 hibridoma se diluyeron tres veces con tampón PBS-P (PBS que contiene P20 al 0,005 %) y se inyectaron durante 30 segundos en las células de flujo 2,3 y 4 para capturar el anticuerpo (la célula de flujo 1 se usó como referencia). Esto fue seguido por una inyección corta de beta klotho humano (25 nM, R & D Systems, Mineápolis, MN) durante 60 segundos a una velocidad de flujo de 30 µl/min para probar la unión al anticuerpo capturado en cada célula de flujo.

A partir de dos campañas de inmunización y fusión como se describe en el ejemplo 1, se analizaron cincuenta y seis placas de 384 pocillos de sobrenadantes de hibridoma para la unión por FACS y/o Biacore. De estos ensayos, aproximadamente 250 anticuerpos se identificaron como aglutinantes de beta klotho humano. Estos anticuerpos se purificaron y posteriormente se probaron para determinar su afinidad de unión a beta klotho humano y beta klotho cyno por Biacore y para determinar su actividad funcional por ensayos de reportero como se describe en el ejemplo 3.

35

En los ensayos adicionales de unión/cribado basados en Biacore, se midió la afinidad de unión de los anticuerpos a beta klotho humano y cyno. Por ejemplo, los anticuerpos se ordenaron en rango en función de su afinidad de unión a beta klotho humano y beta klotho cyno por medición a baja resolución de K_D por Biacore. Brevemente, el anticuerpo Fc anti-ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se inmovilizó en las cuatro células de flujo de un chip CM5 utilizando 40 reactivos de acoplamiento de amina (GE Healthcare LifeSciences, Piscataway, NJ). Los anticuerpos purificados se capturaron (~100 RUS) en las células de flujo 2, 3 y 4 utilizando la célula de flujo 1 como referencia. Esto fue seguido por la inyección de beta klotho humano o cyno (25 nM en tampón PBS-P) a una velocidad de flujo de 70 µl/min y el seguimiento de la cinética de unión a 25 °C.

Las mediciones de afinidad de unión también se realizaron en ensayos adicionales basados en Biacore. Por ejemplo, se llevaron a cabo mediciones de la constante de disociación de equilibrio de (K_D) con anticuerpos purificados para evaluar su unión a beta klotho humano y beta klotho cyno. Como se mencionó anteriormente, el anticuerpo Fc anti-ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se inmovilizó en las cuatro células de flujo de un chip CM5 utilizando reactivos de 45 acoplamiento de amina (GE Healthcare LifeSciences, Piscataway, NJ). Los anticuerpos purificados se capturaron (~100 RUS) en las células de flujo 2, 3 y 4 utilizando la célula de flujo 1 como referencia. Esto fue seguido por la inyección de diferentes concentraciones de beta klotho humano o cyno (de 1,56 nM a 25 nM, diluciones dobles en 50 tampón PBS-P) a una velocidad de flujo de 70 µl/min y la cinética de unión se evaluó a 25 °C.

Los resultados representativos se presentan como valores de K_D (nM) como se muestra en la tabla 11 a continuación.

55

Tabla 11

KD de afinidad (nM)		
	HuKLB	KLB cyno
5H23	~pM	0,72

	KD de afinidad (nM)	
	HuKLB	KLB cyno
1C17	0,89	3,1
1D19	1,25	2,9
2L12	0,22	1,42
3L3	1,14	2,2
3N20	3,3	3,52
4P5	0,26	0,44
5F7	1,7	2,5
1G19	N/A	N/A
5C23	1,2	2,4

EJEMPLO 3: CRIBADO Y SELECCIÓN DE ANTICUERPOS QUE SE UNEN A BETA KLOTHO

5 Los anticuerpos que se seleccionaron para unirse a beta klotho, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 2, se evaluaron en ensayos de unión de competencia y experimentos de unión de epítomos.

Por ejemplo, para ensayos de unión competitiva mediante análisis FACS, se prepararon los estándares de anticuerpos que se conjugaron con un fluorocromo usando el kit de marcado de anticuerpos A488 o A647 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó un título de dosis del estándar de anticuerpo conjugado usando células que sobreexpresan HuKLB. El nivel estable de la señal máxima de la unión del anticuerpo es CE=100 y la señal de fondo es CE=0. La competencia por FACS contra el anticuerpo marcado con fluorocromo se realizó incubando previamente las células que sobreexpresaban HuKLB con sobrenadantes de hibridoma durante 15 minutos a temperatura ambiente. Sin lavar, se añadió una concentración de CE = 10 de anticuerpo estándar marcado con A488 o A647. La CE = 10 para un anticuerpo individual se determinó mediante el 10 % de la señal usando la señal máxima como (100 %) y la señal de fondo como (0 %). Después de 30 minutos a 4 °C, las células se lavaron y se analizaron por FACS. En estos ensayos, un anticuerpo competidor es aquel que muestra una señal comparable a la competencia por 5H23. Un anticuerpo no competidor es aquel que muestra una señal igual al anticuerpo marcado solo. Un anticuerpo competidor parcial es una muestra que muestra la señal entre el anticuerpo marcado solo y el fondo. Los anticuerpos que muestran una competencia completa contra el mismo estándar de anticuerpos se considera que están en el mismo contenedor.

En experimentos de unión competitiva ejemplares por FACS, se usó el anticuerpo 5H23 o 3I13 como un estándar de anticuerpo para un control positivo (anticuerpo competidor) o un control negativo (anticuerpo no competidor), respectivamente. Los resultados representativos se muestran en la tabla 12 a continuación presentada como intensidad media de fluorescencia (IMF). Para estos experimentos, la señal comparable al anticuerpo marcado solo es un anticuerpo no competidor, mientras que la señal comparable a la competencia por 5H23 es un anticuerpo competidor.

Tabla 12

Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (IMF)	
	5H23 - Alexa647	3I13 - Alexa488
5H23	2,3	29,8
1C17	2,4	26,7
1D19	2,5	30,6
2L12	3,1	30,9
3L3	4,2	28,7
3N20	2,4	30,5
4P5	2,4	30,1
5C23	2,4	29,3
5F7	2,3	28,5

Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (IMF)	
	5H23 - Alexa647	3I13 - Alexa488
1G19	2,2	29,0
3I13	9,4	7,4
Anticuerpo marcado solo	10,8	32,4

- Para evaluar aún más los sitios de unión de los anticuerpos en beta klotho humano, también se realizaron experimentos de competencia en el Biacore. Por ejemplo, dos anticuerpos se inmovilizaron en dos células de flujo de un chip CM5. Los complejos anticuerpo-beta klotho humano se prepararon con diferentes anticuerpos (la concentración de anticuerpo se tituló de 0,1-50 nM mientras se mantiene constante la concentración de beta klotho a 5 nM) en una microplaca de 96 pocillos y se inyectó en las superficies de los anticuerpos. La señal medida (Unidad de Respuesta, UR) se representó frente a la concentración de anticuerpo en solución [nM]. Si el anticuerpo en solución reconocía el mismo epítipo que el anticuerpo inmovilizado en la superficie del chip, a continuación, se observaba una disminución de UR con un aumento de la concentración de anticuerpo en solución (que demuestra la competencia por el sitio de unión en beta klotho). Sin embargo, si el anticuerpo en solución reconocía un epítipo distinto en relación con el anticuerpo inmovilizado, se observaba un aumento en UR. En este último escenario, el complejo klotho-anticuerpo podría unirse a la superficie del anticuerpo inmovilizado que conduce al aumento observado en la señal.
- 15 En experimentos de unión de competencia ejemplares de Biacore, el anticuerpo 5H23 competía consigo mismo para unirse a HuKLB y los anticuerpos adicionales 1C17, 1D19, 2L12, 3L3, 3N20, 4P5, 5C23, 5F7 y 1G19 compitieron con 5H23. Estos anticuerpos fueron designados como miembros del contenedor de epítipo 5H23. Las secuencias para estos anticuerpos relacionados con el epítipo se alinean y se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 2 también muestra secuencias de aminoácidos conservadas de las CDR de estos anticuerpos relacionados.

20 EJEMPLO 4: ENSAYOS FUNCIONALES

- Los anticuerpos que se unen a beta klotho generados, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1, se probaron para determinar su actividad funcional en ensayos de reportero basados en células.
- 25 Por ejemplo, los ensayos de reportero de ELK1-luciferasa, que miden la señalización de FGFR1c/beta klotho, se realizaron utilizando células HEK293, HEK293T o L6 transfectadas transitoriamente (ATCC). Los plásmidos de transfección consistían en dos plásmidos reporteros Gal4-Elk1 y 5xUAS-Luc (sistema de reportero trans de Agilent Technologies PathDetect Elk1 Cat n.º 219005), y los plásmidos que codifican beta klotho humano (GeneCopeia cat n.º EX-E1104-MO2) o beta klotho de mono cynomolgus (beta cloto cyno) y FGFR1c humano cCat n.º GeneCopeia EX-A0260-MO2). En estos ensayos, la activación del complejo receptor FGFR1c/beta klotho expresado de forma recombinante en las células induce la transducción de la señalización intracelular, que conduce a ERK y a continuación a la fosforilación Elk1. Una vez que Gal4-Elk1 se fosforila, Gal4-Elk1 se une a la región promotora 5 x UAS y activa la transcripción del gen reportero de luciferasa. La actividad de luciferasa se mide a continuación, en ensayos 35 enzimáticos de la luciferasa.

- Para estos experimentos, los cuatro plásmidos mencionados anteriormente (*por ejemplo*, 2 plásmidos reporteros, beta Klotho, R1c) se transfectaron en células recién recogidas en suspensión utilizando FuGene6 o reactivo de transfección Fugene HD (Promega). La densidad celular y la cantidad de reactivo de transfección se optimizaron para cada tipo de célula y cada lote Fugene. La relación beta klotho y ADN FGFR1c en la transfección se optimizó para cada línea celular y varió entre 6:1 y 27:1. Las células transfectadas se sembraron en una placa de 96 pocillos (30.000 células/100 µl/pocillo), o en una placa de 384 pocillos (7500 células/25 µl/pocillo) en medio de crecimiento normal. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se añadió una diversidad de anticuerpos que se unen a beta klotho. Después de 6 horas de incubación a 37 °C con los anticuerpos, se añadió un volumen igual de reactivo Bright-Glo (Promega) y se leyó la señal de luminiscencia utilizando el lector Enspire (Perkin Elmer).

Los resultados representativos utilizando beta klotho humano y beta klotho cyno, transfectados en células HEK 293, se presentan como valores de CE50 como se muestra en la tabla 13 y la tabla 14, respectivamente, a continuación.

50

Tabla 13

	Experimento - A	Experimento - B
mAb	Ensayo de reportero HEK293 huKLB/R1c CE50 (pM)	Ensayo de reportero HEK293 huKLB/R1c CE50 (pM)
control*	45,3	27,9
5H23	102	34,2
1D19	620	
2L12	373	
3L3	773	
3N20	527	
4P5	600	78,3
1G19	231	127

* El mAb de control comprende la SEQ ID NO:358 y la SEQ ID NO:360

Tabla 14

	Experimento - A	Experimento - B
mAb	Ensayo de reportero HEK293 cynoKLB/R1c CE50 (pM)	Ensayo de reportero HEK293 cynoKLB/R1c CE50 (pM)
control*	108 178	227
5H23	165	218
1D19		954
2L12	260	410
3L3	3576	1672
3N20	2464	>10000
4P5	347	465
1G19	2354	2447

* El mAb de control comprende la SEQ ID NO:358 y la SEQ ID NO:360

5

Los resultados representativos usando beta klotho humano, transfectado en células L6, se presentan como valores de CE50 como se muestra en la tabla 15 a continuación.

Tabla 15

mAb	Ensayo de reportero L6 huKLB/R1c CE50 (pM)	Ensayo de reportero L6 huKLB/R2c CE50 (pM)	Ensayo de reportero L6 huKLB/R3c CE50 (pM)	Ensayo de reportero L6 huKLB/R4 CE50 (pM)
control	FGF19: 2,66	FGF19: 0,16	FGF19: 2,1	FGF19: 0,05
5H23	0,28	>67	>67	>67
2L12	4,65	>67	>67	>67
4P5	0,39	>67	>67	>67

10

Las células L6 carecen de receptores endógenos y, a menudo se utilizan para investigar la especificidad del anticuerpo para diversos subtipos de receptores de FGF transfectados. La activación del receptor a través de la señalización de FGFR1c/beta klotho en ausencia de ligando (*por ejemplo*, FGF19 (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:304) o FGF21 (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:429)) por los anticuerpos anti-beta klotho ejemplares de la presente descripción se observó con células L6 transfectadas con FGFR1c (R1c), pero no con células L6 transfectadas con FGFR2c (R2c), FGFR3c (R3c), o FGFR4 (R4), mientras que la activación por el control FGF19 se observó con células L6 transfectadas con

15

R1c, R2c, R3c y R4.

EJEMPLO 5: ENSAYOS FUNCIONALES ADICIONALES

5 Los anticuerpos que se unen a beta klotho generados, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1, se probaron para determinar su actividad funcional en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de adipocitos, que mide la señalización endógena de FGFR1c/beta klotho. FGF19 o FGF21 estimulan la fosforilación de ERK, aumentan la captación de glucosa y la lipólisis en adipocitos cultivados. Los adipocitos se consideran fisiológicamente relevantes para demostrar la actividad funcional de los ligandos del receptor o los anticuerpos agonistas que imitan la función de los ligandos (*por ejemplo*, la señalización del receptor por los ligandos).

Por ejemplo, los preadipocitos humanos congelados (Lonza cat n.º PT-5005) se descongelaron el día 1, se diferenciaron en el día 3 y se mantuvieron en medio de diferenciación durante aproximadamente dos semanas antes del experimento (*por ejemplo*, a continuación murieron de hambre en el día 17, y se analizaron en el día 18). El medio de siembra fue 1:1 DMEM/F12K + 10 % de FBS. La densidad celular de la siembra fue de 25.000 células/100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. En el día 3, el medio se reemplazó con medio de diferenciación de adipocitos humanos (Cell Applications Inc). A partir de entonces, se añadió medio de diferenciación fresco a las células cada 2-3 días. En el día 17 (el día antes del ensayo), las células se enjuagaron dos veces y se dejaron con DMEM/BSA al 0,1 % (Sigma cat n.º A3803 BSA libre de ácidos grasos esenciales) durante la noche. Al día siguiente, se añadió medio fresco de DMEM/BSA al 0,1 % durante 1 hora antes de que las células fueran tratadas con anticuerpos anti-beta klotho de prueba durante 15 minutos a 37 °C. Se usó el kit de ensayo Cis-bio Cellul'erk (cat n.º 64ERKPEH) para analizar el nivel de fosforilación de ERK siguiendo el protocolo del fabricante.

