

ANTICUERPOS ANTI-GLUCAGÓN Y SU USOS

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se relaciona con anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a glucagón, composiciones que comprenden estos anticuerpos y métodos de uso de los mismos, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos que responden a la modulación de los niveles de glucagón, tales como trastornos diabéticos y otros trastornos metabólicos relacionados con glucagón, y trastornos similares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El glucagón es una hormona polipeptídica de 29 residuos que, en cooperación con la insulina, media en la regulación homeostática de la cantidad de glucosa en la sangre. El glucagón actúa principalmente estimulando ciertas células, por ejemplo, las células del hígado, para liberar glucosa cuando los niveles de glucosa en sangre caen. La acción del glucagón es opuesta a la de la insulina, que estimula las células para que tomen y almacenen la glucosa cada vez que los niveles de glucosa en sangre aumentan. El glucagón se produce en las células alfa del páncreas, mientras que la insulina es secretada por las células beta vecinas.

[0003] El desequilibrio entre el glucagón y la insulina puede jugar un papel importante en varias enfermedades, tales como diabetes mellitus y cetoacidosis diabética. En particular, los estudios han demostrado que los niveles más altos de glucagón basal y la falta de supresión de la secreción de glucagón postprandial contribuyen a las afecciones diabéticas en los seres humanos (Muller *et al.*, N Eng J Med 283: 109-115 (1970)).

[0004] Se cree que los efectos del glucagón en la elevación de los niveles de glucosa en sangre están en parte mediados por la activación de ciertas vías celulares que siguen después de la unión del glucagón (GCG) a su receptor (denominado GCGR). El GCGR es un miembro de la subfamilia de la secretina (familia B) de receptores acoplados a proteína G y se expresa predominantemente en el hígado. La unión del glucagón a su receptor desencadena una cascada de transducción de la señal de la proteína G, activando la AMP

cíclica intracelular y conduciendo a un aumento en la producción de glucosa mediante síntesis *de novo* (gluconeogénesis) y descomposición de glucógeno (glicogenólisis) (Wakelam *et al.* 1986) 323: 68-71, Unson *et al.*, Peptides, (1989), 10: 1, 171-1 177, y Pittner y Fain, Biochem, J. (1991), 277: 371-378).

[0005] La acción del glucagón puede suprimirse proporcionando un antagonista, tal como un anticuerpo de glucagón, como los descritos en el presente documento. Dichos anticuerpos pueden resultar útiles en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en la diabetes o en otras afecciones, tales como la hiperglucemia por estrés. Además, al reducir los niveles de glucosa, se pueden prevenir o mejorar algunas de las complicaciones a largo plazo asociadas con niveles elevados de glucosa en los pacientes diabéticos.

[0006] Los anticuerpos anti-glucagón se mencionan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.206.199; 4.221.777; 4.423.034; 4.272.433; 4.407.965; 5.712.105; WO2007/124463 y WO2013/081993. No obstante, existe una necesidad en la técnica de nuevos antagonistas de glucagón, tal como los anticuerpos anti-glucagón descritos en el presente documento, para reducir los niveles de glucosa en sangre en pacientes que sufren de diabetes y otros trastornos asociados con niveles elevados de glucagón.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

[0007] La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente al glucagón (GCG) y neutralizan su actividad.

[0008] En un primer aspecto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados (mAbs, por sus siglas en inglés) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al glucagón e inhiben o bloquean su actividad, por ejemplo, bloquean la unión del glucagón a su receptor, bloqueando así la elevación de los niveles de glucosa en sangre. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden ser útiles para reducir los niveles de glucosa en sangre en un sujeto que sufre de una enfermedad o afección caracterizada en parte por niveles aumentados de glucosa en sangre, tal como diabetes mellitus o hiperglucemia por estrés. Los anticuerpos también pueden usarse para tratar una amplia gama de afecciones y trastornos en los que se desea bloquear la interacción del

glucagón con el receptor de glucagón, con lo que se obtiene un efecto beneficioso. Los anticuerpos pueden utilizarse en última instancia para prevenir las complicaciones a largo plazo asociadas con niveles elevados de glucosa en sangre en pacientes diabéticos o para mejorar al menos un síntoma asociado con niveles elevados de glucosa en sangre en pacientes diabéticos.

[0009] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente y neutraliza la actividad del GCG, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes características:

- (a) es un anticuerpo monoclonal totalmente humano;
- (b) se une a GCG humano a 25 °C con una K_D de menos de alrededor de 1 nM y menos de alrededor de 5 nM a 37 °C, medida por resonancia de plasmones superficiales;
- (c) disminuye los niveles de glucosa en sangre en al menos alrededor de 10% cuando se administra a un mamífero como una dosis única, o como dosis múltiples de menos de alrededor de 40 mg/kg;
- (d) inhibe la activación mediada por GCG de células que expresan el receptor de glucagón humano (GCGR) con una CI_{50} de menos de alrededor de 1 nM;
- (e) comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 14, 130 y 146; o
- (f) comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138 y 154.

[0010] En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a GCG humano a 25 °C con una K_D que varía de alrededor de 50 pM a alrededor de 750 pM y de alrededor de 300 pM a alrededor de 5 nM a 37 °C, medida por resonancia de plasmones superficiales.

[0011] En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce los niveles de glucosa en sangre en alrededor de 10% a alrededor de 35% cuando se administra a un mamífero como una dosis única, o como dosis múltiples que varían de alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg.

[0012] En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la activación mediada por GCG de células que expresan el receptor de glucagón humano (GCGR) con una CI_{50} que varía de alrededor de 7 pM a alrededor de 950 pM.

[0013] En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce los niveles de glucosa en sangre en un mamífero cuando se administra a una dosis de alrededor de 30 mg/kg cada 1, 2, 3, 4 o 5 días.

[0014] En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce los niveles de glucosa en sangre en un mamífero cuando se administra a una dosis de alrededor de 30 mg/kg cada 5 días.

[0015] En una forma de realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo reduce los niveles de glucosa en sangre en un mamífero cuando se administra por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular.

[0016] Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender sólo una porción de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, $F(ab')_2$ o scFv), y pueden ser modificados para afectar la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar funciones efectoras residuales (Reddy *et al.*, 2000, J. Immunol., 164: 1925-1933).

[0017] Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-glucagón (anti-GCG) de la presente invención se enumeran en las Tablas 1 y 2 del presente documento. La Tabla 1 presenta los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (HCVR), regiones variables de cadena ligera (LCVR), regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 Y LCDR3) de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG. La Tabla 2 presenta identificadores de

secuencia de ácido nucleico de las HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG.

[0018] La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprende una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0019] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprende una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0020] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquier de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR contenido dentro de cualquiera de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG enumerados en la Tabla 1.

[0021] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a GCG y neutraliza al menos una actividad asociada con GCG, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (HCVR) seleccionadas del grupo que

consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130 y 146; y (b) tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (LCVR) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138 y 154.

[0022] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a GCG y neutraliza al menos una actividad asociada con GCG, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130 y 146 y una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138 y 154.

[0023] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a GCG y neutraliza al menos una actividad asociada con GCG, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/74; 82/90; 98/106; 114/122; 130/138 y 146/154.

[0024] En ciertas formas de realización, el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR comprende las SEQ ID NOs: 18/26.

[0025] En ciertas formas de realización, el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR comprende las SEQ ID NOs: 34/42.

[0026] En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a GCG y neutraliza al menos una actividad asociada con GCG, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

- (a) un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132 y 148;

- (b) un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134 y 150;
- (c) un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136 y 152;
- (d) un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140 y 156;
- (e) un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142 y 158; y
- (f) un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144 y 160.

[0027] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a GCG y neutraliza al menos una actividad asociada con GCG, en donde el anticuerpo comprende:

- (a) un dominio HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (b) un dominio HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;
- (c) un dominio HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;
- (d) un dominio LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;

- (e) un dominio LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y
- (f) un dominio LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

[0028] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a GCG y neutraliza al menos una actividad asociada con GCG, en donde el anticuerpo comprende:

- (a) un dominio HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;
- (b) un dominio HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
- (c) un dominio HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40;
- (d) un dominio LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44;
- (e) un dominio LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; y
- (f) un dominio LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

[0029] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar con una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0030] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar con una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0031] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar con una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0032] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden una CDR1 de cadena pesada (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar con una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0033] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden una CDR2 de cadena pesada (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar con una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0034] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden una CDR3 de cadena pesada (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una

secuencia sustancialmente similar con una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0035] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 contenida dentro de cualquiera de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 comprende la SEQ ID NO: 24/32.

[0036] La presente invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 comprende las SEQ ID NOs: 20-22-24-28-30-32. En ciertas formas de realización, el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 comprende las SEQ ID NOs: 36-38-40-44-46-48.

[0037] En una forma de realización relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR como se define para cualquiera de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a GCG, que comprenden las secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR

seleccionado del grupo consistente en: 18/26; 34/42; 50/58; 66/74; 82/90; 98/106; 114/122; 130/138 y 146/154. Los métodos y técnicas para identificar CDRs dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y pueden usarse para identificar CDRs dentro de las secuencias de aminoácidos especificadas de HCVR y/o LCVR descritas en el presente documento. Ejemplos de convenciones que se pueden utilizar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales, y la definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991); Al-Lazikani *et al.*, J. Mol.Biol. 273: 927-948 (1997); y Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989). También están disponibles bases de datos públicas para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

[0038] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal totalmente humano o fragmento de unión a antígeno del mismo que neutraliza la actividad del GCG, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130 y 146; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138 y 154; (iii) comprende un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136 y 152, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%; y un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144 y 160, o una secuencia sustancialmente similar que tiene al menos una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%; (iv) comprende un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132 y 148, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %,

al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%; un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 108, 134 y 150, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%; un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140 y 156, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%; y un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142 y 158, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%; (v) muestra una K_D de menos de alrededor de 1 nM a 25 °C y menos de alrededor de 5 nM a 37 °C medida por resonancia de plasmones superficiales; (vi) reduce los niveles de glucosa en sangre al menos en un 10% cuando se administra a un mamífero en una dosis única o en dosis múltiples de menos de alrededor de 40 mg/kg; (vi) inhibe la activación de GCG de células que expresan el receptor de glucagón humano con una CI_{50} de menos de alrededor de 1 nM.

[0039] En un segundo aspecto, la presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-GCG o porciones de los mismos. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0040] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0041] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0042] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0043] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%

[0044] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma.

[0045] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR2

enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%

[0046] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma

[0047] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como está definido por cualquiera de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG enumerados en la Tabla 1.

[0048] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como está definido por cualquiera de los ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-GCG enumerados en la Tabla 1.

[0049] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos del 99% con la misma, y una secuencia polinucleotídica seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una sustancialmente similar a la misma, que tiene una

identidad de secuencia de al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con la misma. En ciertas formas de realización de acuerdo con este aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y LCVR, en donde la HCVR y la LCVR ambas derivan del mismo anticuerpo anti-GCG enumerado en la Tabla 1.

[0050] La presente invención también proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-GCG. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR como se exponen en la Tabla 1. También se incluye dentro del alcance de la presente invención células hospederas en las que se han introducido tales vectores, así como los métodos para producir los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células hospederas en condiciones que permiten la producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y la recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo así producidos.

[0051] La presente invención incluye anticuerpos anti-GCG que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas formas de realización, puede ser útil la modificación para eliminar sitios de glicosilación indeseables, o, por ejemplo, un anticuerpo que carece de la presencia de un resto de fucosa en la cadena de oligosacáridos, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase Shield *et al.*, 2002) 277: 26733). En otras aplicaciones, se puede realizar la modificación de galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0052] En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano recombinante o fragmento del mismo, que se une específicamente a GCG y un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención caracteriza una composición, que es una combinación de un anticuerpo anti-GCG y un segundo agente terapéutico. En una forma de realización, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina ventajosamente con un anticuerpo anti-GCG.

[0053] En una forma de realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente capaz de reducir la glucosa en sangre o reducir al menos un síntoma en un paciente que sufre de una enfermedad o afección caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, tal como diabetes mellitus.

[0054] En ciertas formas de realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que ayuda a contrarrestar o reducir cualquier/cualesquiera posible(s) efecto(s) secundario(s) asociado(s) con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención, si dicho(s) efecto(s) se presenta(n). Por ejemplo, en el caso de que cualquiera de los anticuerpos anti-GCG aumente los niveles de lípidos o colesterol, puede ser beneficioso administrar un segundo agente que sea efectivo para reducir los niveles de lípidos o colesterol.

