

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 113**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 20203790 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 3828203**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para tratar la acumulación de tejidos grasos**

30 Prioridad:

17.12.2013 US 201361917136 P  
03.04.2014 US 201461974660 P  
03.06.2014 US 201462007255 P  
03.09.2014 US 201462045189 P  
03.11.2014 US 201462074225 P  
03.11.2014 US 201462074227 P  
03.11.2014 US 201462074234 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.10.2024**

73 Titular/es:

**MHS CARE - INNOVATION LLC (100.0%)**  
2500 MetroHealth Drive  
Cleveland, OH 44109, US

72 Inventor/es:

**WOLFE, MICHAEL M. y**  
**BOYLAN, MICHAEL O.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 984 113 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Composiciones y procedimientos para tratar la acumulación de tejidos grasos

En este documento se describen diferentes ejemplos de realización, por lo general en relación con composiciones y procedimientos para el tratamiento de la acumulación de grasa en el tejido mediante el uso de antagonistas moleculares, tales como anticuerpos monoclonales (mAbs), que se unen a polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP). La acumulación de tejido graso se produce en varias enfermedades o afecciones diferentes, que pueden tratarse utilizando tales antagonistas/anticuerpos monoclonales. Además, generalmente se describe el tratamiento de tales enfermedades o afecciones mejorando la tolerancia a la glucosa sin necesidad de aumentar la insulina sérica mediante la administración de tales antagonistas/anticuerpos monoclonales. En particular, la presente invención se dirige a una composición para su uso en el tratamiento de la obesidad, el síndrome de Cushing inducido por la alimentación, el síndrome metabólico, la acumulación de tejido graso en el hígado, la acumulación de tejido graso en el epiplón o la acumulación de tejido graso subcutáneo mediante el uso de antagonistas moleculares, tales como, en particular, antagonistas moleculares del polipéptido inhibidor gástrico (GIP).

La obesidad es una afección médica en la que se ha acumulado un exceso de grasa corporal en la medida en que tiene un efecto negativo sobre la salud. En los Estados Unidos, se considera que la obesidad ocurre cuando el índice de masa corporal (IMC) de una persona, calculado dividiendo el peso de la persona por el cuadrado de la altura de la persona, es de 30 kg/m<sup>2</sup> o más. La obesidad puede surgir de una combinación de factores que incluyen una ingesta calórica excesiva, una dieta poco saludable, la falta de actividad física, la genética, la edad y la falta de sueño. La obesidad aumenta la probabilidad de padecer diversas enfermedades, como enfermedades cardíacas, diabetes tipo 2, apnea obstructiva del sueño, algunos cánceres y osteoartritis.

El síndrome metabólico se diagnostica cuando tres de las cinco siguientes condiciones médicas son diagnosticadas juntas: aumento de la presión de la sangre, el exceso de grasa corporal alrededor de la cintura, alto contenido de glucosa en sangre en ayunas, triglicéridos séricos elevados, y bajos niveles de colesterol de alta densidad (HDL). El síndrome metabólico también aumenta el riesgo de enfermedades como diabetes tipo 2, enfermedad coronaria, lipodistrofia y potencialmente algunas enfermedades psiquiátricas. El tratamiento incluye cambios en el estilo de vida y la medicación.

La hiperlipidemia es una condición en la que los niveles de lípidos y/o lipoproteínas en la sangre están anormalmente elevados. La hiperlipidemia primaria suele deberse a causas genéticas, mientras que la hiperlipidemia secundaria surge de otros factores subyacentes como la diabetes mellitus, el uso de determinadas drogas y el consumo de alcohol. La hiperlipidemia se puede dividir en hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. La hipercolesterolemia generalmente se diagnostica en los Estados Unidos cuando el nivel de colesterol total es superior a 240 mg/dl. La hipertrigliceridemia generalmente se diagnostica en los Estados Unidos cuando los niveles de triglicéridos son superiores a 500 mg/dl.

La diabetes mellitus no dependiente de insulina (Tipo II) se produce cuando las células del cuerpo no responden adecuadamente a la insulina, una condición conocida como resistencia a la insulina. Como resultado, los niveles altos de azúcar en sangre persisten durante un período prolongado. La causa principal es el peso corporal excesivo y la falta de ejercicio. Las complicaciones a largo plazo pueden incluir enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal y daño ocular.