Los resultados representativos con adipocitos humanos se presentan como valores de CE50 como se muestra en la tabla 16 a continuación:

Tabla 16

	Experimento - A	Experimento - B
mAb	Ensayo hAdip pERK	Ensayo hAdip pERK CE50 (nM)
Control	+++	FGF19 5,49
5H23	+++	1,66
1C17	++	>>67
1D19	+++	>67
2L12	+++	1,23
3L3	+++	~30-
3N20	+++	>67
4P5	+++	0,89
5F7	++	>67
5C23	++	>>67
1G19	+++	1,3

30 EJEMPLO 6: COMPETENCIA DE LIGANDO

Se llevaron a cabo ensayos de competencia de ligando (FGF19 o FGF21) para evaluar si la interacción anticuerpo-beta klotho humano influye en la unión de beta klotho a su ligando natural, FGF19 o FGF21.

35 Por ejemplo, se establecieron ensayos de competencia basados en Biacore en los que FGF19 (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:304) o FGF21 (*por ejemplo* la SEQ ID NO:429) se inmovilizó en una célula de flujo (Fc2) de un chip CM5 (usando Fc1 como superficie de referencia). Los complejos de anticuerpo-beta-klotho humano se prepararon con anticuerpos ejemplares de la presente descripción, tales como 5H23 (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:25 VH y la SEQ ID NO:26 VL) o un 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276) VL). Por ejemplo, las concentraciones de 5H23 y un anticuerpo de control se titularon de 0,1-67 nM mientras se mantenía constante la concentración de beta Klotho a 5 nM en una microplaca de 96 pocillos y se inyectaron en la superficie de FGF19. Para otro ejemplo, las concentraciones de un 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276

VL) se titularon de 0,001-67 nM mientras se mantenía constante la concentración de beta klotho a 2,5 nM en una microplaca de 96 pocillos y se inyectaron en la superficie de FGF 21. La señal medida (Unidad de Respuesta, UR) se representó frente a la concentración de anticuerpo en solución [nM]. Si el anticuerpo en solución reconocía el mismo epítipo que el ligando FGF19 o el ligando FGF21 inmovilizado en la superficie del chip, a continuación, se observaba una disminución de la UR con un aumento de la concentración de anticuerpo en solución, lo que demuestra la competencia con el ligando FGF19 o el ligando FGF21 por el sitio de unión en beta klotho. Sin embargo, si el anticuerpo en solución reconocía un epítipo distinto en relación con el ligando FGF19 inmovilizado o el ligando FGF21, se observaba un aumento en UR. En este último escenario, el complejo anticuerpo-klotho podría unirse a la superficie del ligando inmovilizado FGF19 o la superficie del ligando inmovilizado FGF21, que conduce al aumento observado en la señal. En los datos ejemplares mostrados a continuación en la tabla 17A, un anticuerpo de control compitió parcialmente con el ligando FGF19 dando como resultado una reducción significativa de la señal de UR, donde 5H23 no compitió con el ligando FGF19 para unirse a beta klotho. En los datos ejemplares mostrados a continuación en la tabla 17B, un anticuerpo de control compitió con el ligando FGF21 dando como resultado una reducción significativa en la señal de UR, donde un 5H23 humanizado no compitió con el ligando FGF21 para unirse a beta klotho.

Tabla 17A

Experimento 1	UR	% cambio	Observación
Señal UR para β -Klotho 5 nM (sin complejo)	127	100 %	Anticuerpo de control*
Señal UR para el complejo klotho-anticuerpo de control	60	Reducción del 47 %	Competencia parcial entre el anticuerpo de control * y FGF19 para unirse a β -klotho

Experimento 1	UR	% cambio	Observación
señal UR para β -Klotho 5 nM (sin complejo)	109	100 %	Anticuerpo de control*
Señal UR para el complejo klotho-5H23	125	Aumento del 114 %	El complejo 5H23-klotho se une a FGF19, por lo tanto, no hay competencia

* El anticuerpo de control comprende la SEQ ID NO:358 y la SEQ ID NO:360

Tabla 17B

Experimento 1	UR normalizada	% cambio	Observación
Señal UR para β -Klotho 2,5 nM (sin complejo)	1	100 %	Anticuerpo de control*
Señal UR para el complejo klotho-FGF21	0,03	Reducción del 97 %	FGF21 compite consigo mismo para unirse a β -klotho
Experimento 1	UR normalizada	% cambio	Observación
Señal UR para β -Klotho 2,5 nM (sin complejo)	1	100 %	Anticuerpo de control*
Señal UR para el complejo klotho-5H23 humanizado	1,1	Aumento del 110%	El complejo 5H23-klotho humanizado se une a FGF21, por lo tanto, no hay competencia

* El anticuerpo de control comprende la SEQ ID NO:358 y la SEQ ID NO:360

5

Debido a que 5H23 y un anticuerpo humanizado 5H23 se unen a un epítipo diferente de beta klotho en comparación con los ligandos endógenos, tales como FGF19 y FGF21, se llevaron a cabo experimentos para probar si había efectos sinérgicos entre FGF21 y 5H23 o un anticuerpo 5H23 humanizado. En un ensayo de reportero de HEK293 (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 4), se probaron combinaciones de FGF21 y un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) en una relación molar 1:1 o fijando uno y titulando la concentración del otro. No se observó ninguna evidencia de efectos sinérgicos; el efecto máximo de FGF21 no fue mejorado por el anticuerpo 5H23 humanizado, y viceversa.

EJEMPLO 7:HUMANIZACIÓN

15

Se generaron anticuerpos anti-beta klotho humanizados, incluyendo los anticuerpos seleccionados como se describe en los ejemplos 1-6.

Se seleccionaron varios anticuerpos anti-beta klotho para la secuenciación y sus regiones VH y VL, incluyendo sus CDR, se muestran en las tablas 1-10 y en las figuras 1 y 2. Se seleccionó un anticuerpo 5H23 anti-beta klotho ejemplar para la humanización. Se utilizaron varios procedimientos de humanización. Para algunos de los anticuerpos humanizados, el procedimiento de humanización fue empírico y se basó en parte en la información estructural relacionada con las regiones variables de inmunoglobulina incluyendo modelos moleculares y requisitos de estabilidad estructural de anticuerpos moleculares (véase, *por ejemplo*, Ewert y col., 2004, Methods 34:184-199; Honegger, 2008, Handb. Exp. Pharmacol. 181:47-68; Kügler y col., 2009, Protein Eng. Des. Sel. 22: 135 -147). El procedimiento también se basaba en parte en consideraciones de residuos de contacto con el antígeno y/o residuos de estabilidad de la estructura. Por ejemplo, la consideración de los residuos típicos de contacto con el antígeno depende del tamaño del antígeno, en particular los residuos fuera de las CDR que pueden contactar con el antígeno, las divisiones de núcleo superior, núcleo central y núcleo inferior, los residuos de interfaz VH: VL, la Pro/Gly conservada (ángulos phi positivos) y la coincidencia de residuos correlacionados del subtipo VH (véase, *por ejemplo*, Ewert y col., *supra*; Honegger, *supra*; Kügler y col., *supra*).

Por ejemplo, se buscaron secuencias VH humanas homólogas a las secuencias de estructura VH 5H23y se codificó la secuencia de VH mediante la línea germinal humana IGHV1-3*01 (véase, *por ejemplo* Ehrenmann y col., 2011, Cold Spring Harbor protoc. G:737-749) fue elegido como un aceptor para la humanización. Para algunos de los anticuerpos humanizados, las secuencias de CDR de VH 5H23 se transfirieron primero a las posiciones correspondientes de

IGHV1-3*01. A continuación, se sustituyeron varios residuos de aminoácidos de VH 5H23 por los residuos humanos correspondientes individualmente o en combinaciones.

Además, por ejemplo, se buscaron las secuencias de VL humanas homólogas a las secuencias de estructura VH 5H23, y se eligió la región Vk humana codificada por el IGKV4-1*01 (véase, *por ejemplo*, Ehrennmann y col., *supra*) como un aceptor para la humanización. Para algunos de los anticuerpos humanizados, las secuencias de CDR de VL 5H23 se transfirieron primero a las posiciones correspondientes de IGKV4-1*01. A continuación, se sustituyeron varios residuos de aminoácidos de VL 5H23 por los residuos humanos correspondientes individualmente o en combinaciones.

10 Para algunos de los anticuerpos humanizados, el procedimiento de humanización utilizaba un algoritmo para construir un mapa tridimensional de las regiones variables de ratón. Este procedimiento también identificó aminoácidos de estructura y residuos importantes para la formación de la estructura de CDR o necesarios para la unión a beta klotho. Además, se seleccionaron secuencias de aminoácidos VH y VL humanas con alta homología con las secuencias de ratón para posibles secuencias de estructura para la humanización. Como se describió anteriormente, las secuencias de CDR del anticuerpo 5H23 pueden transferirse a tales secuencias de estructura humanas adicionales. Una diversidad de secuencias de estructura humana, incluyendo las secuencias de línea germinal (*por ejemplo*, IGHV1-3, IGHV1-46, IGHV1-69, IGKV4-1, IGKV1-39 o IGKV3-20) y las secuencias individuales maduras, puede ser adecuada para el procedimiento de humanización. A continuación, una cantidad de residuos de aminoácidos de VH 5H23 y/o VL 5H23 pueden sustituirse por los residuos humanos correspondientes individualmente o en combinación.

20 Para algunas de las cadenas ligeras humanizadas, se utilizaron búsquedas BLAST de IG para identificar secuencias de la línea germinal humana que coincidían estrechamente en la secuencia con VL 5H23 y/o que eran las secuencias usadas comúnmente, que incluyen, por ejemplo, IGKV1-39 y IGKV3-20. Para algunas de las cadenas ligeras humanizadas, las secuencias de CDR de VL 5H23 se transfirieron primero a las posiciones correspondientes de IGKV1-39 o IGKV3-20 y a continuación se seleccionaron empíricamente determinados aminoácidos para la subestación.

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias VH resultantes humanizadas (vH1-vH9) y VL (vL1 a vL5, v1-39a a v1-39p y v3-20a a v3-20j) se muestran con las secuencias VH y VL 5H23 en la figura 3A-3D. Por ejemplo, utilizando los diferentes procedimientos de humanización que se describen en este ejemplo, se sustituyeron varios residuos de aminoácidos de VH y VL 5H23 para el residuo humano correspondiente para obtener secuencias humanizadas como se muestra en la figura 3A-3D.

Los anticuerpos beta klotho humanizados se pueden preparar usando cualquiera de las secuencias de CDR de la tabla 18 en combinación con cualquiera de las secuencias de estructura de la tabla 19.

Tabla 18
Secuencias de CDR para anticuerpos anti-beta klotho humanizados

CDR1 VH
SEQ ID NO:1 GYTFTSYDIN
SEQ ID NO:27 GYSITSGYYWN
SEQ ID NO:53 GYTFTRYDIN
SEQ ID NO:79 GYTFTRYDIN
SEQ ID NO:105 GYTFTSYDIN
SEQ ID NO:131 GYIFTNYGIS
SEQ ID NO:157 GYTFTRYDIN
SEQ ID NO:183 GYTFTRYDIN
SEQ ID NO:209 GYTFTRYDIN
SEQ ID NO:235 GYSITSGYYWN

ES 2 808 340 T3

CDR2 VH
SEQ ID NO:2 WIYPGDGSTKYNEKFKG
SEQ ID NO:28 YINYDGNSNYTPSLKN
SEQ ID NO:54 WIYPGDSSTKFNENFKD
SEQ ID NO:80 WIYPGDDSTKYNEKFKG
SEQ ID NO:106 WIYPGDGSPKYDEKFKG
SEQ ID NO:132 EIYPRSGNTYYNEKFKG
SEQ ID NO:158 WIYPGDDSTKYNEKFKG
SEQ ID NO:184 WIYPGDGSTKYNEKFEG
SEQ ID NO:210 WIYPGDISTKYNEKFKG
SEQ ID NO:236 YINYGGSNYNPSLKN
CDR3 VH
SEQ ID NO:3 SDYYGSRSFAY
SEQ ID NO:29 KGAYYSNYDSFDV
SEQ ID NO:55 SDYYGSRSFY
SEQ ID NO:81 SDYYGSRSFVY
SEQ ID NO:107 SDYYGSRSFVY
SEQ ID NO:133 HWDGVLDYFDY
SEQ ID NO:159 SDYYGSRSFVY
SEQ ID NO:185 SDYYGSRSFVY
SEQ ID NO:211 SDYYGSRSFVY
SEQ ID NO:237 RGAYYSNYDSFDV
CDR1 VL
SEQ ID NO:4 RASKSVSTSGYVVMH
SEQ ID NO:30 KASQDINSYLS
SEQ ID NO:56 RASKSVSTSGYSYMH
SEQ ID NO:82 RASKSVSTSGYSYLH
SEQ ID NO:108 RASKSVSTSGYSYVH
SEQ ID NO:134 KSSQLLNSGNQKNYLA
SEQ ID NO:160 RASKSVSTSGYSYMH
SEQ ID NO:186 RASKSVSTSGYSYMH
SEQ ID NO:212 RASKSVSTSGYSYMH
SEQ ID NO:238 KASQDINSYLS

ES 2 808 340 T3

CDR2 VL
SEQ ID NO:5 LASYLES
SEQ ID NO:31 RANRLVD
SEQ ID NO:57 LASNLES
SEQ ID NO:83 LASNLES
SEQ ID NO:109 LASNLES
SEQ ID NO:135 GASTRES
SEQ ID NO:161 LASNLES
SEQ ID NO:187 LASNLES
SEQ ID NO:213 LASNLES
SEQ ID NO:239 RANRLVD
CDR3 VL
SEQ ID NO:6 QHSRDLTFP
SEQ ID NO:32 LQYDEFPFT
SEQ ID NO:58 QHSRELPYT
SEQ ID NO:84 QHSGELPYT
SEQ ID NO:110 QHSGELPYT
SEQ ID NO:136 LNDHSPFT
SEQ ID NO:162 HHSGELPYT
SEQ ID NO:188 QHSRELPYT
SEQ ID NO:214 QHSRELPYT
SEQ ID NO:240 LQYDEFPYT