[0055] El segundo agente terapéutico puede ser un fármaco de molécula pequeña, una proteína/polipéptido, un anticuerpo, una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula antisentido, o un ARNsi. El segundo agente terapéutico puede ser sintético o derivado naturalmente.

[0056] En una forma de realización, el segundo agente terapéutico puede ser un antagonista del receptor del glucagón, o un segundo antagonista del glucagón, tal como otro anticuerpo del glucagón, como los descritos en el presente documento, o un anticuerpo que es diferente de los anticuerpos descritos en el presente documento. También se podrá apreciar que los anticuerpos y composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden emplear en terapias de combinación, es decir, los anticuerpos y composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse simultáneamente, antes o después de uno o más de otros agentes terapéuticos o procedimientos médicos deseados. La combinación particular de terapias (agentes terapéuticos o procedimientos) que se desea emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea conseguir. También se podrá apreciar que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un anticuerpo puede administrarse simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden conseguir efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). Como se usan en el presente documento, los agentes

terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad o afección en particular, son apropiados para la enfermedad o afección que se está tratando.

[0057] En una forma de realización, los anticuerpos anti-GCG de la invención pueden usarse en combinación con uno o más de los siguientes tratamientos para la diabetes actualmente disponibles. Estos incluyen una biguanida (metformina), una sulfonilurea (tal como gliburida, glipizida), un agonista del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR) (por ejemplo pioglitazona, rosiglitazona), un inhibidor de alfa glucosidasa (por ejemplo, acarbosa, voglibosa). Los tratamientos adicionales incluyen tratamientos inyectables tales como un agonista del péptido similar al glucagón tipo 1 o un análogo de éste (por ejemplo, BYETTA® (exenatida), VICTOZA® (liraglutida), TANZEUM™ (albiglutida), TRULICITY™ (dulaglutida) o LYXUMIA® (lixisenatida)), o con un análogo de amilina, tal como SYMLIN® (pramlintida).

[0058] En ciertas formas de realización, la composición puede incluir un segundo agente seleccionado del grupo que consiste de secretagogos distintos a sulfonilurea, insulina, análogos de insulina, incluyendo los de acción rápida (por ejemplo, Lispro, Aspart, Glulisina) y los de acción prolongada (por ejemplo, insulina Detemir, insulina Degludec, o la insulina Glargina, polipéptidos exendin-4, agonistas del receptor adrenérgico beta 3, agonistas de PPAR, un inhibidor de dipeptidil peptidasa IV(DPP-4) (por ejemplo, saxagliptina (ONGLYZA®), sitagliptin (JANUVIA®), y vildagliptina (GALVUS®)), un inhibidor del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) (por ejemplo, INVOKANA™ (canagliflozina)), FORXIGA® (dapagliflozina), empagliflozina, ipragliflozina, tofogliflozina, estatinas y combinaciones que contienen estatinas, inhibidores de la absorción del colesterol y/o re-absorción de ácidos biliares, antagonistas de colesterol LDL, antagonistas de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, antagonistas del receptor de endotelina, antagonistas de la hormona del crecimiento, sensibilizadores de insulina, miméticos o agonistas de amilina, antagonistas del receptor cannabinoide, agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1, melanocortinas, agonistas del receptor de la hormona concentradora de melanina, IRSNs, un mimético del factor 21 de crecimiento de fibroblastos (FGF21) (véase, por ejemplo, US20110002845 y US20080261236), un antagonista del

receptor del factor 1c de crecimiento de fibroblastos (FGFR1c) (Véase, por ejemplo, US20110150901), un inhibidor de la formación de productos finales de la glicación avanzada, tal como, pero no limitados a, aminoguanidina, e inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa.

[0059] En ciertas formas de realización, la composición puede incluir un segundo agente para ayudar a reducir los niveles de lípidos o de colesterol y puede incluir un agente tal como un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) (por ejemplo, una estatina tal como atorvastatina, (LIPITOR®), fluvastatina (LESCOL®), lovastatina (MEVACOR®), pitavastatina (LIVALO®), pravastatina (PRAVACHOL®), rosuvastatina (CRESTOR®) y simvastatina (ZOCOR®) y similares. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden combinar con un agente tal como VYTORIN®, que es una preparación de una estatina y otro agente, tal como ezetimiba/simvastatina.

[0060] En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso administrar los anticuerpos de la invención en combinación con uno cualquiera o más de los siguientes: (1) niacina, la que aumenta el catabolismo de las lipoproteínas; (2) fibratos o ácidos carboxílicos anfipáticos, que reducen el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL), mejoran las lipoproteína de alta densidad (HDL) y los niveles de triglicéridos (TG), y reducen el número de infartos de miocardio no fatales; y (3) activadores del factor de transcripción de LXR que tiene un papel en la eliminación del colesterol, tal como, del 22-hidroxicolesterol, o combinaciones fijas como VYTORIN® (ezetimiba más simvastatina); una estatina con una resina de la bilis (por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesevelam), una combinación fija de niacina más una estatina (por ejemplo, niacina con lovastatina); o con otros agentes reductores de lípidos tales como ésteres etílicos de los ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, Omacor). Además, el segundo agente terapéutico puede ser uno o más de otros inhibidores de glucagón o del receptor de glucagón, así como también inhibidores de otras moléculas, tales como la proteína 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), proteína 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), proteína 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), proteína 8 de tipo angiopoyetina (ANGPTL8), que están involucradas en el metabolismo de los lípidos, en particular, en la homeostasis del colesterol y/o los

triglicéridos. Los inhibidores de estas moléculas incluyen moléculas pequeñas y anticuerpos que se unen específicamente a estas moléculas y bloquean su actividad.

[0061] En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso administrar los anticuerpos anti-GCG de la invención en combinación con un ácido nucleico que inhibe la actividad de hPCSK9, tal como una molécula antisentido, un ARN de cadena doble, o una molécula de ARNsi. Ejemplos ilustrativos de moléculas de ácido nucleico que inhiben la actividad de PCSK9 se describen en US2011/0065644, US2011/0039914, US2008/0015162 (ahora US9045754) y US2007/0173473.

[0062] En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso administrar los anticuerpos anti-GCG de la invención en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a hPCSK9 e inhibe su actividad, en donde dichos anticuerpos actúan para reducir los niveles de lípidos o colesterol. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-hPCSK9 se describen en US2010/0166768 (ahora US8062640). El anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 humana, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se pueden administrar en una dosis que varía desde alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg. Se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples. El anticuerpo anti-hPCSK9 se puede administrar simultáneamente con el anticuerpo anti-GCG, o se puede administrar antes o después del anticuerpo anti-GCG.

[0063] En un cuarto aspecto, la invención presenta un anticuerpo humano anti-hGCGR o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende una HCVR codificada por segmentos de la secuencia de nucleótidos derivada de las secuencias de línea germinal V_H, D_H y J_H, y una LCVR codificada por segmentos de la secuencia de nucleótidos derivada de las secuencias de línea germinal V_K y J_K, con combinaciones como se muestra en la Tabla 3.

[0064] En un quinto aspecto, la invención presenta métodos para inhibir la actividad de GCG utilizando un anticuerpo anti-GCG o porción de unión al antígeno del anticuerpo de la invención, en donde los métodos terapéuticos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar

para tratar cualquier afección o trastorno, que se mejora, alivia, inhibe o previene por la eliminación, inhibición o reducción de la actividad de GCG.

[0065] En una forma de realización, los anticuerpos se pueden usar para prevenir la aparición de una enfermedad o trastorno caracterizado, en parte, por niveles elevados de glucosa en sangre, o para evitar la probabilidad de desarrollar tal enfermedad o trastorno, o para mitigar la severidad de la enfermedad o trastorno, o al menos un síntoma asociado con la enfermedad o trastorno. Se contempla que los anticuerpos de la invención se pueden usar solos, o como terapia complementaria con otros agentes o métodos conocidos por ser tratamientos convencionales para pacientes que sufren de enfermedades o afecciones caracterizadas, en parte, por niveles elevados de glucosa o cetonas en sangre, tales como, pero no limitadas a, diabetes. Tal terapia estándar puede incluir la administración de líquidos, o administración de otros agentes farmacéuticos útiles para reducir la glucosa, cetonas, o lípidos en sangre, o para la reducción de peso.

[0066] Los anticuerpos anti-GCG de la invención pueden funcionar para bloquear la interacción entre el glucagón y su receptor, inhibiendo de este modo los efectos de elevar la glucosa producidos por el glucagón. El uso de antagonistas de glucagón, tales como los anticuerpos descritos en el presente documento, puede ser un medio efectivo para alcanzar niveles normales de glucosa, con lo que se mejora o previene uno o más síntomas o complicaciones a largo plazo asociadas con, por ejemplo, la diabetes. El uso de antagonistas de glucagón, tales como los anticuerpos descritos en el presente documento, también puede ser un medio efectivo para alcanzar niveles normales de glucosa en pacientes no diabéticos que experimentan hiperglucemia como resultado de condiciones o trastornos no relacionados con la diabetes, tales como la hiperglucemia perioperatoria (hiperglucemia observada en los pacientes justo antes de la cirugía o después de la cirugía). En ciertas formas de realización, en los métodos de reducción de los niveles de glucosa o los niveles de cetona en sangre en la cetoacidosis diabética se contempla el uso de los anticuerpos de la invención. En ciertas formas de realización, en los métodos de tratamiento de los pacientes para lograr una reducción en el peso corporal, o para prevenir el aumento de peso, o para mantener un peso corporal normal, también contempla el uso de los anticuerpos de la invención.

[0067] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles para mejorar afecciones tales como, por ejemplo, intolerancia a la glucosa, obesidad, o para prevenir el aumento de peso, o para el tratamiento de afecciones diabéticas, o para prevenir o reducir la severidad de una o más complicaciones a largo plazo asociadas con la diabetes, tales como nefropatía, neuropatía, retinopatía, cataratas, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, alteración de la cicatrización de las heridas y otras complicaciones asociadas con la diabetes, conocidas por los expertos en la técnica.

[0068] En una forma de realización, los anticuerpos de la invención pueden usarse para el tratamiento de la hiperglucemia por estrés, o para prevenir la probabilidad de aparición de hiperglucemia por estrés en un paciente, (también conocida como “hiperglucemia inducida por estrés”), comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un anticuerpo de glucagón de la invención, en donde el paciente presenta niveles elevados de glucosa en sangre causados o exacerbados por, uno o más estímulos que inducen estrés o uno o más de estímulos que inducen la elevación de la glucosa. En una forma de realización, el paciente se identifica sobre la base de que presenta un nivel de glucosa en sangre mayor que alrededor de 140 mg/dL.

[0069] En una forma de realización, el estímulo inductor de estrés o el estímulo elevador de la glucosa se selecciona entre el grupo que consiste en: diabetes pre-existente de tipo 1 o de tipo 2; deshidratación hipertónica; infusión de vasopresores de catecolamina; tratamiento con glucocorticoides; obesidad; envejecimiento; administración excesiva de dextrosa; nutrición parenteral, nutrición enteral, pancreatitis; septicemia; derrame cerebral; traumatismo craneoencefálico; hipotermia; hipoxemia; uremia; cirrosis; anestesia; estancias hospitalarias preoperatoria o postoperatoria (hiperglucemia perioperatoria); admisión en una sala de emergencia, un centro de trauma, o una unidad de cuidados intensivos; estancias hospitalarias prolongadas; procedimientos quirúrgicos; una infección; o una enfermedad crónica.

[0070] Otras afecciones o trastornos que se pueden tratar con los métodos terapéuticos de la invención incluyen la cetoacidosis diabética, hiperglucemia perioperatoria, hiperglucemia en el paciente en una unidad de cuidados intensivos, síndrome diabético hiperosmolar

hiperglucémico, hiperglucemia en pacientes con quemaduras, hiperglucemia es pacientes que sufren de una afección cardíaca, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, síndrome de resistencia a la insulina, glucosa en ayunas alterada, o la hiperglucemia asociados con hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, y dislipidemias en general.

[0071] Los métodos terapéuticos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención a un sujeto que lo necesita. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejora, alivia, inhibe o previene al administrar el GCG.

[0072] Los anticuerpos pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con glucagonoma inoperable (tumor endocrino pancreático con o sin eritema necrolítico migratorio e hiperglucemia).

[0073] Los anticuerpos de la invención se pueden usar como terapia a corto plazo en un entorno agudo, o pueden ser concebidos para el uso a largo plazo como terapia crónica.