El síndrome de Cushing se asocia con la exposición prolongada a niveles anormalmente altos de la hormona cortisol. El cortisol se produce en las glándulas suprarrenales y generalmente es inducido por corticotropina. Sin embargo, el síndrome de Cushing inducido por alimentos ocurre cuando las glándulas suprarrenales responden de manera anormal al polipéptido inhibidor gástrico (GIP).

La enfermedad del hígado graso (FLD) es un problema de salud crónico global que ocurre tanto en adultos como en niños. La FLD clasificada clínicamente se divide en dos grandes grupos: FLD no alcohólica (NAFLD) y FLD alcohólica (AFLD). NAFLD y AFLD se caracterizan por un contenido de grasa hepática superior al 5-10%, siendo el único factor distintivo la causa subyacente de la enfermedad. Sin embargo, generalmente es difícil distinguir entre las dos clases de FLD basándose únicamente en las características morfológicas. Generalmente, la FLD ocurre en quienes consumen cantidades excesivas de alcohol, quienes pueden tener trastornos metabólicos o predisposiciones genéticas que influyen en el metabolismo de los ácidos grasos y/o quienes son obesos. Las comorbilidades comunes incluyen obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina) e hiperlipidemia.

Las patologías principales de FLD incluyen esteatosis hepática y esteatohepatitis con la progresión a cirrosis. La esteatosis ocurre cuando el contenido de lípidos en el hígado supera el 5-10% en peso, lo que indica una retención anormal de vesículas lipídicas e inhibición de la oxidación de ácidos grasos. La esteatosis se considera reversible, siempre que se identifique y resuelva la causa subyacente de la enfermedad.

En caso de que esteatosis persiste, puede evolucionar hacia la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) o esteatohepatitis alcohólica (ASH), dependiendo de la gravedad y la causa desencadenante. A diferencia de la esteatosis, NASH y ASH no son reversibles, solo se pueden tratar. Estos se caracterizan por una mayor acumulación de grasa, inflamación lobulillar mixta, degeneración en globo de los hepatocitos, núcleos de hepatocitos glucogenados y fibrosis pericelular. Pueden progresar a cirrosis y eventualmente cáncer de hígado.

Las terapias actuales para FLD incluyen (1) siguiendo un plan de dieta y ejercicio razonable, (2) evitar el empeoramiento de daños en el hígado que puede ocurrir a través de la pérdida de peso repentina o abuso de drogas, (3) la reducción de peso, (4), teniendo agentes sensibilizante a la insulina para disminuir la resistencia a la insulina y controlar la glucosa en sangre, (5) usar medicamentos para reducir los lípidos en sangre o medicamentos para mejorar la enfermedad hepática, y (6) buscar un trasplante de hígado.

En un entorno clínico, supresores del apetito trabajan en parte por medio de la producción de náuseas. Por lo tanto, uno puede perder peso si está dispuesto a sentirse enfermo durante el proceso. Dicho efecto secundario no es deseable, particularmente con respecto a pedirle a un paciente que mantenga el cumplimiento de un régimen de pérdida de peso.

Las terapias adicionales contra FLD y otras enfermedades que implican la acumulación de grasa son deseables.

Fulurija A. et al describen en "Vaccination against GIP for the treatment of obesity" PLoS One. 9 de septiembre de 2008; 3 (9): e3163, para bloquear la señalización de GIP de un enfoque de vacunación activo mediante el uso de péptidos de GIP unidos covalentemente a partículas similares a virus (VLP-GIP).

El documento US 2006/088550 A1 proporciona, entre otras cosas, una composición que comprende una partícula similar a virus (VLP) y al menos un antígeno, en la que dicho antígeno es una proteína de GIP o un fragmento de GIP ligado a la VLP, respectivamente. Además, se proporciona un procedimiento para producir la composición antes mencionada.

Ebert R. et al examinaron en "Influence of Gastric Inhibitory Polypeptide Antiserum on Glucose-Induced Insulin Secretion in Rats", *Endocrinology*, Volume 111, Issue 5, 1., [Influencia del antisuero del polipéptido inhibidor gástrico en la secreción de insulina inducida por la glucosa en ratas]. Noviembre de 1982, Páginas 1601-1606, la acción del antisuero del polipéptido inhibidor gástrico (GIP) sobre la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina tras una carga intraduodenal de glucosa (600 mg/kg) en ratas anestesiadas.

Gault VA et al desvelan en: "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP): anti-diabetic and anti-obesity potential?", *Neuropeptides*, 2003 Oct; 37 (5):253-63, ese polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP o polipéptido inhibidor gástrico) es una hormona gastrointestinal, que modula la secreción fisiológica de insulina.