Tabla 19
Secuencias de estructura para anticuerpos anti-beta klotho humanizados

VH
Estructura 1 (FR1)
SEQ ID NO:278 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS
SEQ ID NO:279 QVQLQQSGAEVKKPGASVKVCKAS
SEQ ID NO:280 QVQLVQSGPEVKKPGASVKVCKAS
SEQ ID NO:378 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS
Estructura 2 (FR2)
SEQ ID NO:281 WVRQAPGQGLEWVG
SEQ ID NO:282 WVRQAPGQGLEWIG
SEQ ID NO:283 WVKQAPGQGLEWIG
Estructura 3 (FR3)
SEQ ID NO:284 RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR
SEQ ID NO:285 KATITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR
SEQ ID NO:286 KATLTADTSASTAYMELSSLRSENTAVYFCAR
SEQ ID NO:287 KATLTADKSARTAYMELSSLRSENTAVYFCAR
Estructura 3 (FR3)

ES 2 808 340 T3

SEQ ID NO:379 RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
SEQ ID NO:380 RATLTADKSTRTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
SEQ ID NO:381 RATITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
Estructura 4 (FR4)
SEQ ID NO:288 WGQGTLVTVSS
VL
Estructura 1 (FR1)
SEQ ID NO:289 DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC
SEQ ID NO:290 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
SEQ ID NO:382 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
SEQ ID NO:383 DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIC
SEQ ID NO:384 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
Estructura 2 (FR2)
SEQ ID NO:291 WNQQKPGQPPELLIY
SEQ ID NO:292 WYQQKPGQPPELLIY
SEQ ID NO:385 WYQQKPGKAPPELLIY
SEQ ID NO:386 WNQQKPGKAPPELLIY
SEQ ID NO:387 WYQQKPGKPPPELLIY
SEQ ID NO:388 WNQQKPGKPPPELLIY
SEQ ID NO:389 WYQQKPGQAPPELLIY
SEQ ID NO:390 WNQQKPGQAPPELLIY
SEQ ID NO:391 WYQQKPGQPPPELLIY
SEQ ID NO:392 WNQQKPGQPPPELLIY
Estructura 3 (FR3)
SEQ ID NO:293 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDAAIYYC
SEQ ID NO:294 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYC
SEQ ID NO:295 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAIYYC
SEQ ID NO:393 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
SEQ ID NO:394 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
SEQ ID NO:395 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYC
SEQ ID NO:396 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQEEDFATYYC
SEQ ID NO:397 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQEEDFATYYC
SEQ ID NO:398 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQEEDAATYYC
SEQ ID NO:399 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
SEQ ID NO:400 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRVEPEDFAVYYC
SEQ ID NO:401 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAAVYYC
SEQ ID NO:402 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEEEDFAVYYC
SEQ ID NO:403 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRVEEEDFAVYYC
SEQ ID NO:404 GIPARFSGSGSGTDFTLTISRVEEEDA VYYC

Estructura 4 (FR4)
SEQ ID NO:296 FGGGTKLEIK
SEQ ID NO:405 FGGGTVLEIK
SEQ ID NO:406 FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:407 FGQGTKLEIK

Por ejemplo, un anticuerpo anti-beta klotho humanizado puede comprender una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende: FR1 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:278, 279, 280, o 378); CDR1 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:1, 27, 53, 79, 105, 131, 157, 183, 209, 235); FR2 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:281, 282, o 283); CDR2 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:2, 28, 54, 80, 106, 132, 158, 184, 210, o 236); FR3 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:284, 285, 286, 287, 379, 380, o 381); CDR3 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:3, 29, 55, 81, 107, 133, 159, 185, 211, o 237); y/o FR4 (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:288); y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende: FR1 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:289, 290, 382, 383, o 384); CDR1 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:4, 30, 56, 82, 108, 134, 160, 186, 212, o 238); FR2 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:291, 292, o 385-392); CDR2 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:5, 31, 57, 83, 109, 135, 161, 187, 213, o 239); FR3 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:293, 294, 295, o 393-404); CDR3 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:6, 32, 58, 84, 110, 136, 162, 188, 214, 240); y/o FR4 (*por ejemplo*, las SEQ ID NO:296, 405, 406, o 407).

Como se describe en este ejemplo, los anticuerpos anti-beta klotho humanizados fueron diseñados de forma empírica y se expresaron como proteínas de unión a beta klotho, incluyendo la creación de nueve variantes humanizadas de la región VH del anticuerpo 5H23 y treinta y una variantes humanizadas de la región VL del anticuerpo 5H23. Las secuencias de estas regiones VH y VL 5H23 humanizadas ejemplares se muestran en la figura 3A-3D.

Los anticuerpos humanizados se prepararon con regiones VH humanizadas y VL y humanizadas con las secuencias como se muestra en la figura 3A-3D. Por ejemplo, se construyeron dieciocho (6 x 3) combinaciones de vH 1-6 y vL1-3 usando una región constante IgG1 (ala-ala) (SEQ ID NO:316) y una región constante kappa (SEQ ID NO:318): vH1-VL1, vH1-vL2, vH1-vL3, vH2-vL1, vH2-vL2, vH2-vL3, vH3-vL1, vH3-vL2, vH3-vL3, vH4-vL1, vH4-vL2, vH4-vL3, vH5-vL1, vH5-vL2, vH5-vL3, vH6-vL1, vH6-vL2, vH6-vL3, con las secuencias que se muestran en la figura 3A-3D. Además, los anticuerpos humanizados se construyeron con una región VH humanizada ejemplar (*por ejemplo*, vH3) y veintiséis regiones VL humanizadas (v1-39a a v1-39p y v3-20a a v3-20j) con las secuencias como se muestra en la figura 3A-3D.

Los anticuerpos humanizados se probaron por su actividad en una diversidad de ensayos, incluyendo, por ejemplo, como se describe en los ejemplos 2-6. La expresión de los anticuerpos humanizados con las cadenas ligeras que comprenden vI3 o v1-39c fue baja y estos anticuerpos no fueron probados más. Los resultados ejemplares con una diversidad de anticuerpos anti-beta klotho humanizados se muestran en la tabla 20A y 20B a continuación.

Tabla 20A

Anticuerpo	Expresión (mg/l)	KD-huKLB (nM)	KD-cyKLB (nM)	Ensayo de reportero CE50 (nM)	Adipocito CE50(nM)
mAb de control		0,08	0,7	0,2,0,54	3,4
5H23		0,05	0,7	0,27,0,51	3,4
vL1					
vH1	80	1,5	≥ 50	2,7	SD
vH2	80	1,7	≥ 50	3,2	SD
vH3	50	0,43	≥ 50	1,1	SD
vH4	80	2,26	≥ 50	3,0	SD
vH5	20	0,81	≥ 50	8,2	SD
vH6				NA	

ES 2 808 340 T3

Anticuerpo	Expresión (mg/l)	KD-huKLB (nM)	KD-cyKLB (nM)	Ensayo de reportero CE50 (nM)	Adipocito CE50(nM)
vL2					
vH1	200	0,21	0,95	NA	8,4
vH2	66	0,41	0,75	1,3	13,3
vH3	50-60	0,23	0,59	0,68	5,5
vH4	66	0,33	0,61	3,5	16,4
vH5	30	0,19	0,61	1,1	8,1
vH6	20	0,4	0,83	1,7	15,3

Tabla 20B

Anticuerpo	Título estimada (mg/l)	KD-huKLB (nM)	Ensayo de reportero CE50 (nM)	Adipocito CE50 (nM)
h5H23 (Prep 1)	--	0,64	--	--
h5H23 (Prep 2)	--	0,58	0,6	11,2
vH3				
VL v1-39a	50	0,90	--	--
VL v1-39b	50	0,53	1,03	--
VL v1-39c	10	--	--	--
VL v1-39d	50	0,73	1,49	--
VL v1-39e	>100	1,00	--	--
VL v1-39f	>100	0,28	0,80	21,4
VL v1-39g	>100	1,10	--	--
VL v1-39h	10	2,10	--	--
VL v1-39i	50	0,63	1,12	--
VL v1-39j	100	0,70	--	--
VL v1-39k	100	1,50	--	--
VL v1-39l	100	-	--	--
VL v1-39m	50	< 0,1	--	--
VL v1-39n	>100	< 0,1	--	--
VL v1-39o	25	0,36	--	--
VL v1-39p	10	0,36	--	--
VL v3-20a	25	0,64	--	--
VL v3-20b	50	1,90	--	--
VL v3-20c	0	1,60	--	--
VL v3-20d	50	--	--	--
VL v3-20e	50	1,60	--	--
VL v3-20f	10	1,80	--	--
VL v3-20g	--	--	--	--
VL v3-20h	25	1,50	--	--
VL v3-20i	10	--	--	--

Anticuerpo	Título estimada (mg/l)	KD-huKLB (nM)	Ensayo de reportero CE50 (nM)	Adipocito CE50 (nM)
VL v3-20j	10	--	--	--

Prep 1 = preparación del anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) expresada al mismo tiempo que las variantes de LC; Prep 2 = preparación purificada del anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL). Anticuerpo de control = la SEQ ID NO:358 VH y la SEQ ID NO:360 VL.

En ensayos adicionales, por ejemplo, ensayos de reportero con células HEK293T tal como se describe en el ejemplo 4, donde las células se transfectaron con plásmidos que codifican beta klotho de ratón (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:301), beta klotho de rata (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:356), beta klotho de hámster (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:408), beta klotho de conejo (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:410), o beta klotho de perro (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:412) y también se transfectaron con plásmidos que codifican el receptor quimérico de ratón FGFR1-βIIIc (*por ejemplo* la SEQ ID NO:416), el receptor quimérico de rata FGFR1-βIIIc (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:419), el receptor quimérico de hámster FGFR1-βIIIc (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:417), el receptor quimérico de conejo FGFR1-βIIIc (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:420), o el receptor quimérico de perro FGFR1-βIIIc (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:418), respectivamente, cuando se trataron con un anticuerpo anti-beta klotho tal como un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL), no activaron el complejo quimérico de receptor beta klotho-FGFR1c de ratón, rata, hámster, conejo o perro, respectivamente. Los anticuerpos anti-beta klotho como se describe en esta invención, incluyendo los anticuerpos 5H23 y 5H23 humanizados, así como los anticuerpos que compiten con 5H23 (*por ejemplo*, 1C17, 1D19, 2L12, 3L3, 3N20, 4P5, 5C23, 5F7 y 1G19 como se describe en el ejemplo 3) con las secuencias de CDR, como se muestra en las tablas 1-10, activan un complejo de receptor FGF/beta klotho humano y cyno, pero no complejos de receptores FGF/beta klotho de ratón, rata, hámster, conejo, o perro como se demuestra mediante los ensayos de reportero descritos anteriormente. Cuando se probó un Fab monovalente de anticuerpo anti-beta klotho preparado a partir de una digestión con papaína de un anticuerpo anti-beta klotho, tal como un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL), en un ensayo de reportero HEK293 por su capacidad para activar el complejo de receptor FGFR1 c/KLB humano, el Fab no mostró ninguna actividad de anticuerpo hasta 67 nM, mientras que el anticuerpo 5H23 humanizado mostró actividad con bajas concentraciones nanomolares similares a las mostradas en la tabla 20B.

25 EJEMPLO 8: ESTUDIOS EN ANIMALES

Los efectos de los anticuerpos anti-beta klotho se evalúan en estudios con animales, incluyendo con monos cynomolgus.

En estudios de mono cynomolgus obesos, se administra un anticuerpo anti-beta klotho ejemplar que se une a beta klotho humano y beta klotho cyno (*por ejemplo*, el anticuerpo 5H23 o la variante humanizada del mismo), así como un anticuerpo que comprende una o más de las CDR de 5H23 como se muestra en la tabla 1 o, alternativamente, un anticuerpo que comprende una o más de las CDR de un anticuerpo o una variante humanizada del mismo que se muestra en las tablas 2-10 que compiten por la unión de 5H23 a beta klotho humano como se describe en el ejemplo 3. Se pueden medir los efectos sobre una diversidad de parámetros metabólicos. Los parámetros ejemplares incluyen la ingesta de alimentos, el peso corporal, el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia abdominal (CA), el espesor del pliegue de la piel (EPP), la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG), los niveles de glucosa en sangre (*por ejemplo*, suero) en ayunas y/o la alimentado (*por ejemplo*, postprandial)*por ejemplo*, los niveles de insulina, y/o los niveles de triglicéridos.

En un estudio real, veinte monos cynomolgus obesos espontáneos con un índice de masa corporal igual o superior a 40 se seleccionan y se asignan al azar al vehículo (n = 10) y a los grupos de tratamiento con el anticuerpo (n=10) grupos. Los animales reciben una inyección subcutánea de vehículo o anticuerpo anti-beta-klotho en los días 1 y 14. Se registra la ingesta de alimentos para cada comida y se mide el peso corporal una vez por semana. Se toman muestras de sangre una vez a la semana durante 7 semanas para las mediciones de glucosa en plasma (alternativamente, suero), insulina, lípidos y parámetros de interés. En los días 14, 28 y 49, se lleva a cabo una prueba oral de tolerancia a la glucosa.

Los efectos del tratamiento ejemplares pueden incluir una menor ingesta de alimentos, una disminución del peso corporal, una disminución del índice de masa corporal, CA y/o EPP, una mejor tolerancia a la glucosa, una disminución de los niveles de insulina, una disminución de los niveles de glucosa en plasma (alternativamente, suero) en ayunas y/o alimentado *por ejemplo*, postprandial), los niveles de insulina, y/o reducción de los niveles de triglicéridos.

Estos efectos indican una mejora de los parámetros metabólicos con el tratamiento con anticuerpos anti-beta klotho.

Por ejemplo, se seleccionaron veinte monos cynomolgus macho para el tratamiento con un anticuerpo humanizado 5H23 (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) o un vehículo de control basado en su IMC (> 40) y se les preparó para la restricción de la silla, la inyección subcutánea, la extracción de sangre, y la sonda oral. Se estableció un horario de alimentación de rutina.