[0074] Otras formas de realización se pondrán de manifiesto a partir de una revisión de la descripción detallada que se entrega a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0075] Antes de describir la presente invención, se debe entender que esta invención no se limita a los métodos particulares y las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada en este documento se usa sólo con el propósito de describir formas de realización particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0076] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece esta invención. En el presente documento, el término “alrededor de”, cuando se usa en referencia a un valor numérico citado

particular, significa que el valor puede variar desde el valor indicado en no más de un 1%. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, la expresión “alrededor de 100” incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4; etc.).

[0077] Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones no patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

Definiciones

[0078] “Glucagón” o “GCG”, y o términos similares, como se usan en el presente documento, se refieren a glucagón humano (a menos que se indique explícitamente que el glucagón es de otra especie), que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 161. Ver también los residuos de aminoácidos 53-81 del número de acceso NP_002045.1.

[0079] Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas en el presente documento se emplean para referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectivo, a menos que se indique explícitamente que el glucagón es de una especie no humana. Por lo tanto, la expresión “GCG” significa GCG humano, a menos que se indique explícitamente que el glucagón es de una especie no humana, por ejemplo, “GCG ratón”, “GCG de mono”, etc.

[0080] El término “proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 humana” o “hPCSK9”, como se usa en el presente documento, se refiere a hPCSK9 codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 162 y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 163, o un fragmento biológicamente activo de la misma.

[0081] Las formas de realización específicas, de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención puede conjugarse con un resto terapéutico (“inmunoconjugado”), tal como un segundo antagonista de GCG, o con biguanida (metformina), una sulfonilurea (por ejemplo, gliburida, glipizida), un agonista PPAR gamma (por ejemplo, pioglitazona, o

osiglitazona), un inhibidor de la alfa glucosidasa (tales como acarbosa, o voglibosa), BYETTA® (péptido 1 similar al glucagón), SYMLIN® (pramlintida), o cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una enfermedad o afección causada, en parte, por la actividad indeseada de glucagón.

[0082] Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo anti-GCG” incluye tanto anticuerpos monovalentes con una única especificidad, así como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a GCG y un segundo brazo que se une a un segundo antígeno (diana), en donde el brazo anti-GCG comprende cualquiera de las secuencias HCVR/LCVR o CDR como se establecen en la Tabla 1 en el presente documento.

[0083] El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente o interactúa con un antígeno particular (por ejemplo, GCG). El término “anticuerpo” incluye moléculas de inmunoglobulina que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviado en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes formas de realización de la invención, las FR del anticuerpo anti-GCG (o porción de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden estar natural o artificialmente modificadas. Una secuencia de consenso de aminoácidos se puede definir sobre la base de un análisis side-by-side de dos o más CDRs.

[0084] El término “anticuerpo”, como se usa en este documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo, y similares, como se usa en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, enzimáticamente obtenible, sintética, u obtenida mediante ingeniería genética, que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpos completos utilizando cualquiera de las técnicas estándar adecuadas, tales como digestión proteolítica o técnicas recombinantes de manipulación genética que implican la manipulación y la expresión de dominios variables y opcionalmente constantes de ADN que codifica un anticuerpo. Tal ADN se conoce y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bancos de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fagos-anticuerpos), o se pueden sintetizar. El ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

[0085] Ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR) tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas diseñadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio suprimido, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIPs), y dominios variables IgNAR de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno”, como se usa en el presente documento.

[0086] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y comprenderá generalmente al menos una CDR, que es adyacente a, o dentro del marco de lectura marco de, una o más secuencias de marco. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados en cualquier disposición adecuada entre sí. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H-V_H , V_H-V_L o V_L-V_L . Alternativamente, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

[0087] En ciertas formas de realización, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Ejemplos no limitantes de configuraciones de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-CH1-C_H2$; (v) $V_H-CH1-C_H2-CH3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; y (xiv) V_L-C_L . En cualquier configuración de los dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de los ejemplos de configuraciones enumerados anteriormente, los dominios variable y constante pueden estar, o bien, directamente unidos entre sí o pueden estar unidos por una región enlazadora o bisagra completa o parcial. Una región bisagra puede constar de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado una unión flexible o semi-flexible entre dominios variable y/o uno constante adyacentes en una única molécula de polipéptido. Por otra parte, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominios variable y constante mencionados anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más puentes disulfuros).

[0088] Al igual que con las moléculas de anticuerpos completos, los fragmentos de unión a antígeno puede ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá típicamente al

menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos aquí descritos, puede ser adaptado para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

[0089] El término “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, se pretende que incluya anticuerpos humanos de origen no natural. El término incluye anticuerpos que son producidos de forma recombinante en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

[0090] Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas formas de realización, ser anticuerpos humanos recombinantes. El término “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera (que se describe con más detalle más adelante), anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes (que se describe con más detalle más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6.287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. En ciertas formas de realización, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque están relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

[0091] Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende un constructo de cuatro cadenas estable de alrededor de 150 a 160 kDa en el que los dímeros se mantienen unidos por un enlace disulfuro intracatenario entre cadenas pesadas. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de enlaces disulfuro intracatenarios y se forma una molécula de alrededor de 75 a 80 kDa compuesta de una cadena pesada y ligera acopladas de forma covalente (medio-anticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

[0092] La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intacta se debe, pero no está limitada, a diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un solo aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology*. 30:105) a los niveles normalmente observados usando una bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la bisagra, región C_H2 o C_H3, lo que por ejemplo puede ser deseable en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma anticuerpo deseado.

[0093] El término “se une específicamente” o “específicamente se une a”, o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de equilibrio de disociación de al menos alrededor de 1×10^{-6} M o menos (por ejemplo, una K_D más pequeña denota una unión más fuerte). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales, y similares. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos han sido identificados por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™, que se unen específicamente a GCG. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a la proteína GCG y a uno o más antígenos adicionales o un anticuerpo biespecífico que se une a dos diferentes regiones de GCG, se consideran, aun así, anticuerpos que “específicamente se unen a”, tal como se usa en el presente documento.

[0094] Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos aislados. Un “anticuerpo aislado”, como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado desde al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que ha sido separado o extraído de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o una célula, en donde el anticuerpo existe o se produce de forma natural, es para los propósitos de la presente invención un “anticuerpo aislado”. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. anticuerpos aislados son anticuerpos que han sido sometidos al menos a una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas formas de realización, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0095] Los anticuerpos anti-GCG descritos en este documento puede comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera. Tales mutaciones se pueden determinar fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento y secuencias disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Una vez obtenido, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones se pueden someter a ensayo fácilmente para determinar una o más propiedades deseadas, tal como, especificidad de unión aumentada, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o aumentadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Dentro de la presente invención están comprendidos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general.

[0096] La presente invención también incluye anticuerpos anti-GCG que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR descritas en este documento que tiene una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-GCG que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR indicadas en la Tabla 1 en el presente documento.

[0097] Un “anticuerpo bloqueante” o un “anticuerpo neutralizante”, como se usa en el presente documento (o un “anticuerpo que neutraliza la actividad de GCG”), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión al glucagón impide o bloquea la unión de éste último con el receptor de glucagón, lo que resulta en la inhibición de al menos una actividad biológica del GCG. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ayudar a prevenir el aumento de los niveles de glucosa en sangre asociados con la elevación de los niveles de glucagón. Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede demostrar tener la capacidad de bloquear la producción de AMPc en respuesta al glucagón. Esta inhibición de la actividad biológica del GCG se puede evaluar mediante la medición de uno o más indicadores de actividad biológica de GCG mediante uno o más de varios ensayos estándares *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica.

[0098] El término “resonancia de plasmones superficiales”, como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ).

[0099] El término “ K_D ”, como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

[0100] El término “epítopo” se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un parátopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas de un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser, ya sea, conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente juxtapuestos pertenecientes a diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En ciertas circunstancias, un epítopo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo en el antígeno.

[0101] El término “identidad sustancial” o “sustancialmente idénticos”, cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean óptimamente con inserciones o supresiones nucleotídicas apropiadas frente a otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos alrededor de 95%, y más preferentemente al menos alrededor de 96%, 97%, 98% o 99% de las bases nucleotídicas, identidad medida por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se discute a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos o una sustancialmente similar a la del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

[0102] Tal como se aplica a polipéptidos, la expresión “similitud sustancial” o “sustancialmente similares” significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante el programas GAP o BESTFIT usando los pesos de los huecos por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos 95%, incluso más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 98% o 99%. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieran entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad o grado de similitud de secuencia pueden ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, incorporada aquí como referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e

histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y las (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos aminoacídicos de sustitución conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina. Como alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445, incorporada aquí por referencia. Un reemplazo “moderadamente conservador” es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad PAM250.

[0103] En el caso de los polipéptidos, la similitud de secuencia, que también se denomina identidad de secuencia, se mide típicamente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, software GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que se pueden utilizar con los parámetros por defecto para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos, o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA empleando parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones con la mejor superposición entre las secuencias de consulta y la de búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, utilizando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, cada uno incorporado en este documento por referencia.

[0104] Por la frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá de la finalidad del tratamiento, y será determinable por un experto en la técnica usando técnicas

conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[0105] El término “nivel de glucosa sanguínea”, o “nivel de glucosa en sangre” se refiere a la concentración de glucosa en la sangre. En ciertas formas de realización, un nivel de glucosa en sangre es un nivel de glucosa en plasma. La glucosa en plasma se puede determinar de acuerdo con Etgen *et al.*, (Metabolism 2000; 49(5): 684-688) o se calcula a partir de una conversión de la concentración de glucosa en sangre total de acuerdo con D'Orazio *et al.*, (Clin. Chem. Lab. Med. 2006; 44(12): 1486-1490).

[0106] Los “niveles normales de glucosa” se refiere a los valores medios de glucosa en plasma en los seres humanos de menos de alrededor de 100 mg/dL para los niveles de ayuno, y menos del 110-120 mg/dL para los niveles posprandiales de 2 horas o 125 mg/dL para glucosa al azar. La glucosa en plasma se puede determinar de acuerdo con Etgen *et al.*, (Metabolism 2000; 49(5): 684-688) o se calcula a partir de una conversión de la concentración de glucosa en sangre total de acuerdo con D'Orazio *et al.*, (Clin. Chem. Lab. Med. 2006; 44(12): 1486-1490). En ciertas formas de realización de la invención, los anticuerpos anti-GCG pueden ser útiles para reducir los niveles de glucosa en sangre a valores dentro del intervalo normal.

[0107] El término “nivel de glucosa sanguínea elevada” o “niveles elevados de glucosa en sangre” se entenderá como un nivel elevado de glucosa en la sangre, como el que se encuentra en un sujeto que tiene un nivel basal clínicamente inapropiado e hiperglucemia postprandial, o tal como la que se encuentra en un sujeto en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (oGTT), con “niveles elevados de glucosa en sangre” mayores que alrededor de 100 mg/dL cuando se analiza en condiciones de ayuno, y mayor que alrededor de 200 mg/dL cuando se analiza a la 1 hora.

[0108] El término “hiperglucemia por estrés”, que se utiliza de forma intercambiable con “hiperglucemia inducida por estrés”, se refiere a una condición en la que un paciente sufre de un aumento transitorio de la glucosa en sangre (> 140 mg/dL) que está temporalmente asociado a estrés o a una lesión o enfermedad aguda. La hiperglucemia por estrés puede ocurrir en pacientes con o sin antecedentes de diabetes. La causa se cree que está

directamente relacionada con el estrés de la enfermedad médica subyacente, la anestesia, cirugía o trauma.

[0109] La hiperglucemia por estrés es el resultado de, o puede ser exacerbada por, uno o más de los siguientes factores de riesgo, afecciones o terapias: la diabetes preexistente tipo 1 o tipo 2; deshidratación hipertónica; infusión de vasopresores de catecolamina; tratamiento con glucocorticoides; obesidad; envejecimiento; administración excesiva de dextrosa; nutrición parenteral, nutrición enteral, pancreatitis; septicemia; derrame cerebral; traumatismo craneoencefálico; hipotermia; hipoxemia; uremia; cirrosis; anestesia; estancias hospitalarias preoperatoria o postoperatoria (hiperglucemia perioperatoria); admisión en una sala de emergencia, un centro de trauma, o una unidad de cuidados intensivos; estancias hospitalarias prolongadas; procedimientos quirúrgicos; una infección; o una enfermedad crónica.