Wolfe M. Michael et al describen el "Attenuation of gastric inhibitory polypeptide (GIP) signaling with GIP/FCIGG-fusion proteins" in the *Journal of molecular neuroscience*, Vol. 53, nº Supl. 1, 14 de diciembre de 2013, página S170.

Irwine N. et al describe en "Evidence for beneficial effects of compromised gastric inhibitory polypeptide action in obesity-related diabetes and possible therapeutic implications", *Diabetologia*, 2009 Sep; 52 (9): 1724-1731. doi: 10.1007/s00125-009-1422-8. Epub 2009 Jun 17, que la presencia de receptores GIP funcionales en los adipocitos y el papel clave que juega GIP en el metabolismo de lípidos y la deposición de grasas sugieren un posible efecto beneficioso de la acción comprometida de GIP en la obesidad y la resistencia a la insulina.

Ranganath L.R., Pinkey J. et al. desvela en "The Paradoxical Role of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) in Diet and Eating Behaviour in Health and Disease", *Handbook of Behavior, Food and Nutrition* (pp.241-257), 1.º ed., pp.241-257. Enero de 2011, Springer Science & Business Media, que El polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP) es una hormona intestinal que se libera en respuesta a la ingesta de nutrientes, principalmente hidratos de carbono y grasas.

Wolfe MM et al desvela en "Obesity and the gastrointestinal tract: you are what you eat", *J Clin Gastroenterol*, 2014; 48 (10): 817-22, que la obesidad representa un síndrome multifactorial complejo que se desarrolla debido a interacciones entre factores genéticos y ambientales y es una de las principales causas de enfermedad y muerte.

#### **BREVE RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN**

La presente divulgación se dirige a una composición para su uso en el tratamiento de la obesidad, el síndrome de Cushing inducido por alimentos, el síndrome metabólico, la acumulación de tejido graso en el hígado, la acumulación de tejido graso en el epiplón o la acumulación de tejido graso subcutáneo mediante el uso de antagonistas moleculares, tales como en particular antagonistas moleculares del polipéptido inhibidor gástrico (GIP).

La invención está definida a través de las reivindicaciones adjuntas.

Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los dispositivos, los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por medio de terapia (o diagnosis).

#### **Breve descripción de los dibujos**

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos en color, previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

La siguiente es una descripción breve de los dibujos, que se presentan para los propósitos de ilustrar los ejemplos de realización descritos en este documento y no a los efectos de limitar la misma.

La FIG. 1A es un gráfico que muestra el peso corporal de los ratones frente al tiempo para tres grupos diferentes de ratones durante un período de estudio de 17 semanas. Los ratones C57BL/6 alimentados con una dieta rica en grasas son un modelo establecido de obesidad inducida por la dieta y síndrome metabólico asociado. Los ratones "control HFD" fueron alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) y se les administró solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante inyección intraperitoneal. Los ratones "HFD-mAb" se alimentaron con una dieta HFD y se les administró, mediante inyección intraperitoneal, el anticuerpo monoclonal antagonista del polipéptido inhibidor gástrico (GIP mAb) en PBS a 60 mg/kg de peso corporal (BW) por semana. Los ratones "Iso-diet" fueron alimentados con una dieta isocalórica baja en grasas y no fueron tratados. En la dieta HFD, aproximadamente el 60% de las calorías totales provienen de las grasas, mientras que en la dieta isocalórica, aproximadamente el 10% de las calorías totales provienen de las grasas. Los ratones a los que se administró el mAb GIP aumentaron de peso mucho menos rápidamente. Los ratones de control de HFD tuvieron un promedio de ganancia de  $21,5 \pm 1,0$  gramos durante el periodo de estudio 17 semanas. Los ratones HFD-mAb tuvieron un aumento de peso medio de  $11,5 \pm 0,5$  gramos durante el período de estudio de 17 semanas. La diferencia en el aumento de peso entre estos dos grupos fue significativa con un valor de p de 0,00000007.