Los valores basales de los distintos parámetros de interés se midieron antes de los tratamientos. Por ejemplo, en el día -7, se midió el peso corporal basal, el IMC, la circunferencia abdominal, y el espesor del pliegue de la piel, y se llevó a cabo una exploración de absorciometría de rayos X de doble energía ("DEXA", por sus siglas en inglés) a los monos cynomolgus bajo anestesia de ketamina para medir la densidad mineral ósea. Se tomaron muestras de sangre en el día -3, después de una noche de ayuno. Se midieron y analizaron los niveles basales de glucosa en suero, insulina, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, y un panel de los parámetros de hematología y química clínica. Inmediatamente después de las muestras basales, los animales fueron sometidos a una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) mediante la recepción de una sonda de 4 g/kg de glucosa y se tomaron muestras a los 5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después del desafío de glucosa, y se midieron la glucosa en suero y la insulina. Sobre la base de los datos de referencia, los animales fueron asignados en dos grupos con 10 animales en cada grupo (*por ejemplo*, un grupo de tratamiento con el anticuerpo y el otro grupo como grupo de control de vehículo) para lograr los niveles basales similares de los diversos parámetros, *por ejemplo*, el peso corporal, el IMC, y los niveles de glucosa en suero, insulina y triglicéridos.

A partir del día 0, un grupo de animales (n = 10) recibió una dosis de inyección subcutánea de 10 mg/kg de un anticuerpo anti-beta-klotho, tal como un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) cada dos semanas (*por ejemplo*, en los días 0, 14, 28, y 42) para 4 dosis. El grupo de control del vehículo recibió vehículos apareados en los mismos días. Los tratamientos se llevaron a cabo por la mañana 30 minutos antes de la comida de la mañana, y el volumen de dosificación fue de 0,1 a 0,2 ml/kg.

Los parámetros de interés, *por ejemplo*, la ingesta de alimentos, el peso corporal, la química clínica, y la POTG, se controlaron durante todo el estudio. Por ejemplo, la ingesta de alimentos se midió diariamente. El peso corporal, el IMC, la circunferencia abdominal, y el espesor del pliegue de la piel se midieron semanalmente, *por ejemplo*, en los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, y 98. Se recolectaron más muestras de sangre semanalmente, *por ejemplo*, en los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, y 70, tras una noche de ayuno, para medir la glucosa, la insulina y los lípidos, tales como los triglicéridos. Se tomó una muestra de sangre adicional en el día 98, después de una noche de ayuno. Las POTG se llevaron a cabo después del inicio del estudio, *por ejemplo*, en los días 14, 28 y 56, en los que los animales recibieron una sonda de 4 g/kg glucosa y se tomaron muestras a los 5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después del desafío de glucosa, y se midieron la glucosa en suero y la insulina. Se realizó una exploración DEXA en los días 30 y 72. Además, se analizó un panel de hematología y química clínica en los días 28 y 70. Dos animales del grupo vehículo y dos animales del grupo del anticuerpo anti-beta-klotho fueron sacrificados y se realizó una necropsia el día 50 para evaluación de la seguridad. Durante el estudio, todos los animales fueron monitoreados de cerca por su salud.

Los resultados ejemplares de este estudio se muestran en las tablas 21 a 25 a continuación. Como se muestra en la tabla 21, el peso corporal de los animales tratados con vehículo se mantuvo constante (con un ligero aumento en el transcurso); mientras que el peso corporal de los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho disminuyó progresivamente, y el peso corporal no volvió al nivel basal durante las semanas 8-14 (*por ejemplo*, fase de recuperación). Del mismo modo, como se muestra en la tabla 22, los animales tratados con vehículo mostraron un IMC relativamente estable durante todo el estudio, mientras que los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho mostraron un nivel disminuido de IMC en el transcurso del estudio. El nivel de IMC tampoco volvió a los valores basales (*por ejemplo*, durante la fase de recuperación). Estos resultados sugieren que el tratamiento con anticuerpos beta klotho resultó en una reducción de la masa grasa.

Como se muestra en la tabla 23, los niveles de insulina en suero en los animales tratados con vehículo aumentaron durante el transcurso del estudio; mientras que los niveles de insulina en suero en los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho disminuyeron significativamente. Los niveles de glucosa en suero también se redujeron en los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho, como se muestra en la tabla 24. Del mismo modo, como se muestra en la tabla 25, los niveles de triglicéridos en los animales tratados con vehículo aumentaron durante el transcurso del estudio; mientras que los niveles de triglicéridos en los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho se redujeron significativamente.

Los resultados de las POTG demostraron que antes de los tratamientos, los niveles basales de insulina no eran significativamente diferentes entre el vehículo y los grupos del anticuerpo anti-beta klotho. En contraste, después del

tratamiento, hubo una tendencia hacia la reducción de la glucosa y los niveles de insulina se redujeron en los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho en comparación con los animales tratados con vehículo.

Tabla 21A Cambio en el peso corporal (kg)

	Semana	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Vehículo	Media	10,84	10,75	10,66	10,63	10,61	10,75	10,67	10,66	10,75	10,98	10,96	11,08	11,09	11,12	11,23	11,18
	SEM	0,49	0,50	0,50	0,48	0,48	0,47	0,48	0,46	0,47	0,59	0,59	0,61	0,60	0,59	0,58	0,59
h5H23	Media	10,87	10,84	10,60	10,45	10,27	10,21	10,00	9,86	9,76	9,58	9,52	9,46	9,43	9,43	9,39	9,27
	SEM	0,33	0,36	0,36	0,38	0,37	0,40	0,41	0,41	0,42	0,50	0,51	0,51	0,53	0,56	0,53	0,56

Tabla 21B: Cambio en el peso corporal (kg)

	Semana	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Vehiculo	Media	0,00	-0,09	-0,12	-0,14	0,00	-0,08	-0,09	0,00	0,14	0,13	0,24	0,26	0,28	0,39	0,34
	SEM	0,00	0,05	0,07	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,12	0,13	0,13	0,14	0,17	0,18	0,17
h5H23	Media	0,00	-0,24	-0,39	-0,57	-0,63	-0,84	-0,98	-1,08	-1,07	-1,13	-1,19	-1,22	-1,22	-1,25	-1,38
	SEM	0,00	0,05	0,08	0,10	0,13	0,15	0,17	0,19	0,26	0,27	0,28	0,31	0,34	0,31	0,34

Tabla 22: IMC

	Semana	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Vehículo	Media	57,59	57,06	56,59	56,44	56,33	57,08	56,63	56,59	57,06	58,27	58,17	58,76	58,86	59,00	59,60	59,33
	SEM	2,41	2,45	2,45	2,33	2,31	2,28	2,30	2,23	2,25	2,55	2,52	2,60	2,60	2,53	2,46	2,51
h5H23	Media	57,52	57,32	56,03	55,24	54,28	53,95	52,82	52,07	51,54	48,85	48,56	48,24	48,09	48,07	47,94	47,28
	SEM	2,53	2,61	2,50	2,51	2,44	2,50	2,52	2,54	2,48	2,29	2,30	2,32	2,44	2,54	2,46	2,60

Tabla 23: Insulina (uU/ml)

Semana		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vehiculo	Media	100,09	91,06	124,79	187,36	159,20	226,53	145,78	186,75	204,96	181,32
	SEM	19,94	26,33	37,48	62,09	51,60	130,94	34,74	39,85	52,63	52,28
h5H23	Media	34,73	36,19	38,11	46,75	48,28	35,42	37,95	57,29	63,23	55,30
	SEM	4,91	4,14	7,24	6,54	6,80	4,98	5,03	12,99	12,43	13,62

	Semana	-1 a 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vehículo	Media	90,81	93,69	95,41	90,21	94,51	98,31	97,70	95,78	94,73	93,53	90,06
	SEM	10,00	9,07	9,73	7,93	9,17	10,46	13,12	10,21	11,62	12,09	12,49
h5H23	Media	90,85	87,37	83,19	84,92	85,62	80,52	80,97	79,60	81,90	78,20	76,60
	SEM	11,67	6,61	6,92	8,02	6,75	5,67	6,32	4,30	4,97	7,07	5,49

	Semana	-1 a 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vehículo	Media	0,93	0,76	0,92	0,70	1,36	0,90	1,15	1,20	1,54	1,35	1,26
	SEM	0,25	0,08	0,16	0,10	0,27	0,14	0,38	0,22	0,35	0,38	0,37
h5H23	Media	1,05	0,65	0,65	0,59	0,70	0,59	0,56	0,70	0,90	0,73	0,71
	SEM	0,17	0,09	0,12	0,08	0,10	0,05	0,07	0,12	0,13	0,08	0,10

En otro estudio ejemplar, se seleccionaron prepararon y alimentaron cuarenta cynomolgus macho obesos espontáneos, como se describió anteriormente.

5

Los valores basales de diversos parámetros se midieron antes de los tratamientos como se analizó anteriormente. Por ejemplo, el peso corporal basal, el IMC, la circunferencia abdominal y el espesor del pliegue de la piel se midieron en el día -4, y se tomaron muestras de sangre basales para medir la glucosa en suero, la insulina, el colesterol total, el LDL, el HDL y los triglicéridos en el día -3, después de una noche de ayuno. Sobre la base de estos datos basales, los animales fueron asignados en 5 grupos (8 animales en cada grupo) con 4 grupos para recibir diversas dosis de un anticuerpo anti-beta klotho tal como un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) y un grupo para recibir un control de vehículo.

En el día 0, el primer grupo de animales (n = 8) recibió una dosis única de la inyección subcutánea de 0,1 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho; el segundo grupo de animales (n = 8) recibió una dosis única de la inyección subcutánea de 1 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho, y el tercer grupo de animales (n = 8) recibió una dosis única de la inyección subcutánea de 10 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho. A partir del día 0, el cuarto grupo de animales (n = 8) recibió una dosis de la inyección subcutánea de 0,1 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho una vez cada 4 semanas durante un período de 12 semanas. Como control, el quinto grupo de animales (n = 8) recibió una dosis de vehículo una vez cada 4 semanas durante 12 semanas. Los tratamientos se llevaron a cabo por la mañana 30 minutos antes de la comida de la mañana, y el volumen de dosificación fue de 0,2 ml/kg.

Los parámetros de interés se controlaron durante todo el estudio. Por ejemplo, se midió la ingesta de alimentos en cada comida. El peso corporal, el IMC, la circunferencia abdominal, y el espesor del pliegue de la piel se midieron semanalmente. Se tomaron muestras de sangre a las, *por ejemplo*, 3, 6, 12 y 24 horas y 3, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, y 112 días después de la(s) dosis(es), y se midieron los parámetros de interés, *por ejemplo*, la glucosa en suero, la insulina, el colesterol total, el LDL, el HDL y los triglicéridos. Durante el estudio, todos los animales fueron monitoreados de cerca por su salud como se describió anteriormente.

Los resultados ejemplares de este estudio de dosis-respuesta se muestran en las tablas 26-29. La tabla 26 muestra los cambios de peso corporal relativos en los animales tratados con el anticuerpo anti-beta klotho en comparación con los cambios de peso corporal en los animales tratados con vehículo. Como se muestra, una dosis única de la inyección subcutánea de 0,1 mg/kg, 1mg/kg, o 10mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho, o cuatro dosis de la inyección subcutánea de 1mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho redujeron significativamente el peso corporal. Además, el peso corporal reducido se mantuvo en el día 112 para los animales que recibieron una dosis única de 10 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho, o para los animales que recibieron cuatro dosis de 1mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho en comparación con el vehículo.

Como se muestra en la tabla 27, una dosis única de la inyección subcutánea de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg o 10 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho, o cuatro dosis de la inyección subcutánea de 1 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho redujeron el nivel de insulina en suero en comparación con el grupo de control del vehículo. Además, cuatro dosis de la inyección subcutánea de 1mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho redujeron significativamente el nivel de glucosa en suero, como se muestra en la tabla 28. Además, los niveles de triglicéridos en suero en animales tratados con una

dosis única de la inyección subcutánea de 1 mg/kg, o 10 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho, o cuatro dosis de la inyección subcutánea de 1 mg/kg del anticuerpo anti-beta klotho, se redujeron en comparación con los animales tratados con vehículo, como se muestra en la tabla 29.

Tabla 26A Peso corporal

Dias	-4	4	10	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	112
Vehículo	Media	10,17	10,07	9,89	9,87	9,91	9,83	9,73	9,71	9,63	9,61	9,57	9,53	9,45	9,24
	SEM	0,78	0,80	0,77	0,79	0,81	0,81	0,82	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,81
5H23 (0,1 mg/kg DU)	Media	10,00	9,92	9,70	9,62	9,52	9,47	9,28	9,27	9,36	9,34	9,27	9,34	9,34	9,21
	SEM	0,67	0,71	0,69	0,71	0,73	0,76	0,79	0,79	0,81	0,83	0,85	0,86	0,87	0,85
5H23 (1 mg/kg DU)	Media	9,84	9,69	9,49	9,36	9,28	9,19	8,92	8,90	8,85	8,85	8,83	8,89	8,93	9,24
	SEM	0,54	0,55	0,54	0,53	0,54	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,56
5H23 (10 mg/kg DU)	Media	10,07	9,95	9,73	9,61	9,49	9,33	9,07	8,98	8,88	8,80	8,73	8,74	8,67	8,51
	SEM	0,58	0,56	0,57	0,57	0,59	0,59	0,58	0,56	0,56	0,58	0,55	0,55	0,54	0,50
5H23 (1 mg/kg c4s)	Media	10,05	9,86	9,66	9,51	9,40	9,31	8,92	8,84	8,74	8,63	8,53	8,45	8,41	8,29
	SEM	0,42	0,45	0,43	0,42	0,44	0,44	0,43	0,42	0,41	0,42	0,40	0,40	0,39	0,38

Tabla 26B Cambio en el peso corporal (kg)