[0110] El término “estado crítico”, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a un paciente que sufre de una enfermedad, trastorno, lesión, cirugía, u otra condición que requiere el tratamiento o seguimiento en una unidad de cuidados críticos, o una unidad de cuidados intensivos de un hospital. En su sentido más amplio, el término paciente “crítico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente que ha sufrido o está en riesgo de sufrir una falla orgánica simple o múltiple aguda que amenaza la vida. Un paciente críticamente enfermo puede ser un “paciente diabético”, por ejemplo, un paciente que ha sido diagnosticado de diabetes usando ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica; o un “paciente no diabético”, por ejemplo, un paciente que ha sido diagnosticado como no diabético usando métodos estándares conocidos por los expertos en la técnica.

[0111] El término “no críticamente enfermo”, o “no crítico” se refiere a un paciente hospitalizado que sufre de una enfermedad, trastorno o estado que no requiere tratamiento o el seguimiento en una unidad de cuidado crítico o unidad de cuidados intensivos de un hospital. En su sentido más amplio, el término paciente “no crítico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente que no ha sufrido o que no está en riesgo de sufrir una falla orgánica simple o múltiple aguda mortal debido a una enfermedad, lesión, procedimiento quirúrgico, o cualquier otra condición.

[0112] El término “Unidad de Cuidados Intensivos” (UCI, como se denomina el presente documento), tal como se utiliza aquí, se refiere a la parte de un hospital donde son tratados los pacientes críticamente enfermos. Esto puede variar de un país a otro e incluso de hospital en hospital y esta parte del hospital puede que no sea necesaria, oficialmente, llevará el nombre de “Unidad de Cuidados Intensivos” o una traducción o derivación la misma. El término “unidad de cuidados intensivos” también cubre cualquier unidad de salud que trata a los pacientes con enfermedades potencialmente mortales que requieren una constante estrecha y estrecha vigilancia y apoyo del equipo y de medicamentos con el fin de mantener las funciones corporales normales.

[0113] El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: mejora de la glucosa en sangre dentro de alrededor de 80 a 180 mg/dL, o hasta dentro de alrededor de 80 a 140 mg/dL o una mejora en una o varias afecciones, enfermedades o síntomas asociados o resultantes de niveles elevados de glucosa en sangre, incluyendo, pero no limitados a, la susceptibilidad a infecciones, insuficiencia orgánica, discapacidad después de accidente cerebrovascular, polineuropatía, arritmia, o mortalidad en los pacientes. Además, “tratar” con una antagonista/anticuerpo de glucagón de la invención puede dar lugar a un resultado clínico beneficioso o deseado, que puede incluir una mejora en el nivel de glucosa en sangre dentro de un intervalo alrededor de 80 a 180 mg/dL, o hasta de alrededor de 80 a 140 mg/dL, en cualquier afección o enfermedad que resulta de la exposición a cualquiera de uno o más de un estímulo inductor de estrés o un estímulo elevador de la glucosa seleccionado del grupo que consiste en: diabetes preexistente tipo 1 o tipo 2; deshidratación hipertónica; infusión de vasopresores de catecolamina; tratamiento con glucocorticoides; obesidad; envejecimiento; administración excesiva de dextrosa; nutrición parenteral, nutrición enteral, pancreatitis; septicemia; derrame cerebral; traumatismo craneoencefálico; hipotermia; hipoxemia; uremia; cirrosis; anestesia; estancias hospitalarias preoperatoria o postoperatoria (hiperglucemia perioperatoria); admisión a una sala de emergencia, un centro de trauma, o una unidad de cuidados intensivos; estancias hospitalarias prolongadas; procedimientos quirúrgicos; una infección; o una enfermedad crónica. “Tratar” con un antagonista/anticuerpo de glucagón de

la invención también puede conducir a la prevención de la aparición de hiperglucemia por estrés, o a la prevención de la probabilidad de aparición de hiperglucemia por estrés.

[0114] Un “estímulo inductor de estrés”, que se utiliza de forma intercambiable con un “estímulo elevador de la glucosa”, se refiere a un evento que promueve la elevación de la glucosa en sangre a niveles superiores a lo normal. Los ejemplos de un “estímulo inductor de estrés”, o un “estímulo elevador de la glucosa” incluyen uno cualquiera o más de los siguientes: diabetes preexistente tipo 1 o tipo 2; deshidratación hipertónica; infusión de vasopresores de catecolamina; tratamiento con glucocorticoides; obesidad; envejecimiento; administración excesiva de dextrosa; nutrición parenteral, nutrición enteral, pancreatitis; septicemia; derrame cerebral; traumatismo craneoencefálico; hipotermia; hipoxemia; uremia; cirrosis; anestesia; estancias hospitalarias preoperatoria o postoperatoria (hiperglucemia perioperatoria); admisión a una sala de emergencia, un centro de trauma, o una unidad de cuidados intensivos; estancias hospitalarias prolongadas; procedimientos quirúrgicos; una infección; o una enfermedad crónica:.

[0115] El término “insulina”, como se usa en el presente documento, se refiere a la insulina de cualquier especie tal como insulina humana, insulina porcina, insulina bovina y sales de las mismas, tales como sales de cinc.

Unión dependiente del pH

[0116] La presente invención incluye anticuerpos anti-GCG con características de unión dependientes del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GCG de la presente invención pueden presentar unión reducida a GCG a pH ácido, en comparación con pH neutro. Alternativamente, los anticuerpos anti-GCG de la invención pueden mostrar una mayor unión a GCG a pH ácido, en comparación con pH neutro. La expresión “pH ácido” incluye valores de pH de menos de alrededor de 6,2, por ejemplo, alrededor de 5,95; 5,9; 5,85; 5,8; 5,75; 5,7; 5,65; 5,6; 5,55; 5,5; 5,45; 5,4; 5,35; 5,3; 5,25; 5,2; 5,15; 5,1 ; 5,05; 5,0 o menos. En el presente documento, la expresión “pH neutro” significa un pH de alrededor de 7,0 a alrededor de 7,4. La expresión “pH neutro” incluye valores de pH de alrededor de 7,0; 7,05; 7,1; 7,15; 7,2; 7,25; 7,3; 7,35; y 7,4.

[0117] En ciertos casos, “unión reducida a GCG a pH ácido, en comparación con pH neutro” se expresa en términos de una razón entre el valor K_D de unión del anticuerpo a GCG a pH ácido y el valor K_D de unión del anticuerpo a GCG a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, para los propósitos de la presente invención, se puede considerar que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una “unión reducida a GCG a pH ácido, en comparación con pH neutro” si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo exhibe un razón de K_D ácido/neutro de alrededor de 3,0 o mayor. En ciertos ejemplos de formas de realización, la razón de K_D ácido/neutro para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede ser de alrededor de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5; 14,0; 14,5; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 100,0 o mayor.

[0118] Los anticuerpos con características de unión dependientes del pH se pueden obtener, por ejemplo, cribando una población de anticuerpos para detectar la unión reducida (o aumentada) a un antígeno particular a pH ácido, en comparación con pH neutro. Además, las modificaciones del dominio de unión a antígeno a nivel aminoacídico pueden producir anticuerpos con características dependientes del pH. Por ejemplo, al sustituir uno o más aminoácidos de un dominio de unión de antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un residuo de histidina, se puede obtener un anticuerpo con una reducción de la unión a antígeno a pH ácido con relación al pH neutro.

Anticuerpos Anti-GCG que comprenden variantes de Fc

[0119] De acuerdo con ciertas formas de realización de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-GCG que comprende un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejoran o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-GCG que comprenden una mutación en la región C_{H2} o C_{H3} del dominio Fc, en donde la o las mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc por FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de alrededor de 5,5 a alrededor de 6,0). Tales mutaciones pueden dar lugar a un aumento de la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por

ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T), y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En una forma de realización, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254, y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En aún otra forma de realización, la modificación comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o una modificación 297A (por ejemplo, N297A).

[0120] Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-GCG que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo constituido por: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); 257I y 311I (por ejemplo, P257I y Q311I); 257I y 434H (por ejemplo, P257I y N434H); 376V y 434H (por ejemplo, D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo, T307A, E380A, y N434A); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Todas las posibles combinaciones de las anteriores mutaciones en el dominio Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpos descritos en este documento, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[0121] La presente invención también incluye anticuerpos anti-GCG que comprenden una región constante de la cadena pesada (C_H) quimérica, en donde la región C_H quimérica comprende segmentos derivados de las regiones C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_{H2} derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con parte o la totalidad de un dominio C_{H3} derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4

humana. De acuerdo con ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención comprenden una región C_H quimérica que tiene una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una región bisagra quimérica puede comprender una secuencia de “bisagra superior” de aminoácidos (residuos de aminoácidos desde las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración EU) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con una secuencia de “bisagra inferior” (residuos de aminoácidos desde las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración EU) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. De acuerdo con ciertas formas de realización, la región bisagra quimérica comprende los residuos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de una IgG1 humana o una IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de la bisagra inferior de una IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región C_H quimérica como se describe aquí puede, en ciertas formas de realización, presentar funciones efectoras Fc modificadas sin afectar negativamente las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Ver, por ejemplo, Solicitud Provisional de EE.UU. No. 61/759.578, presentada el 01 de febrero 2013, la descripción de la cual se incorpora aquí por referencia en su totalidad).

Características biológicas de los anticuerpos

[0122] La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a GCG con alta afinidad. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-GCG que se unen GCG con una K_D de menos de alrededor de 5,0 nM medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. De acuerdo con ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-GCG que se unen a GCG a 37 °C con una K_D de menos de alrededor de 5 nM, menos de alrededor de 3 nM, menos de alrededor de 2 nM, menos de alrededor de 1 nM, menos de alrededor de 900 pM, menos de alrededor de 800 pM, menos de alrededor de 700 pM, menos de alrededor de 600 pM, menos de alrededor de 500 pM, menos de alrededor de 400 pM, o menos de alrededor de 300 pM, medida por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0123] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a GCG con una semivida de disociación ($t_{1/2}$) de más de alrededor de 0,5 minutos medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. De acuerdo con ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-GCG que se unen a GCG a 37 °C con un $t_{1/2}$ mayor o igual que alrededor de 0,5 minutos, mayor que alrededor de 6 minutos, mayor que alrededor de 8 minutos, mayor que alrededor de 10 minutos, mayor que alrededor de 12 minutos, mayor que alrededor de 14 minutos, mayor que alrededor de 16 minutos, mayor que alrededor de 18 minutos, mayor que alrededor de 20 minutos, mayor que alrededor de 30 minutos, mayor que alrededor de 40 minutos, o más, medido por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0124] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que unen la unión de GCG a células que expresan el receptor de glucagón (GCGR) y la activación de éstas. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-GCG que bloquean la unión de glucagón a las células que expresan el receptor de glucagón, con una CE_{50} de menos de alrededor de 60pM medida utilizando el formato de bioensayo de GCG que se define en el Ejemplo 4 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. De acuerdo con ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-GCG que bloquean la activación en células que expresan GCGR, con una CE_{50} de menos de alrededor de 50 nM, menos de alrededor de 5,0 nM, menos de alrededor de 1,0 nM, menos de alrededor de 900 pM, menos de alrededor de 800 pM, menos de alrededor de 600 pM, menos de alrededor de 400 pM, menos de alrededor de 200 pM, menos de alrededor de 100 pM, menos de alrededor de 80 pM, menos de alrededor de 60 pM, menos de alrededor de 40 pM, menos de alrededor de 20 pM medida utilizando un formato de ensayo biológico como se define en el Ejemplo 4 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0125] Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas antes mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. La lista anterior de características biológicas de los anticuerpos de la invención no pretende ser

exhaustiva. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para una persona de experiencia ordinaria en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción, incluyendo los ejemplos de trabajo de este documento.

Maapeo de epítopo y Tecnologías Relacionadas

[0126] El epítopo al que los anticuerpos de la presente invención se unen puede consistir en una sola secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína GCG. Alternativamente, el epítopo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de GCG.

[0127] Para determinar si un anticuerpo “interactúa con uno o más aminoácidos” dentro de un polipéptido o proteína se pueden usar varias técnicas conocidas por las personas de experiencia normal en la técnica para. Ejemplos de técnicas incluyen, por ejemplo, ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), el análisis de Escaneo mutacional por residuos de alanina, análisis de péptidos a través de técnicas blot (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), y el análisis de clivaje de péptido. Además, se pueden emplear métodos tales como la escisión epítopo, la extracción de epítopo y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio comprende marcar con deuterio la proteína de interés y luego unir el anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que ocurra el intercambio hidrógeno-deuterio en todos los residuos excepto en los residuos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasas y se analiza por espectrometría de masas, con lo que se descubren los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A- 265A.