La FIG. 1B es un gráfico que muestra el porcentaje de aumento de peso en función del tiempo para los tres grupos diferentes de ratones. Los ratones a los que se administró el mAb GIP aumentaron de peso mucho menos rápidamente. Los ratones de control HFD aumentaron de peso casi el doble que los ratones HFD-mAb.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (i.p.) (IPGTT). Después del período de estudio de 17 semanas, 6 ratones de cada grupo se sometieron a IPGTT. Después de la administración i.p. de una solución de glucosa (2 mg de glucosa/kg de peso del ratón), se recogió sangre en los tiempos 0, 10, 30, 60 y 120 minutos y se midió el contenido de glucosa. La concentración de glucosa en sangre se representa en función del tiempo en el gráfico. Los ratones de control HFD fueron menos eficientes que los ratones HFD-mAb o los ratones Iso-diet en su capacidad para manejar una carga de glucosa i.p. Esto es coherente con el desarrollo de intolerancia a la glucosa en los ratones de control HFD, pero no en los ratones HFD-mAb o ratones Iso-diet.

La FIG. 3 muestra imágenes de resonancia magnética representativas de ratones. Se muestran imágenes representativas de los ratones HFD-control (izquierda) y los ratones HFD-mAb (derecha). Las imágenes representan una vista lateral del ratón con la parte anterior de los ratones en la parte superior y la parte posterior en la parte inferior de la imagen. Las áreas blancas o brillantes representan áreas con alto contenido de grasa.

La FIG. 4 muestra la fracción de grasa hepática derivada de la resonancia magnética de fracción de grasa compensada por relajación (RCFF). Al final del período de dieta de 17 semanas, 6 ratones de cada grupo fueron anestesiados y sometidos a resonancia magnética. La técnica RCFF se utilizó para evaluar cuantitativamente la fracción de grasa hepática en cada ratón. Se representa gráficamente la fracción de hígado promedio para cada grupo de tratamiento. Los animales de control acumularon el doble de volumen de grasa en sus hígados en comparación con los ratones tratados con el mAb específico de GIP ( $p = 0,03$ ).

La FIG. 5 muestra la fracción de grasa omental derivada de la resonancia magnética de fracción de grasa compensada por relajación (RCFF) después del período de dieta de 17 semanas. Se representa gráficamente la fracción de grasa omental promedio para cada grupo de tratamiento. Los animales de control acumularon casi 3,5 veces más volumen de grasa omental que los ratones tratados con el mAb específico de GIP ( $p = 0,0005$ ).

La FIG. 6 muestra la fracción de grasa subcutánea derivada de la resonancia magnética de fracción de grasa compensada por relajación (RCFF). Se representa gráficamente la fracción de grasa subcutánea promedio para cada grupo de tratamiento. Los animales de control acumularon aproximadamente 2 veces más volumen de grasa subcutánea que los ratones tratados con el mAb específico de GIP ( $p = 0,0002$ ).

La FIG. 7 muestra fotografías representativas de secciones transversales de tejido teñido de hígado tomadas de ratones sacrificados después del período de estudio de 17 semanas. Los hígados se retiraron y se fijaron en formalina. A continuación, el tejido fijado se seccionó y se tiñó con Oil Red O, un colorante diazo lisocromo utilizado para teñir triglicéridos y lípidos neutros. El tejido fijado fue seccionado y teñido con Oil Red O, un tinte diazo lisocromo utilizado para teñir triglicéridos y lípidos neutros. Los paneles representan muestras representativas, que muestran una marcada reducción en las gotitas de grasa de color rojo oscuro en el hígado de los ratones HFD-mAb (derecha) en comparación con los ratones de control HFD (izquierda).

La FIG. 8 es un conjunto de dos fotografías que comparan la grasa omental encontrada en un ratón de control HFD (izquierda) con la de un ratón HFD-mAb (derecha) después del período de estudio de 17 semanas. La grasa es blanca y se ve mucha más grasa en el ratón de control HFD.

La FIG. 9 muestra los niveles de triglicéridos (TG) medidos en el suero de ratones. Al final del período de dieta de 17 semanas, se sacrificaron los ratones, se extrajo sangre completa, se preparó suero y se midieron los triglicéridos en suero. Se representan gráficamente los niveles medios de TG en suero para los ratones de cada grupo. Los niveles de TG en ratones de control HFD fueron 1,44 veces mayores que los niveles de TG en ratones HFD-mAb ( $p = 0,02$ ). Los niveles más altos de TG están asociados con la obesidad y el síndrome metabólico.

La FIG. 10 muestra los niveles de colesterol total (TC) medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Los niveles de TC en ratones de control HFD fueron 1,55 veces mayores que los niveles de TC en ratones HFD-mAb ( $p = 0,006$ ). Los niveles más altos de CT están asociados con la obesidad y el síndrome metabólico.