Días	-4	4	10	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	112
Vehículo	Media	0,00	-0,28	-0,30	-0,26	-0,34	-0,35	-0,44	-0,45	-0,53	-0,56	-0,60	-0,64	-0,71	-0,93
	SEM	0,00	0,05	0,05	0,04	0,06	0,10	0,13	0,14	0,16	0,18	0,19	0,22	0,23	0,27
5H23 (0,1 mg/kg DU)	Media	0,00	-0,08	-0,30	-0,38	-0,49	-0,64	-0,72	-0,74	-0,65	-0,66	-0,74	-0,66	-0,66	-0,80
	SEM	0,00	0,08	0,06	0,09	0,11	0,15	0,17	0,20	0,22	0,24	0,28	0,30	0,31	0,28
5H23 (1 mg/kg DU)	Media	0,00	-0,16	-0,35	-0,48	-0,56	-0,79	-0,93	-0,95	-0,99	-1,00	-1,01	-0,95	-0,91	-0,60
	SEM	0,00	0,03	0,04	0,04	0,05	0,07	0,08	0,09	0,11	0,13	0,15	0,19	0,21	0,20
5H23 (10 mg/kg DU)	Media	0,00	-0,12	-0,34	-0,47	-0,59	-0,88	-1,00	-1,10	-1,20	-1,27	-1,35	-1,34	-1,40	-1,56
	SEM	0,00	0,05	0,07	0,08	0,10	0,12	0,12	0,11	0,15	0,16	0,17	0,15	0,16	0,23
5H23 (1 mg/kg c4s)	Media	0,00	-0,18	-0,38	-0,54	-0,65	-0,90	-1,13	-1,20	-1,30	-1,41	-1,52	-1,60	-1,64	-1,75
	SEM	0,00	0,08	0,06	0,05	0,05	0,06	0,08	0,10	0,11	0,13	0,15	0,16	0,17	0,26

Tabla 27 Insulina

Dias	-3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	70 d	84 d	112 d
Vehiculo	Media	75,44	85,96	98,23	90,35	80,65	71,70	76,54	80,11	80,61	70,61	51,41
	SEM	17,16	15,18	23,76	21,01	15,17	13,01	12,82	16,32	20,81	17,91	11,05
5H23 (0,1 mg/kg DU)	Media	118,28	65,09	65,83	61,15	62,26	84,34	68,17	85,20	82,99	95,31	57,32
	SEM	62,16	22,84	20,26	22,41	19,93	37,61	24,82	41,19	45,77	46,91	20,74
5H23 (1 mg/kg DU)	Media	74,75	54,52	51,50	54,88	46,42	46,28	38,83	56,57	40,89	51,84	64,91
	SEM	14,42	15,27	10,80	15,55	11,97	10,53	7,93	16,04	7,15	14,73	21,66
5H23 (10 mg/kg DU)	Media	84,03	51,57	46,50	54,45	38,67	37,25	34,70	32,83	25,49	33,33	22,38
	SEM	18,06	10,75	7,19	14,43	7,95	5,16	5,04	6,61	3,18	7,10	2,46
5H23 (1 mg/kg c4s)	Media	133,82	52,88	61,67	109,20	38,83	37,60	47,85	40,18	32,42	30,58	22,14
	SEM	57,35	18,45	14,30	40,07	9,93	12,32	13,85	11,96	8,21	10,73	4,17

Tabla 28 Glucosa

Días	-3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	70 d	84 d	112 d
Vehículo	Media	76,41	69,57	68,60	63,90	59,94	68,27	70,79	58,12	70,16	73,60	71,46
	SEM	8,29	9,37	5,55	7,89	6,31	3,46	6,14	4,42	7,37	7,52	11,33
5H23 (0,1 mg/kg DU)	Media	92,54	72,59	67,10	63,23	54,14	62,37	62,53	62,46	64,24	79,27	73,80
	SEM	15,41	5,49	4,54	4,52	4,82	3,37	3,69	5,17	3,60	10,90	6,91
5H23 (1 mg/kg DU)	Media	97,67	73,82	64,51	57,74	54,72	62,39	62,96	65,25	65,88	68,56	70,02
	SEM	11,08	4,64	2,69	3,29	4,38	4,98	3,91	2,59	8,34	5,21	6,84
5H23 (10 mg/kg DU)	Media	89,71	73,24	68,74	61,13	58,93	66,49	61,11	63,14	59,11	69,59	66,49
	SEM	11,76	5,56	3,10	5,11	1,92	2,68	2,14	2,21	2,52	3,98	3,11
5H23 (1 mg/kg c4s)	Media	130,01	87,28	81,11	77,56	71,89	67,79	66,98	65,34	63,23	72,56	69,50
	SEM	21,21	15,15	10,15	13,41	6,83	7,05	7,56	4,99	3,75	6,66	4,98

Tabla 29 Triglicéridos

Días		-3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	70 d	84 d	112 d
Vehículo	Media	0,90	0,61	1,00	1,45	1,04	1,51	1,03	1,30	0,99	1,10	1,12	0,79
	SEM	0,18	0,12	0,19	0,33	0,23	0,32	0,17	0,23	0,19	0,25	0,30	0,13
5H23 (0,1 mg/kg DU)	Media	0,69	0,54	0,57	0,67	0,59	0,70	0,78	0,85	1,09	0,89	1,18	0,98
	SEM	0,13	0,10	0,11	0,17	0,15	0,14	0,22	0,20	0,40	0,25	0,39	0,27
5H23 (1 mg/kg DU)	Media	1,27	0,58	0,76	0,91	0,73	0,59	0,59	0,72	0,83	0,95	1,33	1,61
	SEM	0,37	0,06	0,20	0,22	0,21	0,06	0,14	0,17	0,27	0,30	0,36	0,24
5H23 (10 mg/kg DU)	Media	1,12	0,61	0,64	0,68	0,54	0,97	0,55	0,64	0,65	0,59	0,65	0,71
	SEM	0,18	0,09	0,12	0,15	0,09	0,38	0,09	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12
5H23 (1 mg/kg c4s)	Media	1,24	0,65	0,68	0,77	0,65	0,57	0,56	0,55	0,57	0,49	0,53	0,53
	SEM	0,36	0,18	0,19	0,28	0,11	0,11	0,09	0,13	0,14	0,10	0,08	0,07

Los resultados de estos estudios en animales demuestran la mejora de los parámetros metabólicos con el tratamiento con los anticuerpos anti-beta klotho proporcionados en esta invención, por ejemplo, tales como reducciones en el peso corporal, el índice de masa corporal, la circunferencia abdominal, el espesor del pliegue de la piel, la glucosa (*por ejemplo*, la glucosa en suero), la insulina (*por ejemplo*, la insulina en suero) y/o los triglicéridos (*por ejemplo*, los triglicéridos en suero).

EJEMPLO 9: EPÍTOPO Y MAPEO DE DOMINIOS

Los estudios se realizaron con el fin de localizar el sitio de unión en KLB humano de anticuerpos anti-beta klotho en el contenedor de epítipo 5H23, incluyendo 5H23 como se describe en el ejemplo 3, con las secuencias que se muestran en las tablas 1-10 y las figuras 1-3, y anticuerpos anti-beta klotho humanos en el contenedor de epítipo 5H23, tales como los anticuerpos 5H23 humanizados (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL). Por ejemplo, se realizaron ensayos de unión basados en FACS para el mapeo de dominios en células Expi293 (Life Technologies, A14635) que fueron transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican variantes de KLB: humano, ratón, cynomolgus, una versión química en la que la secuencia del dominio KL1 de KLB de ratón (M1-F506) reemplaza el dominio KL1 de KLB humano (M1-F508) para crear KLB de ratón/humano (SEQ ID NO:376), y una segunda quimera en la que la secuencia de KL1 humana (M1-F508) reemplaza el dominio KL1 de KLB de ratón (M1-F506) para crear KLB humano/de ratón (SEQ ID NO:374). Además, el vector de expresión pYD7 que no alberga ninguna secuencia de KLB se transfectó como un control negativo.

En algunos estudios, la unión de una muestra purificada de un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) a las variantes de KLB se determinó mediante análisis FACS. Dos días después de la transfección, las células se incubaron conjuntamente con anticuerpos purificados: anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL), un anticuerpo de control (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:358 VH y la SEQ ID NO:360 VL), y un anticuerpo de control negativo (*por ejemplo*, el anticuerpo de hemocianina de lapa californiana (KLH) expresado a partir de una construcción que comprende las SEQ ID NO:424 y 425) diluido a 1 µg/ml en PBS/BSA al 1 %/azida al 0,1 % durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar con PBS/BSA al 1 %/azida al 0,1 %, las células transfectadas se incubaron conjuntamente a continuación con Fc anti-humano marcado (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar con PBS/BSA al 1 %/azida al 0,1 %, las células se adquirieron en un citómetro de flujo (FACS Calibur) y se analizaron mediante un software de citometría de (FlowJo). Para visualizar los datos resultantes, se generaron gráficos que representan el número de células en función de la intensidad de fluorescencia, y se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada muestra como se muestra en la tabla 30.

Tabla 30

Anticuerpo	KLB de ratón	KLB químico de ratón/humano	KLB químico humano/de ratón	KLB humano	KLB cynomolgus	vector vacío (-control)
h5H23	14,2	26,1	9,29	865	1909	8,29
Control	10,6	5,6	71,9	620	1757	6,82
Control neg.	9,59	5,44	6,01	6,2	9,26	5,41

Anticuerpo	KLB de ratón	KLB quimérico de ratón/humano	KLB quimérico humano/de ratón	KLB humano	KLB cynomolgus	vector vacío (-control)
* Intensidad media de fluorescencia calculada a partir de datos de FACS utilizando el software de análisis FlowJo; el control neg.es el anticuerpo antiKLH.						

Un anticuerpo 5H23 humanizado ejemplar (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) se unió a KLB humano y KLB cynomolgus, como lo indica una gran proporción de células que tienen una alta intensidad de fluorescencia en comparación con las células tratadas con el anticuerpo anti-KLH de control negativo, pero el anticuerpo 5H23 humanizado ejemplar no se unió al KLB de ratón. El anticuerpo 5H23 humanizado ejemplar también se unió a la proteína quimérica KLB de ratón/humana, pero no a la proteína quimérica KLB humana/de ratón lo que indica que los anticuerpos anti-beta klotho en el contenedor de epítipo 5H23, incluyendo 5H23 como se describe en el ejemplo 3, con las secuencias que se muestran en las tablas 1-10 y las figuras 1-3, y los anticuerpos anti-beta klotho humanos en el contenedor de epítipo 5H23, tal como los anticuerpos 5H23 humanizados (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL) se unen al dominio KL2 de KLB humano. Por el contrario, el anticuerpo de control se unió al dominio KL1 de KLB humano como se demuestra por su unión a células transfectadas con la proteína quimérica KLB humana/de ratón, pero no con la proteína quimérica KLB de ratón/humana.

15 Para identificar más residuos de unión específicos dentro del dominio beta klotho KL2 humano, se usó la mutagénesis con escopeta para mutar por separado los residuos individuales del dominio KL2 de beta klotho humano a una alanina (*por ejemplo*, los residuos F508A-L1008A). Las proteínas mutantes beta klotho resultantes se expresaron dentro de las células HEK-293T y se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para la unión a los anticuerpos anti-beta klotho en el contenedor de epítipo 5H23, incluyendo 5H23 como se describe en el ejemplo 3, con las secuencias que se muestran en las tablas 1-10 y las figuras 1-3 y los anticuerpos anti-beta klotho humanos en el contenedor de epítipo 5H23, tal como un anticuerpo 5H23 humanizado (*por ejemplo*, la SEQ ID NO:271 VH y la SEQ ID NO:276 VL), o un fragmento Fab monovalente del anticuerpo 5H23 humanizado. Por ejemplo, el cribado de las proteínas mutantes beta klotho se llevó a cabo a una concentración de 0,5 µg/ml para el anticuerpo 5H23 humanizado, 1,0 µg/ml para el fragmento Fab, y 2,0 µg/ml para un anticuerpo policlonal anti-beta klotho de control positivo.

El mapeo resultante identificó tres residuos de unión específicos, H657, Y701 y R703, que fueron negativos para la unión por el anticuerpo 5H23 humanizado, pero fueron positivos para los anticuerpos policlonales anti-beta klotho de control. Estos residuos representaban aminoácidos cuyos cambios laterales hicieron las contribuciones energéticas más altas a la interacción anticuerpo-epítipo como se muestra en la tabla 31. Las ubicaciones de los tres residuos identificados se modelaron mostrándolos (esferas oscuras) en las posiciones equivalentes en la beta-glucosidasa citosólica humana (PDB ID n.º 2JFE; Tribolo y col., J. Mol. Biol. 370, 964-975 (2007)), identificadas por alineación BLAST de las dos proteínas, como se muestra en la figura 6. La estructura muestra el equivalente de los residuos de beta klotho 521-963. La menor reactividad de las mutaciones Y701A y R703A con el anticuerpo 5H23 humanizado indica que Y701 y R703 son los principales contribuyentes energéticos a la unión.

Tabla 31

Reactividad de unión (% peso)		
Mutación de proteínas	Anticuerpo 5H23 humanizado	Anticuerpo policlonal de control
H657A	16,88 (±11,93)	120,35 (±55,21)
Y701A	0,64 (±0,09)	43,37 (±5,78)
R703A	1,64 (±1,69)	131,59 (±19,98)

40 Por lo tanto, los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención, incluyendo 5H23 y el contenedor de epítipo 5H23 reconocen un epítipo en el dominio KLB2 que comprende los residuos H657, Y701 y/o R703. Tales anticuerpos, como se describe en el ejemplo 3 y están representados, y que comprenden secuencias de CDR en las tablas 1-10 y las figuras 1-3, son útiles como anticuerpos agonistas para inducir la señalización mediada por FGF19 y/o mediada por FGF21, incluyendo, por ejemplo, para reducir el peso corporal, la ingesta de alimentos, el IMC, la insulina, la glucosa y/o los triglicéridos.