[0128] La presente invención incluye además anticuerpos anti-GCG que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los ejemplos de anticuerpos específicos descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 1 del presente documento). Asimismo, la presente invención también incluye anticuerpos anti-GCG que compiten por la unión a GCG con cualquiera de los ejemplos de anticuerpos específicos descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas en la Tabla 1 en el presente documento).

[0129] Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia anti-GCG, o compite por la unión con él, mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-GCG de referencia de la invención, se deja que el anticuerpo de referencia se una a una proteína GCG. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de GCG. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a GCG después de la unión con el anticuerpo de referencia anti-GCG en condiciones de saturación, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente que el anticuerpo de referencia anti-GCG. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la molécula de GCG después de la unión con el anticuerpo de referencia anti-GCG en condiciones de saturación, entonces puede ser que el anticuerpo de prueba se una al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo anti-GCG de referencia de la invención. Puede realizarse experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba se debe realmente a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si la falta de unión observada se debe a un bloqueo estérico (u otro fenómeno). Los experimentos de este tipo se puede realizar utilizando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a anticuerpo cuantitativo o cualitativo disponibles en la técnica. De acuerdo con ciertas formas de realización de la presente invención, dos anticuerpos se unen (o se solapan en) al mismo epítipo si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro por al menos 50%, pero preferentemente 75%, 90% o incluso 99% medida por un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, J Junghans *et al.*, Cancer

Res. 1990:50:1495-1502). Alternativamente, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen “epítomos solapados” si sólo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

[0130] Para determinar si un anticuerpo compite por la unión (o compite de forma cruzada por la unión) con un anticuerpo anti-GCG de referencia, la metodología de unión anteriormente descrita se lleva a cabo en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína GCG en condiciones de saturación, seguida por la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de GCG. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de GCG en condiciones de saturación, seguida por la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de GCG. Si, en ambas orientaciones, sólo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse a la molécula de GCG, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten para la unión a GCG. Como apreciará una persona con conocimientos normales en la técnica, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no necesariamente se une al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, pero estéricamente puede bloquear la unión del anticuerpo de referencia uniéndose a un epítopo solapante o adyacente.

Preparación de Anticuerpos Humanos

[0131] Los anticuerpos anti-GCG de la presente invención pueden ser anticuerpos completamente humanos (de origen no natural). Los métodos para generar anticuerpos monoclonales, que incluyen anticuerpos monoclonales totalmente humanos son conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención se puede utilizar cualquiera de estos métodos conocidos para generar anticuerpos humanos que se unen específicamente a GCG humano.

[0132] Utilizando la tecnología de VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para la

generación de anticuerpos monoclonales, se aíslan inicialmente anticuerpos quiméricos con alta afinidad por un antígeno, los que tiene una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® involucra la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas unidas operativamente a loci endógenos de región constante de ratón, de tal forma que el ratón, en respuesta a un estímulo antigénico, produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aísla y se une operativamente a ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas. Entonces, el ADN se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

[0133] En general, un ratón VELOCIMMUNE® es desafiado con el antígeno de interés, y se recuperan las células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas se pueden fusionar con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma se criban y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera puede ser aislado y unido a las regiones constantes de isotipo deseable de la cadena pesada y la cadena ligera. Tal proteína de anticuerpo se puede producir en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos para el antígeno o los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas, se puede aislar directamente de los linfocitos específicos para el antígeno.

[0134] Como se describe en la sección experimental más adelante, los anticuerpos quiméricos de elevada afinidad aislados que tienen una región variable humana y una región constante de ratón, se caracterizan y se seleccionan de acuerdo a las características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo totalmente humano de la invención, por ejemplo IgG1 o IgG4 silvestres o modificados. Si bien la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de alta afinidad de unión a antígeno y de especificidad por la diana residen en la región variable.

[0135] En general, los anticuerpos de la presente invención poseen afinidades muy altas, por lo general posee K_D de alrededor de 10^{-12} a 10^{-9} M, medida mediante la unión a antígeno, ya sea inmovilizado en fase sólida o en fase de solución.

Bioequivalentes

[0136] Los anticuerpos anti-GCG y fragmentos de anticuerpo de la presente invención abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos pero que conservan la capacidad de unirse GCG humano. Tales variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Del mismo modo, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-GCG de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones, o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo anti-GCG o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un fragmento de anticuerpo o anticuerpo anti-GCG de la invención. Ejemplos de tales variantes de secuencias de aminoácidos y de ADN se discuten anteriormente.

[0137] Dos proteínas de unión a antígeno o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que cuando se administran en la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea como una dosis única o dosis múltiples, presentan una tasa y grado de absorción que no muestran una diferencia significativa. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción, pero no en su tasa de absorción y, sin embargo pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción que son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para lograr concentraciones efectivas del fármaco en el cuerpo, por ejemplo, en el uso crónico, y se considera médicamente insignificantes para el producto farmacéutico particular estudiado.

[0138] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

[0139] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente se puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o disminución de la eficacia, en comparación con el tratamiento continuado sin tal cambio.

[0140] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos de acción comunes o para la afección o afecciones de uso, en la medida en que tales mecanismos son conocidos.

[0141] La bioequivalencia se puede demostrar por métodos *in vivo* y métodos *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en donde la concentración del anticuerpo o de sus metabolitos se mide en la sangre, plasma, suero, u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con datos de biodisponibilidad *in vivo* en humanos y es razonablemente predictiva de estos; (c) un ensayo *in vivo* en humanos u otros mamíferos en los que el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) se mide como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia, o la biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[0142] Las variantes bioequivalentes de anticuerpos anti-GCG de la invención pueden ser construidas, por ejemplo, haciendo diversas sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias terminales o internos no necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden ser eliminados o reemplazados con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos anti-GCG que comprenden cambios de aminoácidos, que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven la glicosilación.

Anticuerpos multiespecíficos

[0143] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.* 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Los anticuerpos anti-GCG de la presente invención se pueden enlazar o coexpresar con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico con una segunda especificidad de unión.

[0144] La presente invención incluye anticuerpos biespecíficos en los que un brazo de una inmunoglobulina se une a GCG humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para un segundo antígeno. El brazo que se une a GCG puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR que se indican en la Tabla 1 en el presente documento.

[0145] Un ejemplo ilustrativo de formato de anticuerpo biespecíficos que se puede utilizar en el contexto de la presente invención involucra el uso de un primero dominio C_{H3} de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio C_{H3} , en donde el primer y segundo dominios C_{H3} de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde el al menos un aminoácido de diferencia reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de un aminoácido. En una forma de realización, el primer dominio C_{H3} se une a la proteína A y el segundo dominio C_{H3} de Ig contiene una mutación que reduce o suprime la unión a la proteína A, tal como una modificación H95R (por numeración IMGT de exones; H435R por numeración EU). El segundo C_{H3} puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro del segundo C_{H3} incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S,

K392N, y V422I por EU) en el caso de los anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por EU) en el caso de los anticuerpos IgG4. Las variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descritas anteriormente se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[0146] Otros ejemplos ilustrativos de formatos biespecíficos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones de IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, cuadroma, *knob-in-holes* o botón en ojal, cadena ligera común (por ejemplo, la cadena ligera común con botón-en-oyal, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab doble acción (DAF)-IgG, y formatos biespecíficos Mab² (para una revisión de los formatos anteriores, véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs. 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden construir usando conjugación péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde se utilizan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados oligonucleótido-anticuerpo específicos de sitio que luego se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane *et al.*, J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Formulación y Administración terapéutica

[0147] La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-GCG o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con portadores, excipientes, y otros agentes adecuados que proporcionan una mejor transferencia, entrega, tolerancia, y similares. En el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. se pueden encontrar una multitud de formulaciones apropiadas. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como de LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua-en-aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos

pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Ver también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0148] La dosis de anticuerpo que se administran a un paciente pueden variar dependiendo de la edad y la talla del paciente, la enfermedad diana, las condiciones, la vía de administración, y similares. La dosis preferida se calcula normalmente según el peso corporal o la superficie corporal. En un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención por vía intravenosa normalmente en una dosis única de alrededor de 0,01 a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de alrededor de 0,02 a alrededor de 7, alrededor de 0,03 a alrededor de 5, o alrededor de 0,05 a alrededor de 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la severidad de la condición, se puede ajustar la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosis efectivas y los horarios de administración de los anticuerpos anti-GCG pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, el progreso del paciente puede controlarse mediante evaluación periódica, y la dosis se puede ajustar en consecuencia. Por otra parte, el escalado de las dosificaciones entre especies puede realizarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti *et al.*, 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

[0149] Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden usar para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, intranasal, epidural, y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

[0150] Una composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, con

respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración de pluma se puede emplear fácilmente para la entrega de una composición farmacéutica de la presente invención. Tal dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica dentro del cartucho ha sido administrada y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede ser fácilmente desechado y sustituido por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma se puede volver a utilizar. En un dispositivo de suministro tipo pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de administración de pluma desechable viene previamente lleno con la composición farmacéutica dentro de un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, todo el dispositivo se desecha.

[0151] Numerosos dispositivos de administración de autoinyección y plumas resusables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), por nombrar sólo unos pocos. Ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las plumas SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), la pluma PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), y HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar sólo unos pocos.

[0152] En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede entregar mediante un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, se puede usar una bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRCCrit Ref Biomed Eng 14:201). En otra forma de realización, se pueden utilizar materiales poliméricos; véase, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1974, CRCPres., Boca Ratón, Florida. En aún otra forma de realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana de la composición, con lo que se requiere sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

[0153] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para administración de inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar por métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal descritos anteriormente en un medio acuoso o un medio oleoso estéril utilizado convencionalmente para inyectables. Como medio acuoso para inyección, están disponibles, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que pueden ser utilizados en combinación con un agente solubilizante adecuado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno (50 mol)], etc. Como el medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden ser utilizados en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera preferentemente se carga en una ampolla adecuada.

[0154] Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral anteriormente descritas se preparan en formas farmacéuticas en dosis unitarias adecuadas para adaptarse a una dosis de los ingredientes activos. Tales formas farmacéuticas en forma de dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones

(ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo antes mencionado contenida es generalmente de alrededor de 5 a alrededor de 500 mg por forma farmacéutica en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, el caso de otras formas farmacéuticas se prefiere que el anticuerpo antes mencionado esté contenido en alrededor de 5 a alrededor de 100 mg y en alrededor de 10 a alrededor de 250 mg.

Inmunconjugados

[0155] La invención abarca un anticuerpo monoclonal anti-GCG humano conjugado con un resto terapéutico (“inmunconjugado”), tal como un agente que es capaz de reducir los niveles de glucosa en sangre, o un radioisótopo, o un agente quimioterapéutico. Para elegir el tipo de resto terapéutico que se puede conjugar con el anticuerpo anti-GCG se tendrá en cuenta la condición a ser tratada y el efecto terapéutico que desea alcanzar. Por ejemplo, para tratar la diabetes, o cualquier otra condición en la que es deseable disminuir la glucosa en sangre y/o mantener niveles normales de glucosa en sangre, se puede conjugar con el anticuerpo de GCG un agente tal como biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea (por ejemplo, gliburida, glipizida), una agonista de PPAR gamma (por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona); un inhibidor de alfa glucosidasa (por ejemplo, acarbosa, voglibosa), un inhibidor de la formación de productos finales de la glicación avanzada (por ejemplo aminoguanidina, o un segundo inhibidor de GCG. Alternativamente, si el efecto terapéutico deseado es para el tratamiento de las secuelas o síntomas asociados con diabetes, o cualquier otra condición que es resultado de niveles altos, o no controlados de glucosa en sangre, puede ser ventajoso conjugar un agente apropiado para el tratamiento de las secuelas o síntomas de la afección. En la técnica se conocen ejemplos de agentes adecuados para la formación de inmunconjugados, véase por ejemplo, el documento WO 05/103081.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

[0156] Debido a su interacción con el glucagón, los presentes anticuerpos son útiles para reducir los niveles de glucosa en sangre y también para el tratamiento de una amplia gama de condiciones y trastornos en los que es beneficioso bloquear la interacción de glucagón con su receptor. Estos trastornos y afecciones se pueden seleccionar de cualquier trastorno metabólico relacionado con el glucagón, que involucre la señalización del receptor de

glucagón que resulta en la patofisiología del trastorno, o en la respuesta homeostática al trastorno. Por lo tanto, los anticuerpos pueden encontrar uso, por ejemplo, para prevenir, tratar o aliviar, enfermedades o afecciones o síntomas asociados o secuelas, del sistema endocrino, el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, el sistema cardiovascular, el sistema pulmonar, y el sistema gastrointestinal, al mismo tiempo que reduce y o elimina uno o más de los efectos secundarios no deseados asociados con los tratamientos actuales. Los trastornos metabólicos relacionados con el glucagón incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo 1 y tipo 2, cetoacidosis diabética, hiperglucemia, síndrome diabético hiperosmolar hiperglucémico, hiperglucemia perioperatoria, hiperglucemia en el paciente internado en una unidad de cuidados intensivos, hiperinsulinemia, hiperglucemia postprandial, hiperglucemia asociada con quemaduras, o infarto de miocardio u otros problemas/condiciones cardíacas, glucosa en ayunas alterada (IFG), síndrome metabólico, hiper/hipo-calemia, mala razón LDL/HDL, trastornos de la alimentación, aumento de peso, obesidad como consecuencia de diabetes, diabetes pediátrica, diabetes gestacional, complicaciones diabéticas tardías, micro/macro-albuminuria, nefropatía, retinopatía, neuropatía, úlceras del pie diabético, problemas de cicatrización de heridas, intolerancia a la glucosa (IGT), síndromes de resistencia a la insulina, síndrome X, glucagonomas, trastornos gastrointestinales, obesidad, diabetes como consecuencia de la obesidad, etc. La presente invención proporciona además; un método para tratar condiciones resultantes de exceso de glucagón en un mamífero; un método de inhibición de los efectos de elevación de la glucosa por glucagón en un mamífero; un método para inhibir una respuesta celular mediada por glucagón en un mamífero, o un método para reducir el nivel glucémico en un mamífero que comprende administrar a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento de una cantidad inhibidora de glucagón de un anticuerpo anti-GCG o un fragmento biológicamente activo del mismo.

[0157] En una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para prevenir la aparición de hiperglucemia, por ejemplo, hiperglucemia inducida por el estrés, o para reducir la probabilidad de aparición de hiperglucemia en un paciente, o se pueden usar para reducir la gravedad de una enfermedad o afección que resulta en parte de los niveles elevados de glucosa en sangre. Se contempla que los anticuerpos anti-GCG de la presente invención se puedan utilizar en un ámbito de tratamiento de casos agudos, ya sea

solos, o en combinación con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, insulina. En una forma de realización, los anticuerpos anti-GCG se pueden usar como terapia crónica para disminuir la glucosa en sangre o para mantener los niveles normales de glucosa en sangre cuando se usan solos o con un segundo agente terapéutico, tal como la insulina.

[0158] Los presentes anticuerpos son efectivos en la reducción de la glucosa en sangre, tanto en ayuno como en la fase postprandial. En ciertas formas de realización de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes tipo 2. En aún otra forma de realización adicional de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica para retrasar o prevenir que una intolerancia a la glucosa progrese a diabetes tipo 2. En aún otra forma de realización de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica para retrasar o prevenir que una diabetes no requirente de insulina progrese a diabetes requirente de insulina. En una forma de realización adicional de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes de tipo 1.

[0159] En otra forma de realización, los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de la hiperglucemia por estrés resultante de la exposición de un paciente a una cualquiera o más factores de estrés, o a un estímulo inductor de estrés, o a un estímulo elevador de la glucosa seleccionado del grupo que consiste en diabetes preexistente tipo 1 o tipo 2, deshidratación hipertónica; infusión de vasopresores de catecolamina; tratamiento con glucocorticoides; obesidad; envejecimiento; administración excesiva de dextrosa; nutrición parenteral, nutrición enteral, pancreatitis; septicemia; derrame cerebral; traumatismo craneoencefálico; hipotermia; hipoxemia; uremia; cirrosis; anestesia; estancias hospitalarias preoperatoria o postoperatoria (hiperglucemia perioperatoria); admisión a una sala de emergencia, un centro de trauma, o una unidad de cuidados intensivos; estancias hospitalarias prolongadas; procedimientos quirúrgicos; una infección; o una enfermedad crónica.

[0160] Se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan utilizar en un entorno agudo (para uso a corto plazo), o para uso a más largo plazo (crónico). Tal tratamiento puede ir acompañado de terapia con insulina, u otra terapia hipoglucemiante.

Terapias de combinación

[0161] Las terapias de combinación pueden incluir un anticuerpo anti-GCG de la invención y cualquier agente terapéutico adicional que se puede combinar ventajosamente con un anticuerpo de la invención, o con un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la invención.

[0162] Por ejemplo, se puede emplear un segundo agente terapéutico para ayudar en la disminución adicional de los niveles de glucosa, o para reducir al menos un síntoma en un paciente que sufre de una enfermedad o afección que se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre, tal como la diabetes mellitus. Tal segundo agente puede ser seleccionado de, por ejemplo, de un un antagonista del receptor de glucagón (como se describe, por ejemplo, en US8545847), u otro antagonista de GCG (por ejemplo, otro anticuerpo anti-glucagón diferente o un anticuerpo anti-GCGR o un inhibidor de molécula pequeña de glucagón o GCGR), o pueden incluir otros restos terapéuticos útiles para el tratamiento de la diabetes, u otras enfermedades o afecciones asociadas con, o resultantes de, niveles elevados de glucosa en sangre, o metabolismo alterado de la glucosa; o agentes útiles para el tratamiento de las complicaciones a largo plazo asociadas con niveles elevados y/o no controlados de glucosa en sangre. Estos agentes incluyen biguanidas, que disminuyen la producción de glucosa en el hígado y aumentan la sensibilidad a la insulina (por ejemplo, metformina), o sulfonilureas, que estimulan la producción de insulina (por ejemplo, gliburida, glipizida). Los tratamientos adicionales dirigidos a mantener la homeostasis de la glucosa, incluyendo agonistas de los PPAR gamma, que actúan como sensibilizadores a la insulina (por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona), y los inhibidores de la alfa glucosidasa, que retardan la absorción de almidón y la producción de glucosa (por ejemplo, acarbosa, voglibosa). Los tratamientos adicionales incluyen tratamientos inyectables tales como un análogo o agonista del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), por ejemplo, BYETTA®, (Exenatida) o VICTOZA® (liraglutida). Otro tratamiento puede ser con SYMLIN® (pramlintida), que es un análogo de la amilina, un pequeño péptido hormonal que es liberado en el torrente sanguíneo por las células beta del páncreas junto con la insulina después de una comida. Al aumentar la amilina endógena, la pramlintida ayuda en la absorción de la glucosa al disminuir el vaciado gástrico, promoviendo la saciedad a través de receptores

hipotalámicos (receptores diferentes que para GLP-1), e inhibiendo la secreción inapropiada de glucagón. Otros compuestos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, (inhibidores de DPP-4), que reducen los niveles de glucagón y glucosa en sangre. El mecanismo de los inhibidores de DPP-4 es aumentar los niveles de incretinas (GLP-1 y GIP), que inhiben la liberación de glucagón, lo que a su vez aumenta la secreción de insulina, disminuye el vaciado gástrico, y disminuye los niveles de glucosa en sangre. Los ejemplos de inhibidores de DPP-4 incluyen saxagliptina (Onglyza®), sitagliptina (JANUVIA®) y vildagliptina (Galvus®). Otros compuestos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos de la invención incluyen inhibidores del co-transportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2), que bloquean la reabsorción de glucosa en el riñón, aumentan la excreción de glucosa y disminuyen los niveles de glucosa en sangre. Los ejemplos de inhibidores de SGLT2 incluyen INVOKANA™ (canagliflozina), FORXIGA® (dapagliflozina), empagliflozina, ipragliflozina y tofogliflozina.

[0163] En ciertas formas de realización, la composición puede incluir un segundo agente seleccionado del grupo que consiste en secretagogos distintitos a sulfonilureas, insulina, análogos de insulina, polipéptidos de exendina-4, agonistas de receptores adrenérgicos beta 3, estatinas y combinaciones que contienen estatinas, inhibidores de la absorción de colesterol y, antagonistas del colesterol LDL, antagonistas de la proteína de transferencia de éster de colesterilo, antagonistas de los receptores de la endotelina, antagonistas de la hormona de crecimiento, sensibilizadores de la insulina, miméticos o agonistas de amilina, antagonistas de los receptores de cannabinoides, agonistas del péptido similar al glucagón de tipo 1, melanocortinas, agonistas del receptor de la hormona concentradora de melanina, IRSNs, e inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa.

[0164] En ciertas otras formas de realización, la terapia de combinación pueden incluir la administración de un segundo agente para contrarrestar cualquier potencial efecto(s) secundario(s) resultante de la administración de un anticuerpo de la invención, si se produce(n) tal(es) efecto(s) secundario(s). Por ejemplo, en el caso de que cualquiera de los anticuerpos anti-GCG aumente los niveles de lípidos o colesterol, puede ser beneficioso administrar un segundo agente para disminuir los niveles de lípidos o colesterol, usando un agente tal como un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, una estatina tal como

atorvastatina, (Lipitor®), fluvastatina (Lescol®), lovastatina (Mevacor®), pitavastatina (Livalo®), pravastatina (Pravachol®), rosuvastatina (Crestor®) y simvastatina (Zocor®). Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden combinar con un agente tal como Vytorin®, la cual es una preparación de una estatina con otro agente, como por ejemplo ezetimiba/simvastatina.

[0165] En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso administrar los anticuerpos de la invención en combinación con uno cualquiera o más de los siguientes: (1) niacina, la cual aumenta el catabolismo de las lipoproteínas; (2) fibratos o ácidos carboxílicos anfipáticos, los cuales reducen el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL), mejoran los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y los niveles de TG, y reducen el número de infartos no fatales, y (3) activadores del factor de transcripción LXR que tiene un papel en la eliminación de colesterol, tal como el 22-hidroxicolesterol, o una estatina con una resina de la bilis (por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesevelam), una combinación fija de niacina más una estatina (por ejemplo, niacina con lovastatina), o con otros agentes reductores de lípidos tales como ésteres etílicos de ácidos grasos omega 3 (por ejemplo, omacor).

[0166] Además, el segundo agente terapéutico puede ser uno o más de otro inhibidor/antagonista de glucagón o un inhibidor/antagonista del receptor de glucagón (GCGR), así como inhibidores de otras moléculas, tales como la proteína 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3), proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), proteína 5 de tipo angiopoyetina (ANGPTL5), proteína 6 de tipo angiopoyetina (ANGPTL6), y proteína 8 de tipo angiopoyetina (ANGPTL8) que están involucradas en el metabolismo de los lípidos, en particular, en la homeostasis del colesterol y/o los triglicéridos. Los inhibidores de estas moléculas incluyen moléculas pequeñas y anticuerpos que se unen específicamente a estas moléculas y bloquean su actividad.

[0167] En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso administrar los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo que actúa para reducir los niveles de lípidos o los niveles de colesterol, tal como, pero no limitado a, por ejemplo, cualquier anticuerpo anti-PCSK9 (proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9), tal como los descritos en US2010/0166768 (ahora US8062640). Otros anticuerpos anti-PCSK9 se

describen en US2010/0040611, US2010/0041102, US2010/0040610, US2010/0113575, US2009/0232795, US2009/0246192, US2010/0233177, US2009/0142352, US2009/0326202, US2010/0068199, US2011/0033465, US2011/0027287, US2010/0150937, US2010/0136028 y WO2009/055783.

[0168] En ciertas formas de realización, puede ser beneficioso administrar los anticuerpos anti-GCG de la invención en combinación con un ácido nucleico que inhiba la actividad de PCSK9 (proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9), tal como una molécula antisentido, un ARN de cadena doble, o una molécula de ARNsi. Ejemplos ilustrativos de moléculas de ácido nucleico que inhiben la actividad de PCSK9 se describen en las patentes US2011/0065644, US2011/0039914, US2008/0015162 y US2007/0173473.

[0169] El (los) componente(s) terapéuticamente activo(s) adicional(es) se puede(n) administrar antes de, simultáneamente con, o después de, la administración del anticuerpo anti-GCG de la presente invención. Para los propósitos de la presente divulgación, dichos regímenes de administración son considerados como la administración de un anticuerpo anti-GCG “en combinación con” un segundo componente terapéuticamente activo.