Además, los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención comparten la característica común de competir entre sí por la unión de beta klotho (véase, *por ejemplo*, el ejemplo 3 que describe los anticuerpos en el contenedor

de epítipo 5H23). Esta inhibición competitiva indica que cada anticuerpo se une a la misma región de beta klotho (por ejemplo, el mismo epítipo), afirmando de este modo efectos similares. Como se ejemplifica además en esta invención, los anticuerpos anti-beta klotho incluyen anticuerpos anti-beta klotho humanizados, incluyendo los anticuerpos anti-beta klotho humanizados derivados de o basados en 5H23, 1C17, 1D19, 2L12, 3L3, 3N20, 4P5, 5C23, 5F7 y/o 1G19 que tienen la secuencia de CDR como se describe en las tablas 1-10 o las figuras 1-3, tales como los anticuerpos anti-beta klotho, incluyendo los anticuerpos anti-beta klotho humanizados, se unen a un dominio específico de beta klotho humano (*por ejemplo*, KL2 (residuos S509-S1044) como se describió anteriormente). Además, dicha unión se puede atribuir en gran parte a los residuos de aminoácidos particulares dentro de la región KL2 (*por ejemplo*, H657, Y701 y R703 como se describió anteriormente), que comprenden el epítipo reconocido por los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que los efectos observados para un anticuerpo anti-beta klotho que se deriva de o se basa en 5H23 o un anticuerpo en el contenedor de epítipo 5H23, incluyendo un anticuerpo que tiene una o más CDR descritas en las tablas 1-10 o las figuras 1-3, se pueden extrapolar a otros anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención que tienen la misma o similar especificidad de epítipo (*por ejemplo* las mismas o similares CDR). Por ejemplo, las actividades *in vitro* de los anticuerpos, como se muestra en los ejemplos 4-7 y anteriores, así como los efectos *in vivo* demostrados en el ejemplo 8 para un anticuerpo anti-beta klotho humanizado ejemplar, son representativos de las actividades y los efectos de los anticuerpos anti-beta klotho descritos en esta invención.

Como se usa en esta invención y en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" puede incluir una mezcla de dos o más de tales anticuerpos, y similares.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une dentro del dominio beta klotho 2 (KLB2) que comprende los residuos de aminoácidos 657 a 703 de beta klotho humano (SEQ ID NO:297), donde el anticuerpo comprende:
- 5 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende:
- una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:12, o la SEQ ID NO:13;
 una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:14; y
 10 una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:15;
- y
 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende:
- una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:16;
 15 una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:11; y
 una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:17.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:
- 20 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:1, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:2, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:3; y
 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:4, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:5, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:6.
- 25 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:
- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:12, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:2, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:3; y
 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:4, una CDR2
 30 que comprende la SEQ ID NO:5, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:6.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:
- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:13, una
 35 CDR2 que comprende la SEQ ID NO:14, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:15; y
 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la SEQ ID NO:16, una CDR2 que comprende la SEQ ID NO:11, y una CDR3 que comprende la SEQ ID NO:17.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la región variable de la cadena pesada
 40 tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:25 y la región variable de la cadena ligera tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:26.
6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la región variable de la cadena pesada
 comprende la SEQ ID NO:25 y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:26.
 45
7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la región variable de la cadena pesada
 comprende la SEQ ID NO:271 y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:276.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el anticuerpo se une a un epítipo que
 50 comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos 657, 701 y/o 703 del beta klotho humano (SEQ ID NO:297).
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
- 55 10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, (scFv)₂, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo de región variable dual, un anticuerpo lineal o un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpos.
11. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 60 12. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 11.

13. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 11 o el vector de la reivindicación 12.
- 5 14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un procedimiento para mejorar el metabolismo de la glucosa en un sujeto.
- 10 16. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 15, donde el procedimiento para mejorar el metabolismo de la glucosa da como resultado:
- 15 (a) niveles reducidos de glucosa;
(b) niveles reducidos de insulina;
(c) aumento de la sensibilidad a la insulina;
(d) reducción de la resistencia a la insulina;
(e) mejora de la tolerancia a la glucosa; y/o
(f) mejora de la función pancreática.
- 20 17. Un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un procedimiento para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la dislipidemia, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la enfermedad cardiovascular, el síndrome metabólico, la obesidad, o la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).
- 25 18. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde el procedimiento comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos en combinación con el anticuerpo.
- 30 19. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 18, donde el uno o más agentes terapéuticos se seleccionan de entre el grupo que consiste en biguanidas, sulfonilureas, tiazolidinedionas, análogos de GLP-1, agonistas de PPAR gamma, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), bromocriptina, secuestrantes de ácidos biliares, insulina, inhibidores de la alfa glucosidasa, metformina, inhibidores de SGLT-2, agentes de supresión del apetito y fármacos para la pérdida de peso.

Kabat	1	10	22	31	40	50	65
AbM	1	10	22	26	40	50	65
Chothia	1	10	22	26	40	abc	65
Contact	1	10	22	30	40	47	65
IMGT	1	23	27	27	41	56	74
AHon	1	23	27	42		57	76
5H23		QVQLQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTS-YDIN	WVKQRPQGQLEWIG	WIYP	---GDG	STKYNEKFKG
1C17		QVQLQESGPELVKPSQSLTCSVT	GYSTITSGYYWN	WIRQFFGNKLEWMMG	YIN	---YD	GNNSNYTPSLKN
1D19		QVQPQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN	WMKQRPQGQLEWIG	WIYP	---GDS	STKFNENFKD
2L12		QVQLQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN	WVKKRPQGQLEWIG	WIYP	---GDD	STKYNEKFKG
3L3		QVQPQESGPELVKPGTILVKISCKAS	GYTFTS-YDIN	WVKQRPQGQLEWIG	WIYP	---GDG	SPKYDEKFKG
3N20		QVQLQESGAELARPGASVKLSCKVS	GYIFTN-YGIS	WVKQRTGQGLEWIG	EIYP	---RSG	NTYYNEKFKG
4P5		QVQLQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN	WVKKRPQGQLEWIG	WIYP	---GDD	STKYNEKFKG
5C23		QVQPQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN	WVKKRPQGQLEWIG	WIYP	---GDG	STKYNEKFEF
5F7		QVQPQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN	WVKQRPQGQLEWIG	WIYP	---GDI	STKYNEKFKG
1G19		QVQLQESGPELVKPSQSLTCSVT	GYSTITSGYYWN	WIRQFFGNKLEWMMG	YIN	---YGG	SNNYNP

Kabat	70	80	abc	90	95	100	102	110
AbM	70	80	abc	90	95	100	102	110
Chothia	70	80	abc	90	96	100	101	110
Contact	70	80	abc	90	93	100	101	110
IMGT	75	89		105	106	109	138	
AHon								
5H23		KATLTADKSSRTAYMQLS	SLTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSF	---AY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:25)
1C17		RISITRDTSKNQFFLKLNS	VTPEDTATYYCAR	KGAYYSNYDSFDV	WGTF	TVTVSS	(SEQ ID NO:51)	
1D19		KATLTADKSSSTAYMQLS	SLTSENSFVYFCAR	SDYIGSRSF	---TY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:77)
2L12		KATLTADKSSSTAYMQLS	SLTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSF	---VY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:103)
3L3		KATLTADKSSSTAYMQLS	SLTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSF	---VY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:129)
3N20		KATLTADMSSSTAYMDLRS	LTSEDSAVYFCAR	HWDGVLDFE	---DY	WGQ	GLVTVSS	(SEQ ID NO:155)
4P5		KATLTADKSSSTAYMQLS	SLTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSF	---VY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:181)
5C23		KATLTADKSSSTAYMQLS	SLTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSF	---VY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:207)
5F7		KATLTADKSSSTAYMQLNS	LTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSF	---VY	WGQ	GLVTVSA	(SEQ ID NO:233)
1G19		RISITRDTSKNQFFLKLNS	VTTEDTATYYCAR	RGAYYSNYDSFDV	WGTF	TVTVSS	(SEQ ID NO:259)	

FIGURA 1A

Kabat	1	10	20	24-27abcd-----34	40	50-----56
AbM	1	10	20	24-----30abcd-----34	40	50-----56
ChoThia	1	10	20	26---30abcd--32	40	50---
Contact	1	10	20	30abcd-----36	40	46-----55
IMGT	1	23	27	27-----38	41	56-65 69
AHon	1	23	42			
5H23				DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYVNMH WQQKFGQPPKLLIY LASYLES	58	72
1C17				DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC KASQDINS-----YLS WQQKFGKSPKLLIY RANRLVD		
1D19				DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKFGQPPKLLIY LASNLES		
2L12				DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYLH WYQKFGQPPKLLIY LASNLES		
3L3				DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYVH WYQKFGQPPKLLIY LASNLES		
3N20				DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSC KSSQSLNLSGNQKNYLA WYQKFGQPPKLLIY GASTRES		
4P5				DILLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKFGQPPKLLIY LASNLES		
5C23				DIVLTQSPDSLTVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKFGQPPKLLIY LASNLES		
5F7				DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKFGQPPKLLIY LASNLES		
1G19				DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC KASQDINS-----YLS WQQKFGKSPKLLIY RANRLVD		
Kabat	60	70	80	89-----97		
AbM	60	70	80	89-----97		
ChoThia	60	70	80	91---96		
Contact	60	70	80	89-----96		
IMGT	70	89	105	105-----117		
AHon	73	91	107	107	138	
5H23				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC QHSRDLTFP FGGTKLEIK (SEQ ID NO:26)		
1C17				GVPSRFSGSGGQDYSLTISSLEYEDMGLIYC LQYDEFFPT FSGTKLEIK (SEQ ID NO:52)		
1D19				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC QHSRELPTY FGGTKLEIK (SEQ ID NO:78)		
2L12				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC QHSRELPTY FGGTKLEIK (SEQ ID NO:104)		
3L3				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC QHSRELPTY FGGTKLEIK (SEQ ID NO:130)		
3N20				GVPDFRFGSGGTDFTLTISSVQAEEDLAVIYC LNDHSYPPF FAGTKLEIK (SEQ ID NO:156)		
4P5				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC HHSRELPTY FGGTKLEIK (SEQ ID NO:182)		
5C23				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC QHSRELPTY FGGTKLEIK (SEQ ID NO:208)		
5F7				GVPARFSGSGGTDFTLNINHPVEEEDAATYYC QHSRELPTY FGGTKVEIK (SEQ ID NO:234)		
1G19				GVPSRFSGSGGQDYSLTISSLEYEEMGLIYC LQYDEFFPT FGGTKLEIK (SEQ ID NO:260)		

FIGURA 1B

Dominio VH

Kabat	1	10	22	31----	35	40	50--abc-----	60----	65
AbM	1	10	22	26-----	35	40	50--abc-----	58	65
Chothia	1	10	22	26-----	32	40	abc-55		65
Contact	1	10	22	30-----	35	40	47-----	58	65
IMGT	1		23	27-----	38	41	56-----	65	74
AHon	1		23	27	42		57		76
5H23			QVQLQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTS-YDIN		WVKQRPQGLEWIG	WIYP--GDG	STKYNEKFKG	
1D19			QVQFQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN		WMKQRPQGLEWIG	WIYP--GDS	STKFNENFKD	
2L12			QVQLQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN		WVKKRPQGLEWIG	WIYP--GDD	STKYNEKFKG	
3L3			QVQFQESGPELVKPGTIVKISCKAS	GYTFTS-YDIN		WVKQRPQGLEWIG	WIYP--GDG	SPKYDEKFKG	
4P5			QVQLQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN		WVKKRPQGLEWIG	WIYP--GDD	STKYNEKFKG	
5C23			QVQFQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN		WVKKRPQGLEWIG	WIYP--GDG	STKYNEKFKG	
5F7			QVQFQESGPELVKPGALVKISCKAS	GYTFTR-YDIN		WVKQRPQGLEWIG	WIYP--GDI	STKYNEKFKG	
consenso			GYTFTR-YDIN			WIYP--GDX₁STKYNEKFKG			
O			(SEQ ID NO:1)			donde X₁ = G,D,S,I			
consenso			GYTFT X₁-YDIN			WIYP--GDX₁STKYNEKFKG			
			donde X₁ = R,S			donde X₁ = G,D,S,I			
			(SEQ ID NO:261)			(SEQ ID NO:262)			
1C17			QVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVT	GYSITSGYYWN		WIRQFPGNKLEWVG	YIN---	YDGN	SNYTPSLKN
1G19			QVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVT	GYSITSGYYWN		WIRQFPGNKLEWVG	YIN---	YGG	SNNYNP
consenso			GYSITSGYYWN			YIN---	YX₁GX₂X₃NYX₄PSLKN		
			(SEQ ID NO:27)			donde X₁ = D,G			
						donde X₂ = N,S			
						donde X₃ = S,N			
						donde X₄ = T,N			
3N20			QVQLQESGAELARPGASVKLSCKV	GYIFTN-YGIS		WVKQRTGQLEWIG	EIYP--	RS	NTYYNEKFKG

FIGURA 2A-1

Dominio VH (continuación)

Kabat	70	80	abc	90	95	---100	-----102	110
AbM	70	80	abc	90	95	---100	-----102	110
Chothia	70	80	abc	90	96	---100	-----101	110
Contact	70	80	abc	90	93	---100	-----101	110
IMGF	75	89			105	-----	-----117	
AHon				106	109			138
5H23	KATLTADKSSRTAYMQLSSLTSEN	SAVYFCAR	SDYGGSRSF	--AY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:25)	
1D19	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEN	STVYFCAR	SDYGGSRSF	--TY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:77)	
2L12	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEN	SAVYFCAR	SDYGGSRSF	--VY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:103)	
3L3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEN	SAVYFCAR	SDYGGSRSF	--VY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:129)	
4F5	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEN	SAVYFCAR	SDYGGSRSF	--VY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:181)	
5C23	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEN	SAVYFCAR	SDYGGSRSF	--VY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:207)	
5F7	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEN	SAVYFCAR	SDYGGSRSF	--VY	WGQGT	TLVTVSA	(SEQ ID NO:233)	
consenso					SDYGGSRSF	--VY		
o					(SEQ ID NO:81)			
consenso					SDYGGSRSF	--X₁Y	donde X₁ = V, T, A	
					(SEQ ID NO:263)			
1C17	RISITRDTSKNQFFLKINSVTPED	TATYYCAR	KGAYYSNYDSFDV	WG	TGTTVTVSS	(SEQ ID NO:51)		
1G19	RISITRDTSKNQFFLKITSVTTE	DATYYCAR	RGAYYSNYDSFDV	WG	TGTTVTVSS	(SEQ ID NO:259)		
consenso					X₁GAYYSNYDSFDV	donde X₁ = K, R		
					(SEQ ID NO:265)			
3N20	KATLTADMSSSTAYMDIRSLTSE	DSAVYFCAR	HWDG	VLDYF	--DY	WGQGT	SLTVSS (SEQ ID NO:155)	