Regímenes de administración

[0170] De acuerdo con ciertas formas de realización de la presente invención, se pueden administrar múltiples dosis de un anticuerpo anti-GCG (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-GCG y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales que se mencionan en el presente documento) a un sujeto durante un determinado periodo de tiempo. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden la administración secuencial a un sujeto de múltiples dosis de un anticuerpo anti-GCG de la invención. Tal como se usa en este documento, “administración secuencial” o “administrar secuencialmente” significa que cada dosis de anticuerpo anti-GCG se administra al sujeto en un punto diferente en el tiempo, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis única inicial de un anticuerpo anti-GCG, seguida de

una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-GCG, y opcionalmente seguida por una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-GCG.

[0171] Los términos “dosis inicial”, “dosis secundarias” y “dosis terciarias,” se refieren a la secuencia temporal de la administración del anticuerpo anti-GCG de la invención. Por lo tanto, la “dosis inicial” es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también conocida como la “dosis de referencia”); las dosis “secundarias” son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las “dosis” terciarias son las dosis que se administran después de que las dosis secundarias. Todas las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de anticuerpo anti-GCG, pero en general pueden diferir entre sí en términos de la frecuencia de administración. En ciertas formas de realización, sin embargo, la cantidad de anticuerpo anti-GCG contenida en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía (por ejemplo, ajustadas incremental o decrementalmente según el caso) durante el curso del tratamiento. En ciertas formas de realización, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) dosis se administran en el comienzo del régimen de tratamiento como “dosis de carga”, seguidas de dosis posteriores que se administran sobre una base menos frecuente (por ejemplo, “dosis de mantenimiento”).

[0172] En ciertos ejemplos de formas de realización de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4 ½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8 ½, 9, 9 ½, 10, 10 ½, 11, 11 ½, 12, 12 ½, 13, 13½, 14, 14 ½, 15, 15 ½, 16, 16 ½, 17, 17 ½, 18, 18 ½, 19, 19 ½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase “la dosis inmediatamente anterior,” como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de múltiples administraciones, la dosis de anticuerpo anti-GCG, que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia, sin dosis intermedias.

[0173] Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención puede comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias de un anticuerpo anti-GCG. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, sólo se administra una sola dosis secundaria al paciente. En otras formas de realización, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis secundarias al paciente. Del mismo modo, en

ciertas formas de realización, se administra sólo una dosis terciaria al paciente. En otras formas de realización, se administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis terciarias al paciente. El régimen de administración puede llevarse a cabo indefinidamente durante la vida útil de un sujeto en particular, o hasta que tal tratamiento ya no sea terapéuticamente necesario o ventajoso.

[0174] En formas de realización que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse con la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente 1 a 2 semanas o 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. Del mismo modo, en las formas de realización que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En ciertas formas de realización de la invención, la frecuencia en la que se administran a un paciente las dosis secundarias y/o terciarias puede variar en el curso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ser ajustada durante el curso del tratamiento, después del examen clínico, por un médico dependiendo de las necesidades individuales del paciente.

Usos Diagnóstico de los Anticuerpos

[0175] Los anticuerpos anti-GCG de la presente invención también se pueden usar para detectar y/o medir GCG en una muestra, por ejemplo, para fines diagnósticos. Para ejemplo, un anticuerpo anti-GCG, o fragmento del mismo, pueden ser usado para diagnosticar una condición o enfermedad que se caracteriza por la expresión aberrante (por ejemplo, la sobre-expresión, la sub-expresión, la falta de expresión, etc.) de GCG. Ejemplo de ensayos diagnósticos para GCG puede comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-GCG de la invención, en donde el anticuerpo anti-GCG se etiqueta con un marcador detectable o molécula indicadora o se utiliza como un ligando de captura para aislar selectivamente la proteína GCG de las muestras de los pacientes. Alternativamente, un anticuerpo anti-GCG no marcado se puede utilizar en aplicaciones diagnósticas en combinación con un anticuerpo secundario que está en sí mismo marcado de forma detectable. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un

radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o una enzima, tal como, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o luciferasa. Ejemplos ilustrativos de ensayos específicos que se pueden utilizar para detectar o medir GCG en una muestra, incluyen el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0176] Las muestras que pueden ser utilizado en los ensayos diagnósticos de GCG de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier tejido o muestra de fluido obtenida de un paciente, la cual contenga cantidades detectables de proteína GCG, o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, se medirán inicialmente los niveles de GCG en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no aquejado de una enfermedad o afección asociada con niveles o actividad anormales de GCG) para establecer una línea basal, de referencia o estándar, del nivel de GCG. A continuación, éste nivel basal de GCG se puede comparar con la niveles de GCG medidos en muestras obtenidas de individuos que se sospecha padecen una enfermedad o afección relacionada con GCG, o síntomas asociados con tal enfermedad o afección.

EJEMPLOS

[0177] Antes de describir los presentes métodos, debe quedar claro que esta invención no se limita a métodos particulares, y a las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Se debe entender también que la terminología usada en este documento sólo tiene el propósito de describir formas de realización particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deberían tenerse en cuenta la presencia de algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a la atmosférica.

[0178] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece esta invención. En el presente documento, el término “alrededor de”, cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado en particular, significa que el valor puede variar desde el valor señalado en no más de 1%. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, la expresión “alrededor de 100” incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4, etc.).

[0179] Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se pasa a describir los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Anti-GCG

[0180] Los anticuerpos anti-GCG se obtuvieron inmunizando un ratón VELOCIMMUNE[®] (es decir, un ratón diseñado genéticamente que comprende ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno que comprende GCG humano. La respuesta inmunitaria de los anticuerpos se monitorizó mediante un inmunoensayo específico para GCG. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada, se generaron varios anticuerpos anti-GCG completamente humanos a partir de células B positivas al antígeno como se describe en el documento US 2007/0280945A1, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[0181] Ciertas propiedades biológicas de los ejemplos ilustrativos de los anticuerpos anti-GCG generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en el conjunto de ejemplos se muestra a continuación.

Ejemplo 2. Secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera

[0182] La Tabla 1 muestra los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y CDR de los anticuerpos anti-GCG seleccionados de la

invención. Los correspondientes identificadores de secuencia de ácido nucleico se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de Secuencias de Aminoácidos

Designación de Anticuerpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H059P	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H10223P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H10231P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H10232P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H10236P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H10237P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H10238P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H10250P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H10256P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H10270P	146	148	150	152	154	156	158	160

Tabla 2: Identificadores de Secuencias de Ácido Nucleicos

Designación de Anticuerpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H059P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H10223P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H10231P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H10232P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H10236P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H10237P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H10238P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H10250P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H10256P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H10270P	145	147	149	151	153	155	157	159

[0183] En el presente documento los anticuerpos se denominan normalmente de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo de Fc (por ejemplo, “HUH”, “MM”, “IH2M”, etc.), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, “10223”, “10231”, “10232”, etc.), seguido de un sufijo “P” o “N”, como se muestra en las Tablas 1 y 2. De este modo, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede ser dominado en el presente documento,

por ejemplo,” H4H10270P”, etc. El prefijo H4H en las designaciones de los anticuerpos utilizados en el presente documento indican isotipo específico de la región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo “H4H” tiene una Fc de IgG4 humana, un anticuerpo “H1M” tiene una Fc de IgG4 de ratón, y un anticuerpo “H2M” tiene una Fc de IgG2 de ratón, (todas las regiones variables son totalmente humanas como se indica mediante la primera ‘H’ en la designación de los anticuerpos). Como apreciará una persona con conocimientos ordinarios en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc específico, se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo de Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con una Fc de IgG1 de ratón se puede convertir a un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluyendo las CDR) -que están indicadas por los identificadores numéricos que se muestran en las Tablas 1 y 2- seguirán siendo los mismos, y es de esperar que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

Ejemplo 2. Análisis de Utilización de Genes Variables

[0184] Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos, se clonaron y se secuenciaron los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de anticuerpo. A partir de la secuencia de ácido nucleico y la secuencia predicha de aminoácidos de los anticuerpos, se identificó el uso del gen para cada región variable de cadena pesada (HCVR) y cada región variable de cadena ligera (LCVR). La Tabla 3 muestra el uso de genes para anticuerpos seleccionados de acuerdo con la invención.

Tabla 3

AbPID	HCVR			LCVR	
	VH	D	JH	VK	JK
H1H059P	3-30	2-2	4	4-1	1
H4H10223P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10231P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10232P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10236P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10237P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10238P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10250P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10256P	3-30	3-3	4	4-1	2
H4H10270P	3-30	3-3	4	4-1	2

Ejemplo 3. Afinidades de unión y constantes cinéticas de anticuerpos monoclonales humanos anti-GCG derivadas mediante resonancia de plasmones superficiales

[0185] Los valores de las constantes de disociación en equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-GCG purificados que se unen a GCG humana se determinaron utilizando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real usando un instrumento Biacore 4000. La superficie del sensor Biacore se derivatizó con un anticuerpo de ratón monoclonal anti-Fc humana (GE Healthcare, # BR-1008-39) para capturar cada anticuerpo monoclonal anti-GCG. Se inyectaron diferentes concentraciones de GCG humana (Phoenix Pharmaceuticals, # 028-02) sobre la superficie capturada de anticuerpo monoclonal anti-GCG con una velocidad de flujo 30 μ L/min. La unión de GCG a los anticuerpos monoclonales capturados se monitoreo durante 4 minutos mientras la disociación se monitoreo durante 10 minutos en tampón de corrida HBST (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% v/v surfactante P20). Los experimentos se realizaron a 25 °C y 37 °C.

[0186] Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) se determinaron procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 utilizando software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Las constantes de unión de disociación en equilibrio (K_D) y semividas de disociación ($t_{1/2}$) se calculan a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D (M) = k_d/k_a, \text{ y } t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0187] Los parámetros cinéticos de asociación para diferentes anticuerpos monoclonales anti-GCG que se unen a reactivos GCG humanos a 25 °C y 37 °C se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4: Cinética de unión de anticuerpos anti-GCG que se unen a GCG humano a 25 °C.

Unión a GCG Humano a 25 °C				
Anticuerpo	k_s	k_d	K_D	$t_{1/2}$
	(1/Ms)	(1/s)	(M)	(min)
H4H10236P	3,08E+06	7,46E-04	2,42E-10	15
H4H10237P	4,96E+06	1,03E-03	2,08E-10	11
H4H10238P	3,89E+06	6,20E-04	1,60E-10	19
H4H10250P	3,32E+06	9,39E-04	2,83E-10	12
H4H10256P	7,72E+06	5,82E-04	7,53E-11	20
H4H10270P	4,80E+06	7,32E-04	1,53E-10	16
H4H10223P	9,36E+06	5,41E-04	5,78E-11	21
H4H10231P	7,39E+06	6,85E-04	9,27E-11	17
H4H10232P	3,19E+06	2,31E-04	7,24E-11	50
H1H059P	2,50E+06	1,78E-03	7,15E-10	6

Tabla 5: Cinética de unión de anticuerpos anti-GCG que se unen a GCG humano a 37 °C.

Unión a GCG Humano a 25 °C				
Anticuerpo	k_s	k_d	K_D	$t_{1/2}$
	(1/Ms)	(1/s)	(M)	(min)
H4H10236P	4,25E+06	8,80E-03	2,08E-09	1
H4H10237P	7,53E+06	6,83E-03	9,07E-10	2
H4H10238P	4,94E+06	2,74E-03	5,55E-10	4
H4H10250P	5,58E+06	7,08E-03	1,27E-09	2
H4H10256P	7,90E+06	2,48E-03	3,14E-10	5
H4H10270P	6,77E+06	3,78E-03	5,59E-10	3
H4H10223P	6,40E+06	2,23E-03	3,47E-10	5
H4H10231P	2,40E+06	2,45E-03	1,01E-09	5
H4H10232P	4,61E+06	1,47E-03	3,18E-10	8
H1H059P	4,90E+06	2,36E-02	4,78E-09	0,5

[0188] Como se muestra en la Tabla 4, todos los anticuerpos anti-GCG se unieron a GCG humano a 25 °C con valores de K_D que iban desde 57,8 pM a alrededor de 715 pM. Como se muestra en la Tabla 5, todos los anticuerpos anti-GCG se unieron a GCG humano a 37 °C con valores de K_D que iban desde 314 pM a alrededor de 4,78 nM.