FIGURA 2A-2

```

Dominio VH
Kabat 1 10 20 24-27abcd-----34 40 50-----56
AbM 1 10 20 24----30abcd-----34 40 50-----56
Chothia 1 10 20 26--30abcd--32 40 50--
Contact 1 10 20 30abcd-----36 40 46-----55
IMGT 1 23 27-----38 41 56-65 69
      | |
AHon 1 23 42 58 72
5H23 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYVVMH WNQKPGQPPKLLIY LASYLES
1D19 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKPGQPPKLLIY LASNLES
2L12 DIVLTQSPASLPVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYLH WYQKPGQPPKLLIY LASNLES
3L3 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYVH WYQKPGQPPKLLIY LASNLES
4P5 DILLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKPGQPPKLLIY LASNLES
5C23 DIVLTQSPDLSLTVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKPGQPPKLLIY LASNLES
5F7 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVST--SGYSYMH WYQKPGQPPKLLIY LASNLES
consenso
o RASKSVST--SGYSYMH (SEQ ID NO: 56)
  RASKSVST--SGYSYX1H (SEQ ID NO: 57)
consenso
  RASKSVST--SGYSYX1H LASNLES
  donde X1 = M,L,V (SEQ ID NO: 57)
  (SEQ ID NO: 266)
1C17 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC KASQDINS-----YLS WVQKPGKSPKTLIY RANRLVD
1G19 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC KASQDINS-----YLS WFQKPGKSPKTLIY RANRLVD
consenso
o KASQDINS-----YLS RANRLVD
  (SEQ ID NO: 30) (SEQ ID NO: 31)
3N20 DIVMTQSPSSLVSVSAGEKVTMSC KSSQSLNSGNQKNYLA WYQKPGQPPKLLIY GASTRES

```

FIGURA 2B-1

Dominio VH (continuación)									
Kabat	60	70	80	89-----97					
AbM	60	70	80	89-----97					
Chothia	60	70	80	91---96					
Contact	60	70	80	89-----96					
IMGT	70		89	105-----117					
AHon	73		91	107	138				
5H23	GVPAFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSRDLTFP	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:26)			
1D19	GVPAFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSRELPYT	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:78)			
2L12	GVPAFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSGELPYT	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:104)			
3L3	GVPAFSGRSGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSGELPYT	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:130)			
4P5	GVPAFSGRSGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			HHSGELPYT	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:182)			
5C23	GVPAFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSRELPYT	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:208)			
5F7	GVPAFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSRELPYT	FGGTKVEIK	(SEQ ID NO:234)			
consenso				X₁HSX₂ELPYT	donde X₁ = Q,H;	donde X₂ = R,G			
				(SEQ ID NO:267)					
1C17	GVPSRFSGSGGQDYSLTISLSLEYEDMGIYYC			LQYDEFFFT	FGSGTKLEIK	(SEQ ID NO:52)			
1G19	GVPSRFSGSGGQDYSLTISLSLEYEMGIYYC			LQYDEFPYT	FGGTKLEIK	(SEQ ID NO:260)			
consenso				LQYDEFPX₁T	donde X₁ = F,Y				
				(SEQ ID NO:268)					
3N20	GVPDFTSGSGGTDFTLTISLVQAEEDLAVYYC			LNDHSYFFT	FGAGTKLEIK	(SEQ ID NO:156)			

FIGURA 2B-2

Dominio VH (continuación)

Kabat	70	80	abc	90	95--100--102	110
AbM	70	80	abc	90	95--100--102	110
Chothia	70	80	abc	90	96-100-101	110
Contact	70	80	abc	90	93-----100-101	110
IMGT	75	89			105-----117	
AHon				106 109	138	
5H23	KATLTADKSSRTAYMQLSSLTSENSAVYFCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:25)	
5H23v1-3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:323)	
vH1	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:269)	
vH2	RVTITADK SAR TAYMELSSLTSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:270)	
vH3	KAT TITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY FCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:271)	
vH4	RVTITADK SAR TAYMELSSLTSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:272)	
vH5	KATLTAD TSA S TAYMELSSLRSEN TAVYFCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:273)	
vH6	KATLTADKSAR TAYMELSSLRSEN TAVYFCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:274)	
5H23v1-69	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:414)	
vH7	RATLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:320)	
vH8	RATLTADKS T R TAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:321)	
vH9	RATITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	SDYIGSRSFAY	WGQGTLLVTVSS	(SEQ	ID NO:322)	

FIGURA 3A-2

Dominio VH

Kabat	1	10	20	24-27abcd-----34	40	50-----56
AbM	1	10	20	24-----30ab-----34	40	50-----56
Chothia	1	10	20	26--30ab--32	40	50---
Contact	1	10	20	30ab-----36	40	46-----55
IMGF	1	23	27	27-----38	41	56-65 69
AHon	1	23	23	42	58	72
5H23	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
5H23v4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
vL1	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
vL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
vL3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
vL4	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
vL5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQOKPGQPPKLLIY	LASYLES		
Kabat	60	70	80	89-----97		
AbM	60	70	80	89-----97		
Chothia	60	70	80	91-----96		
Contact	60	70	80	89-----96		
IMGF	70	89	105	105-----117		
AHon	73	91	107	138		
5H23	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAIYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO:26)		
5H23v4-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEEDVAVYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO:355)		
vL1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDAIIYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO:275)		
vL2	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO:276)		
vL3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAIIYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO:277)		
vL4	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEEDVAVYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKVEIK	(SEQ ID NO:325)		
vL5	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEEDVAVYIC	QHSRDLTFP	FGGGTKVEIK	(SEQ ID NO:326)		

FIGURA 3B

dominio VH (continuación)

Kabat	60	70	80	89-----97	(SEQ ID NO:26)
AbM	60	70	80	89-----97	(SEQ ID NO:353)
Chothia	60	70	80	91-----96	(SEQ ID NO:327)
Contact	60	70	80	89-----96	(SEQ ID NO:328)
IMGF	70	89		105-----117	(SEQ ID NO:329)
AHon	73	91		107 138	(SEQ ID NO:330)
5H23	GVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
5H23v1-39	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39a	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39b	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39c	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39d	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39e	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39f	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39g	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39h	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39i	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39j	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39k	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39l	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDAATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39m	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39n	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDAATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39o	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDEAFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK
v1-39p	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEEEDFATYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK

FIGURA 3C-2

Dominio VH									
Kabat	1	10	20	24-27abcd-----34	40				50-----56
AbM	1	10	20	24-----30ab-----34	40				50-----56
Chothia	1	10	20	26--30ab--32	40				50--
Contact	1	10	20	30ab-----36	40			46-----55	
IMGF	1		23	27-----38	41				56-65 69
AHon	1		23		42				58 72
5H23	DIVLTQSPASLAVSLGQRATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQQKPGQPPKLLIY	LASYLES					
5H23v3-20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20a	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20b	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20c	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20d	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQ PP RLLIY	LASYLES					
v3-20e	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20f	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQ PP RLLIY	LASYLES					
v3-20h	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WYQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20i	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQQKPGQAPRLLIY	LASYLES					
v3-20j	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKSVSTSGYVYMH	WNQQKPGQPP RLLIY	LASYLES					

FIGURA 3D-1

Dominio VH (continuación)

Kabat	60	70	80	89-----97	
AbM	60	70	80	89-----97	
Chothia	60	70	80	91----96	
Contact	60	70	80	89-----96	
IMGT	70		89	105-----117	
AHon	73		91	107	138
5H23	GVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAAIYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:26)
5H23v3-20	GIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:354)
v3-20a	GIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:343)
v3-20b	GIPARFSGSGGTDFTLTISRVEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:344)
v3-20c	GIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:345)
v3-20d	GIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:346)
v3-20e	GIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:347)
v3-20f	GIPARFSGSGGTDFTLTISRVEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:348)
v3-20g	GIPARFSGSGGTDFTLTISRVEPEDEFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:349)
v3-20h	GIPARFSGSGGTDFTLTISRLEEEDFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:350)
v3-20i	GIPARFSGSGGTDFTLTISRVEEEDFAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:351)
v3-20j	GIPARFSGSGGTDFTLTISRVEEEDAAVYYC			QHSRDLTFP	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:352)

FIGURA 3D-2

FIGURA 4A

	80
humano	MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTFGSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDT
chMoHu	MKTCCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMNSRALQRSVLSAFVLLRAVTFGSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDT
chHuMo	MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTFGSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDT
ratón	MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMNSRALQRSVLSAFVLLRAVTFGSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDT
	120
humano	FPKNFFWIGITGALQVEGSWKDKGKPSIWDHFIHTHLKNVSSINGSSDSYIFLEKDLSDLDFIGVSYQFSISWPRLFF
chMoHu	FPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGFSIWDRIYVYSHLRGVNGTDRSDSYIFLEKDLLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFF
chHuMo	FPKNFFWIGITGALQVEGSWKDKGKPSIWDHFIHTHLKNVSSINGSSDSYIFLEKDLSDLDFIGVSYQFSISWPRLFF
ratón	FPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDGRGFSIWDRIYVYSHLRGVNGTDRSDSYIFLEKDLLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFF
	200
humano	DGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNNDTIIDIFNDYATYCFQMGDRVKYWIITH
chMoHu	NGTVAAVNAOGLRYRALLDLSVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNNAIMIDLFNDAIYCFQTFGDRVKYWIITH
chHuMo	DGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNNDTIIDIFNDYATYCFQMGDRVKYWIITH
ratón	NGTVAAVNAOGLRYRALLDLSVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNNAIMIDLFNDAIYCFQTFGDRVKYWIITH
	320
humano	NPYLVAWHGCGTGMHAPGEGKGNLAAVYTVGHNLIIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGNLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCC
chMoHu	NPYLVAWHGCGTGMHAPGEGKGNLTA VYTVGHNLIIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGNLSITLGSHWIEPNRRTDNMEDVINCC
chHuMo	NPYLVAWHGCGTGMHAPGEGKGNLAAVYTVGHNLIIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGNLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCC
ratón	NPYLVAWHGCGTGMHAPGEGKGNLTA VYTVGHNLIIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGNLSITLGSHWIEPNRRTDNMEDVINCC
	400
humano	QSMVSVLGFANPIHGDGDYPEGMRKCLFSVLPVFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQVSVLNLRREAL
chMoHu	HSMSSVLCGFANPIHGDGDYPEFMKTG - - AMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQVSVLNLRQVL
chHuMo	QSMVSVLGFANPIHGDGDYPEGMRKCLFSVLPVFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQVSVLNLRREAL
ratón	HSMSSVLCGFANPIHGDGDYPEFMKTG - - AMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQVSVLNLRQVL
	480
humano	NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFQWQDAYTIRRGGLFY
chMoHu	NWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFEDEIRVFGYTAWSLLDGFQWQDAYTIRRGGLFY
chHuMo	NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFQWQDAYTIRRGGLFY
ratón	NWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFEDEIRVFGYTAWSLLDGFQWQDAYTIRRGGLFY

FIGURA 4B

	560
humano	VDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGQPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRL
chMoHu	VDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFSLKESTPDVQGGQPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRL
chHuMo	VDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFPLKESTPDMKGRFFCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRL
ratón	VDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFFCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRL
	600
humano	LHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWAASVLPCTGNLSAVNRQALRYRCVVSSEGLKLGISAMVT
chMoHu	LHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWAASVLPCTGNLSAVNRQALRYRCVVSSEGLKLGISAMVT
chHuMo	LYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTISILPTGNLSKVNQRQVLRYYRCVVSSEGLKLGVPFPMVT
ratón	LYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTISILPTGNLSKVNQRQVLRYYRCVVSSEGLKLGVPFPMVT
	680
humano	LYPPTHAGLGLPEPLHLDGWLNPSTAEAFQAYAGLCTFQELGDLVKLWITITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLVVAHA
chMoHu	LYPPTHAGLGLPEPLHLDGWLNPSTAEAFQAYAGLCTFQELGDLVKLWITITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLVVAHA
chHuMo	LYHPTHSHLGLPLPLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRELGDVVKLWITITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHA
ratón	LYHPTHSHLGLPLPLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRELGDVVKLWITITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHA
	760
humano	LAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEIPANPYADSHWFAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
chMoHu	LAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEIPANPYADSHWFAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
chHuMo	QVWHLYDRQYRFPVQHGAVSLSLHCDWAEIPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFAADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRLSS
ratón	QVWHLYDRQYRFPVQHGAVSLSLHCDWAEIPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFAADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRLSS
	800
humano	LAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEIPANPYADSHWFAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
chMoHu	LAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEIPANPYADSHWFAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSS
chHuMo	QVWHLYDRQYRFPVQHGAVSLSLHCDWAEIPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFAADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRLSS
ratón	QVWHLYDRQYRFPVQHGAVSLSLHCDWAEIPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFAADPLFKTGDYPSVMKEYIASKNQRLSS
	840
humano	SALPRLTEAEERLLKGTVDVFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVKLLLRWVRRNY
chMoHu	SALPRLTEAEERLLKGTVDVFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVKLLLRWVRRNY
chHuMo	SVLPRFTAKESRLVKGTVDVFCALNHFTTRFVVIHKQLNTRNSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVIPWGVKLLLAWIRRRNY
ratón	SVLPRFTAKESRLVKGTVDVFCALNHFTTRFVVIHKQLNTRNSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVIPWGVKLLLAWIRRRNY
	880
humano	SALPRLTEAEERLLKGTVDVFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVKLLLRWVRRNY
chMoHu	SALPRLTEAEERLLKGTVDVFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVKLLLRWVRRNY
chHuMo	SVLPRFTAKESRLVKGTVDVFCALNHFTTRFVVIHKQLNTRNSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVIPWGVKLLLAWIRRRNY
ratón	SVLPRFTAKESRLVKGTVDVFCALNHFTTRFVVIHKQLNTRNSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVIPWGVKLLLAWIRRRNY
	920
humano	GDMDIYITASGIDDOALEDDRLRKYLLGKYLQEVLKAYLIDKVKRIKGYVAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNK
chMoHu	GDMDIYITASGIDDOALEDDRLRKYLLGKYLQEVLKAYLIDKVKRIKGYVAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNK
chHuMo	RDRDIYITANGIDDLALEDQIRKYYLEKYYVQEAALKAYLIDKVKIKGYVAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSK
ratón	RDRDIYITANGIDDLALEDQIRKYYLEKYYVQEAALKAYLIDKVKIKGYVAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSK

FIGURA 4C

	1000		
			1040
humano	VISSRGFFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRKFWKAKNLIQHIFLKKGK		
chMoHu	VISSRGFFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRKFWKAKNLIQHIFLKKGK		
chHuMo	LISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFIVEKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRKFKAKARNLQNIPLKKGH		
ratón	LISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFIVEKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRKFKAKARNLQNIPLKKGH		
humano	-RVVS	(SEQUENCE ID 297)	
chMoHu	--RVVS	(SEQUENCE ID 376)	
chHuMo	SRVFS	(SEQUENCE ID 374)	
ratón	SRVFS	(SEQUENCE ID 301)	

FIGURA 5A

	30		60
humano	MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTFESGDGRAI		
cyno	MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTFESGDGRAV		
ratón	MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMNSRALQRSVLSAFVLLRAVTFESGDGKAI		
conejo	MKPGCAAGSPGNEWVFSCTDERNRRCRETMSSGRLLRRSVMLSAFILLRAVTFEPGDGRAV		
hámster	MKAGCAAGSPGNEWIFLSSYERNTRSKKTMNSRALQRSVLSAFVLLRAVTLGSGDGKAI		
rata	MKTGCAAGSPGNEWVFFSDEERSTRSRKTMNSNGALQRSVLSALVLLRAVTFESGDGKAI		
perro	MKPGCAAGSPGNEWIFLSTDESNTHYRKTMCNHGLQRSVILSAFILLGAVPGFESGDGRAI		
	** *		
	90		120
humano	WSKNPNFTPVNESQLFLYDTFFPKNFFWVGIGTGALQVEGSWKKGKGPSIWDHFIHTHLKN		
cyno	WSKNPNFTPVNESQLFLYDTFFPKNFFWVGVTGALQVEGSWKKGKGPSIWDHFVHTHLKN		
ratón	WDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFFPKNFSWVGVTGAFQVEGSWKTDGRGPSIWDRIYVYSHLRG		
conejo	WSQNPNLSPVNESQLFLYDTFFPKNFFWVGVTGAFQVEGSWKKGKGLSVWDHFIATHLN--		
hámster	WDKKQYVSPVNASQLFLYDTFFPKNFFWVGVTGAFQVEGNWQADGRGPSIWDRIYTHLRD		
rata	WDKKQYVSPVNPQQLFLYDTFFPKNFSWVGVTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRIYVDSHLRG		
perro	WSKNPHFSPVNESQLFLYDTFFPKNFFWVGVTGAFQVEGNWKTGKGPSIWDHFIHTHLKN		
	* *		
	150		180
humano	VSSITNGSSDSYIFLEKDLSDLDFIGVSVFYQFSISWPRLPFDGIVTVANAKGLQYYSTLLD		
cyno	VSSITNGSSDSYIFLEKDLSDLDFIGVSVFYQFSISWPRLPFDGIVTVANAKGLQYINTLLD		
ratón	VNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFIGVSVFYQFSISWPRLPFPNGTVAAVNAQGLRYRALLD		
conejo	VSSRDGSSDSYIFLEKDLSDLDFIGVSVFYQFSISWPRLPFDGTVAVANAKGLQYINRLLD		
hámster	VSITEKSADSYIFLEKDLLALDFIGVSVFYQFSISWPRLPFPNGTVAAVNAKGLQYINKLLD		
rata	VNSTDRSTDSYVFEKDLLALDFIGVSVFYQFSISWPRLPFPNGTVAAVNAKGLQYRALLD		
perro	VNSMNSSDSYIFLEKDLSDLDFIGVSVFYQFSISWPRLPFDGIAAVANAKGLQYINSLLD		
	* *		

FIGURA 5B

	210		240
humano	ALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIH		
cyno	SLVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQFFGDRVKYWITIH		
ratón	SLVLRNIEPIVTLYHWDLPALTQEEYGGWKNAIMDLFNDYATYCFQFFGDRVKYWITIH		
conejo	SLLLNRNIEPVVTLYHWDLPWALQEKYGGWKNETLIDLNDYATYCFQFFGDRVKYWITIH		
hámster	SLILRNIEPVVTLYHWDLPALQEDYGGWKNAIMDLFNDYATYCFQFFGDRVKYWITIH		
rata	SLVLRNIEPIVTLYHWDLPALTQEEYGGWKNAIMDLFNDYATYCFQFFGDRVKYWITIH		
perro	ALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNETITDIFNDYATYCFQFFGDRVKYWITIH		
	* * * * *	* * * * *	* * * * *
		270	300
humano	NPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGLSITL		
cyno	NPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGLSITL		
ratón	NPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGLSITL		
conejo	NPYLVAWHGYGTGLHAPGEKGNVAAVYTVGHNLLKAHSKVWHNYNRNFRPHQKGLSITL		
hámster	NPYLVAWHGFATGMHAPGETGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGLSITL		
rata	NPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGLSITL		
perro	NPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTNFRPYQKGLSITL		
	* * * * *	* * * * *	* * * * *
		330	360
humano	GSHWIEPNRSENTMDFKCCQSMVSVLGFWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPFSEAEK		
cyno	GSHWIEPNRSENTMDILKCCQSMVSVLGFWFANPIHGDGDYPEGMKKLLSILPLFSEAEK		
ratón	GSHWIEPNRTDNMEDVINCSHSMSSVLGFWFANPIHGDGDYPEFMKT--GAMIPEFSEAEK		
conejo	GSHWIEPNRAESIVDILKCCQSMVSVLGFWFANPIHGDGDYPEVMTKLLSVLPFSEAEK		
hámster	GSHWIEPNKTENMADTISCSQHSMAFVLGFWFANPIHADGDYPEFMKT--LSTMPVFSEAEK		
rata	GSHWIEPNRTENMEDVINCSHSMSSVLGFWFANPIHGDGDYPEFMKT--SSVIPFSEAEK		
perro	GSHWIEPNRSENMDILKCCQSMVSVLGFWFANPIHNGDYPPEVMKKLLSTLPLFSEAEK		
	* * * * *	* * * * *	* * * * *

FIGURA 5C

	390	420
humano	HEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNSLNLREALNWKLEYNNPRILIAENGWF	
cyno	NEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNSLNLREALNWKLEYNNPRILIAENGWF	
ratón	EEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNSLNLRQVLNWKLEYDDPQLISENGWF	
conejo	NEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNSLNLRQVLNWKLEYGNPRILIAENGWF	
hámsters	EEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNSLNLRQVLNWKLEYDNPRLISENGWF	
rata	EEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNSLNLRQVLNWKLEYDNPRLISENGWF	
perro	NEVRGTADFFAFSFGPNNFKPQNTMAKMGQNSLNLREVLNWKLEYGNPRILIAENGWF	
	* * * * *	* * * * *
	450	480
humano	TDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFQDAYTIRRGLEY	
cyno	TDSHVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFQDAYTIRRGLEY	
ratón	TDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFQDAYTIRRGLEY	
conejo	TDSYVQTEDTTAIYMMKNFLNQLQAIRLDGVRVFGYTAWSLLDGFQDAYNTRRGLEY	
hámsters	TSDDIKTEDTTAIYMMKHFLNQLQAIQFDEIRVFGYTAWSLLDGFQDAYTSRRGLEY	
rata	TDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGFQDAYTIRRGLEY	
perro	TDSHVKTEDTTAIYMMKNFLNQLQAIRFDEIQVFGYTAWSLLDGFQDAYSTRRGLEY	
	* * * * *	* * * * *
	510	540
humano	VDFNSKQKERKPKSSAHYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVA	
cyno	VDFNSKQKERKPKSSAHYKQIIRENGFSLKEATPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVA	
ratón	VDFNSEQKERKPKSSAHYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTV	
conejo	VDFNSEQERRRPPKSSAHYKQVIGENGFTLREATPDLQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVA	
hámsters	VDFNSEQKERKPKTSAHYKQIIQENGFPLKESTPDMQGGQFPCDFSWGVTESVLKPEFMV	
rata	VDFNSEQKERKPKSSAHYKQIIQDNGFPLQESTPDMKGGQFPCDFSWGVTESVLKPEFTV	
perro	VDFNSKQKERKPKSSAYYKQIIQENGFTEKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPKVVA	
	* * * * *	* * * * *

FIGURA 5D

	570	600
humano	SSPQFSDFPHLYVWNATGNRLLRHVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTTHYRFA	
cyno	SSPQFSDFPHLYVWNATGNRLLRHVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTTHYRFA	
ratón	SSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA	
conejo	SSPQFSDFPHLYVWNATGNRMLHRVEGVRLKTRPAQCTDFITIKKQLEMLARMKVTTHFRFA	
hámster	SSPQFTDPHLYVWNATGNRLLRQVEGVRLKTKPSHCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA	
rata	SSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFA	
perro	SSPQFSDFPHLYVWNVTGNRLLRHVEGVRLKTRPAQCTDFVSIKKRQLEMLARMNVTHYRFA	
	***** ** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *	
	630	660
humano	LDWASVLPFTGNLSAVNRQALRYRCVWSEGLKLGISAMVTLYPETHAHLGLPEPILLHADG	
cyno	LDWASVLPFTGNLSAVNRQALRYRCVWSEGLKLGISAMVTLYPETHAHLGLPEPILLHAGG	
ratón	LDWTSILPTGNLSKVNQVRLRYRCVWSEGLKLGVPFPMVTLYHPETHSHLGLPLPILLSGG	
conejo	LDWASVLPFTGNLSEVNRQALRYRCVWTEGLKLNISPMVTLYPETHAHLGLPAPLLHSGG	
hámster	LDWATILPTGNLSEVNRQVRLRYRCVWSEGLKLGVPFPMVTLYHPETHSHLGLPEPILLSGG	
rata	LDWTSILPTGNLSKINRQVRLRYRCVWSEGLKLGISPMVTLYHPETHSHLGLPMPILLSGG	
perro	LDWPSILPTGNLSTVNRQALRYRCVWSESLKLSISPMVTLYPETHAHLGLPSPILLSGG	
	*** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *	
	690	720
humano	WLNPSAEAFQAYAGLGFQELGDLVKLWITINEPNRRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHA	
cyno	WLNPSVEAFQAYAGLGFQELGDLVKLWITINEPNRRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHA	
ratón	WLNMTAKAFQDYAELCFRELGDVVLWITINEPNRRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHA	
conejo	WLDPSAKAFRDYAGLGFRELGDVVLWITINEPNRRLSDVYNRTSNDTYQAAHNLLIAHA	
hámster	WLNITYAKAFQDYAGLGFQELGDLVKLWITINEPNRRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHA	
rata	WLNNTAKAFQDYAGLGFRELGDVVLWITINEPNRRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHA	
perro	WLNASTARAFQDYAGLGFQELGDLVKLWITINEPNRRLSDVYSHTSSDTYRAAHNLLIAHA	
	*** * ** ** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *	

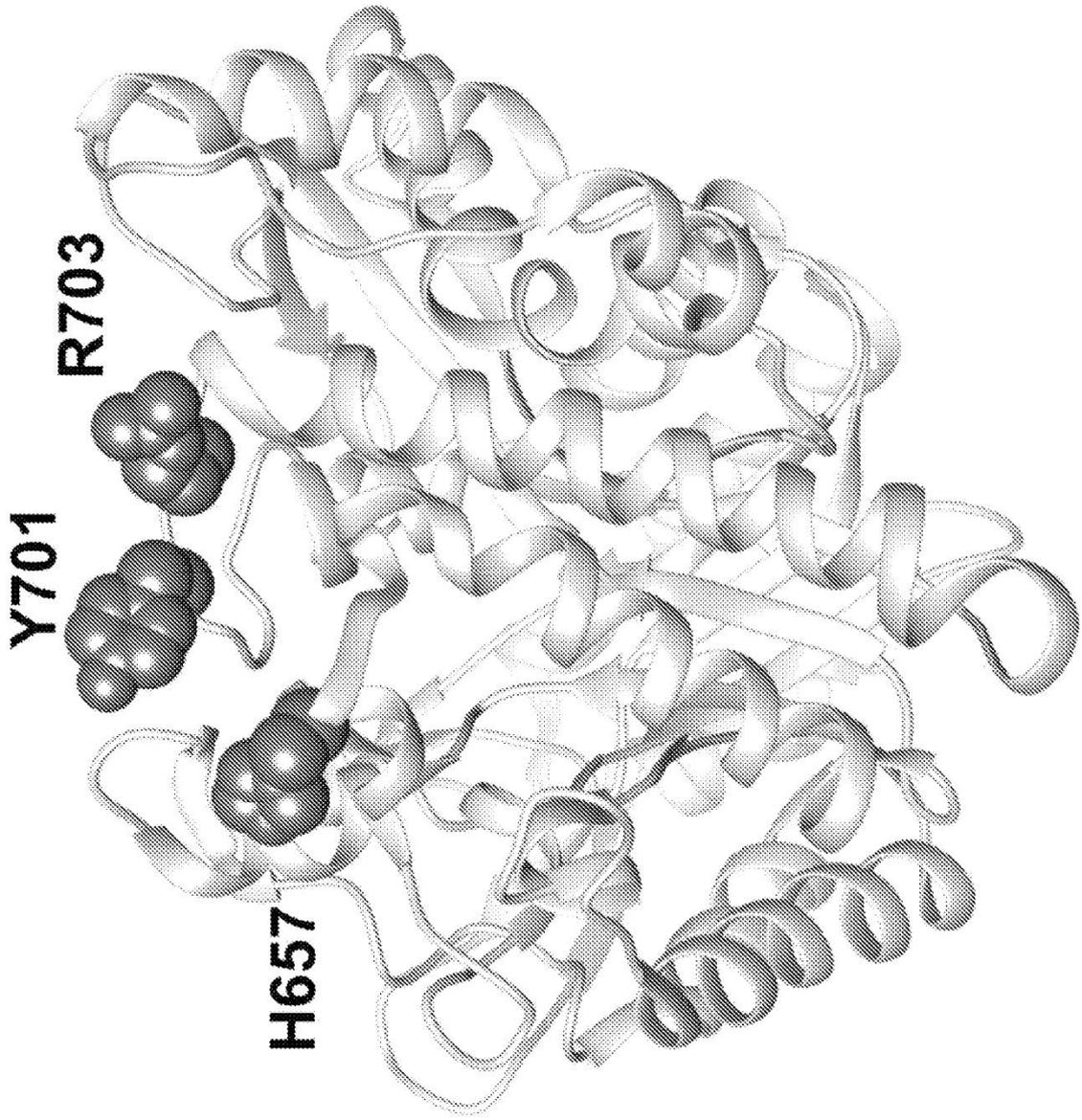


FIGURA 6