Ejemplo 4. Bioensayo de GCG con células HEK293/CRE-luciferasa/ hGCGR

[0189] GCGR es un receptor acoplado a la proteína G y su ligando, el glucagón (GCG), estimula la actividad de la adenilato ciclasa a través de $G_{\alpha s}$ y el recambio de fosfoinositol a través de G_q (Jiang y Zhang, (2003), Amer. J. Physiol.- Endocrinol. y Metabolism, 1 de abril, Vol. 284, No. E671-E678). Se desarrolló un bioensayo para detectar la activación a través de

Gas, con la consiguiente elevación de los niveles de AMPc, y la activación transcripcional. Se generaron líneas celulares HEK293 para expresar de forma estable de GCGR humano de longitud completa (hGCGR; aminoácidos 1-477 del número de acceso NP000151 0.1) junto con un indicador de luciferasa [elemento de respuesta a AMPc (CRE, 4X)-luciferasa-IRES-GFP]. Se aisló la línea celular estable (células HEK293/CRE-luc/hGCGR) y se mantuvieron en DMEM que contenía FBS al 10%, NEAA, y penicilina/estreptomicina/L-glutamina.

[0190] Para el bioensayo, se sembraron células HEK293/CRE-luc/hGCGR en placas de 96 pocillos de ensayo a 10.000 células/pocillo en medios bajos en suero (OPTIMEM que contiene 0,1% de FBS), y se incubaron a 37 °C en 5% CO₂ durante la noche. El día siguiente, se diluyó GCG humano (Phoenix Pharmaceuticals, # 028-02) en forma seriada a 1: 3 desde 10 nM a 0,0002 nM y se añadió a las células. También se añadió un control que contenía tampón de dilución pero no GCG a una muestra de células. Para medir la inhibición, los anticuerpos anti-GCG se diluyeron en serie a 1: 3 desde 100 nM a 0,002nM y se añadieron a las células incluyendo una muestra control que no contenía anticuerpo con una concentración constante de 40 pM de GCG. Después de 5,5 horas de incubación a 37 °C en 5% de CO₂, se detectó la actividad de luciferasa usando un lector de placas Victor X (Perkin Elmer). Los resultados fueron analizados mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 6 (Graph Pad).

[0191] Como se muestra en la Tabla 6, los 10 anticuerpos anti-GCG probados inhibieron completamente la activación de las células HEK293/CRE-luc/hGCGR a una concentración de 40 pM de GCG con valores de CI₅₀ que van desde 7,3 pM a 910 pM. El anticuerpo isotipo de control no demostró ningún bloqueo medible y el GCG activó la línea celular HEK293/CRE-Luc/hGCGR con un valor CE₅₀ de 53 pM.

Tabla 6: Inhibición de la activación de GCG de células HEK293/CRE-luc/hGCGR mediante anticuerpos anti-GCG

CE₅₀ de GCG [M]	5,3E-11
Concentración constante de GCG usada para probar los anticuerpos	40 pM
Anticuerpos	CI₅₀ [M]
H4H10223P	9,5E-12
H4H10231P	7,3E-12
H4H10232P	2,3E-11
H4H10236P	2,5E-10
H4H10237P	3,4E-11
H4H10238P	1,8E-11
H4H10250P	3,4E-11
H4H10256P	1,8E-11
H4H10270P	2,2E-11
H1H059P	9,1E-10
Anticuerpo isotipo de control	No bloqueador

Ejemplo 5. Efecto de una dosis única de H4H10223P en ratón con obesidad inducida por dieta en un modelo *in vivo* de diabetes tipo 2

[0192] Los efectos de una sola dosis de un anticuerpo anti-GCG específico de la invención, H4H10223P, sobre los niveles de glucosa en sangre se determinó en un modelo en ratón de obesidad inducida por dieta (DIO) de diabetes tipo 2. El modelo DIO se desarrolló mediante la alimentación de ratones con una dieta alta en grasas (60% kcal) (HFD) a partir de las 5-6 semanas de edad. Después de alrededor de 6 semanas con una HFD, los ratones desarrollaron anomalías metabólicas, incluyendo resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y obesidad. Veintitrés ratones C57BL/6 machos de 3 meses de edad (granjas Taconic, Inc., B6-M) se pusieron bajo una HFD a las 5 semanas de edad y se mantuvieron en la dieta durante los subsiguientes 4 meses. A los 7 meses de edad, los ratones se dividieron en 4 grupos de 2 a 4 animales. Cada grupo recibió una única inyección subcutánea de H4H10223P a 3 mg/kg (n = 5), 10 mg/kg (n = 3) o 30 mg/kg (n = 2) o un anticuerpo isotipo de control, que no se une a ninguna proteína de ratón conocida, a 30 mg/kg (n = 5). En los días 2, 4, 7 y 9 después de la dosificación de anticuerpos, se recolectaron muestras de sangrados de cola de los ratones, los niveles de glucosa en sangre de las muestras de sangrado de cola se determinaron utilizando ACCU-Chek® Compact Plus (Roche, 075177294001). Para cada animal en cada punto de tiempo se calculó el porcentaje de reducción de la glucosa en sangre a partir de los niveles medios de glucosa en sangre del grupo de control. La reducción porcentual promedio

de glucosa en sangre se calculó para cada grupo de tratamiento. La Tabla 7 resume los niveles medios de glucosa en sangre de cada grupo de tratamiento. Los resultados, expresados como (media $\pm$ SEM) de la reducción porcentual de la glucosa en sangre, se muestran en la Tabla 8.

[0193] Como se muestra en las Tablas 7 y 8, los ratones tratados con una dosis única de H4H10223P a 30 mg/kg mostraron reducciones significativas en los niveles de glucosa en sangre en todos los puntos de tiempo medidos, en comparación con los ratones inyectados con anticuerpo isotipo de control. Los ratones tratados con una dosis única de H4H10223P a 3 mg/kg mostraron una reducción significativa en los niveles de glucosa en sangre en el día 2 en comparación con los ratones inyectados con anticuerpo isotipo de control, pero no se observaron reducciones significativas a esta dosis en los otros puntos de tiempo medidos. Los ratones tratados con una dosis única de H4H10223P a 10 mg/kg mostraron una reducción significativa en los niveles de glucosa en sangre en el día 2 en comparación con los ratones inyectados con anticuerpo isotipo de control, y se observaron tendencias de reducción a esta dosis en los otros puntos de tiempo medidos.

Tabla 7: Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de cada grupo de tratamiento

Tiempo (días)	Nivel de glucosa en sangre (mg/dL)			
	Control	H4H10223P		
	30 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
0	210 $\pm$ 6	209 $\pm$ 8	209 $\pm$ 10	209 $\pm$ 12
2	192 $\pm$ 8	172 $\pm$ 7	164 $\pm$ 7	142 $\pm$ 5
4	168 $\pm$ 10	181 $\pm$ 6	152 $\pm$ 18	137 $\pm$ 2
7	178 $\pm$ 12	173 $\pm$ 8	169 $\pm$ 3	149 $\pm$ 1
9	174 $\pm$ 10	179 $\pm$ 4	170 $\pm$ 30	155 $\pm$ 7

Tabla 8: Porcentaje de reducción de los niveles de glucosa en sangre de cada grupo de tratamiento en comparación con el tratamiento de control de isotipo

Tiempo (días)	Reducción de glucosa en sangre (%)		
	H4H10223P		
	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
2	10 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4	26 $\pm$ 2
4	-8 $\pm$ 3	9 $\pm$ 11	18 $\pm$ 1
7	3 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1
9	-3 $\pm$ 3	2 $\pm$ 17	11 $\pm$ 4

Ejemplo 6. El efecto de dosis múltiples (administración crónica) de los anticuerpos anti-GCG, H4H10223P y H4H10231P en un modelo en ratón de obesidad inducida por dieta *in vivo* de diabetes tipo 2

[0194] Se determinaron los efectos crónicos de los anticuerpos anti-GCG específicos de la invención, H4H10223P y H4H10231P, sobre los niveles de glucosa en sangre en un modelo en ratón de obesidad inducida por dieta-(DIO) de diabetes tipo 2. Como se señaló anteriormente, el modelo DIO se desarrolló alimentando a los ratones con una dieta con un alto contenido en grasas (60% kcal) (HFD) comenzando a alrededor de la 5 a 6 semanas de edad.

[0195] En un experimento (Estudio 1), trece ratones C57BL/6 machos (Taconic Farms, Inc., # B6-M) se pusieron bajo una HFD a las 5 semanas de edad y se mantuvieron en la dieta durante los subsiguientes 21 semanas. A las 26 semanas de edad, los ratones se dividieron en 2 grupos de 5 o 8 animales. Cada grupo recibió inyecciones subcutáneas de H4H10223P (n=5; 30 mg/kg), o un anticuerpo isotipo de control (n = 8; 30 mg/kg), que no se une a ninguna proteína de ratón conocida, cada cinco días. A los días 2, 6, 9, 13, 16 y 20 después de la dosis inicial de anticuerpos, se recolectaron sangrados de cola de los ratones. Los niveles de glucosa en sangre de las muestras de sangrado de la cola se determinaron utilizando ACCU-Chek® Compact Plus (Roche, # 075177294001). Se calculó el porcentaje de reducción de la glucosa en sangre desde los niveles medios de glucosa en sangre del grupo de control para cada animal en cada punto de tiempo. La reducción porcentual media de la glucosa en sangre se calculó para el grupo H4H10223P en cada punto de tiempo.

[0196] La Tabla 9 resume los niveles medios de glucosa en sangre de cada grupo de tratamiento y la reducción porcentual media de glucosa en sangre del grupo H4H10223P.

[0197] En otro experimento (Estudio 2), treinta y un ratones C57BL/6 machos se pusieron bajo una HFD a las 5 semanas de edad y se mantuvieron en la dieta por las subsiguientes 11 semana. A las 16 semanas de edad, los ratones se dividieron en 4 grupos de 7 u 8 animales. Cada grupo recibió inyecciones subcutáneas de H4H10223P (30 mg/kg; n = 8), H4H10231 P (5 o 30 mg/kg; n = 8), o el anticuerpo isotipo de control (30 mg/kg; n = 7), cada

cinco días. A los días 1, 4, 7, 11, 15 y 20 después de la dosificación inicial de anticuerpos se recogieron muestras de sangrado de cola de los ratones.

[0198] La Tabla 10 resume los niveles medios de glucosa en sangre de cada grupo de tratamiento.

[0199] La Tabla 11 resume las reducciones porcentuales medias de glucosa en sangre a partir de los niveles medios de glucosa del grupo de control para cada grupo de tratamiento.

Tabla 9: (Estudio 1) Niveles de glucosa en sangre de cada grupo de tratamiento y porcentaje de reducción en los niveles de glucosa en sangre en el grupo H4H10223P en comparación con el grupo de control

Tiempo (días)	Control	H4H10223P (30 mg/kg)	
	Nivel de glucosa en sangre (mg/dL)	Nivel de glucosa en sangre (mg/dL)	% de reducción
0	211 ± 7	211 ± 6	0 ± 3
2	212 ± 24	146 ± 9	31 ± 4
6	200 ± 7	154 ± 6	23 ± 3
9	174 ± 8	148 ± 7	15 ± 4
13	182 ± 12	144 ± 5	21 ± 3
16	158 ± 5	122 ± 5	23 ± 3
20	155 ± 11	139 ± 9	10 ± 6

Tabla 10: (Estudio 2) Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) para cada grupo de tratamiento

Tiempo (días)	Control	H4H10223P	H4H10231P (5 mg/kg)	H4H10231P (30 mg/kg)
0	225 ± 10	225 ± 10	225 ± 10	225 ± 10
1	206 ± 11	214 ± 5	172 ± 3	192 ± 7
4	194 ± 4	152 ± 7	156 ± 5	141 ± 5
7	215 ± 8	191 ± 6	181 ± 5	167 ± 6
11	199 ± 6	164 ± 8	160 ± 8	149 ± 6
15	227 ± 10	222 ± 14	219 ± 17	191 ± 5
20	204 ± 5	183 ± 9	180 ± 5	171 ± 7

Tabla 11: (Estudio 2) Porcentaje de reducción en los niveles de glucosa en sangre en comparación con el grupo control para cada grupo de tratamiento.

Tiempo (días)	H4H10223P	H4H10231P (5 mg/kg)	H4H10231P (30 mg/kg)
0	0±5	0±4	0±5
1	-4 ± 2	17 ± 2	7±3
4	22 ± 3	20 ± 3	27 ± 2
7	11 ± 3	16 ± 2	23 ± 3
11	18 ± 4	20 ± 4	25 ± 3
15	3±6	4± 8	16 ± 2

Resultados

[0200] Como se muestra en las Tablas 9 y 10, H4H10223P y H4H10231P disminuyeron significativamente los niveles de glucosa en sangre. Los máximos porcentajes de reducción de glucosa en sangre fueron de 31% para el grupo H4H10223P en el estudio 1, 22% para el grupo H4H10223P en el estudio 2, y 27% para el grupo H4H10231P en el estudio 2 (Tablas 9 y 11).