La FIG. 11 muestra la relación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) a colesterol total (TC) medido en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Se traza el valor medio de cada grupo. La relación de HDL a colesterol total en ratones HFD-mAb fue 25% más alta que la relación de HDL a niveles de colesterol total en ratones de control HFD (valor de  $p = 0,03$ ). Son deseables proporciones más altas de HDL con respecto a los niveles de colesterol total, ya que las proporciones más bajas están asociadas con la obesidad y el síndrome metabólico.

La FIG. 12 muestra los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Se representan gráficamente los niveles medios de LDL en suero para los ratones de cada grupo. Los niveles de LDL en ratones de control HFD fueron 1,95 veces mayores que los niveles de LDL en ratones HFD-mAb ( $p = 0,007$ ). Los niveles más altos de LDL (el colesterol "malo") están asociados con la obesidad y el síndrome metabólico.

La FIG. 13 muestra los niveles de insulina medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Se representan gráficamente los niveles medios de insulina en suero para 5 ratones de cada grupo. Los niveles de insulina en ratones de control HFD fueron 2,6 veces mayores que los niveles de insulina en ratones HFD-mAb ( $p = 0,03$ ). Los niveles más altos de insulina están asociados con la obesidad, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. Tenga en cuenta que el eje y está en unidades de picogramos/mililitro.

La FIG. 14 muestra los niveles de adiponectina medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Se representan gráficamente los niveles medios de adiponectina en suero para los ratones de cada grupo. Los niveles de adiponectina en ratones de control HFD fueron 1,35 veces mayores que los niveles de adiponectina en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de adiponectina están asociados con un aumento de la grasa corporal total. Tenga en cuenta que el eje y está en unidades de microgramos/mililitro.

La FIG. 15 muestra los niveles de leptina medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Se representan gráficamente los niveles medios de leptina en suero para los ratones de cada grupo. Los niveles de leptina en ratones de control HFD fueron 5,73 veces mayores que los niveles de leptina en ratones HFD-mAb ( $p = 0,006$ ). Los niveles más altos de leptina están asociados con un aumento de la grasa corporal total. Tenga en cuenta que el eje y está en unidades de picogramos/mililitro.

La FIG. 16 muestra los niveles de glucagón medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Los niveles medios de glucagón en suero para los ratones de cada grupo se representan más arriba. No hubo diferencias significativas en los niveles de glucagón sérico entre los grupos. Tenga en cuenta que el eje y está en unidades de picogramos/mililitro.

La FIG. 17 muestra los niveles de péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) medidos en el suero de ratones después del período de dieta de 17 semanas. Se representan gráficamente los niveles medios de GLP-1 en suero para los ratones de cada grupo. No hubo diferencias significativas en los niveles de GLP-1 sérico entre los grupos. Tenga en cuenta que el eje y está en unidades de picogramos/mililitro.

La FIG. 18 es un gráfico que muestra la actividad relativa de tres anticuerpos humanizados para GIP, junto con el anticuerpo original, un control positivo y un control negativo, en un ensayo de neutralización *in vitro*. El eje y es la actividad relativa y no tiene unidades.

### **Descripción detallada**

Las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las frases de transición abiertas "comprende(n)", "incluye(n)", "que tiene(n)", "contiene(n)", y variantes de las mismas requiere(n) la presencia de los ingredientes o las etapas mencionadas y permite(n) la presencia de otros ingredientes/etapas. Estas frases también deben interpretarse como que revelan las frases cerradas "consisten en" o "consisten esencialmente en" que permiten solo los ingredientes/pasos mencionados y las impurezas inevitables, y excluyen otros ingredientes/pasos.

Los valores numéricos en la memoria descriptiva y reivindicaciones de esta solicitud deben entenderse para incluir valores numéricos que son los mismos cuando se reducen al mismo número de cifras significativas y valores numéricos que difieren del valor declarado por menor que el error experimental de la técnica de medición convencional del tipo descrito en la presente solicitud para determinar el valor.

Todos los intervalos descritos en el presente documento son inclusivos del punto final recitado e independientemente combinable (p. ej., el intervalo de "de 2 gramos a 10 gramos" es inclusivo de los puntos finales, 2 gramos y 10 gramos, y todos los valores intermedios).

El término "aproximadamente" se puede utilizar para incluir cualquier valor numérico que puede variar sin cambiar la función básica de ese valor. Cuando se usa con un rango, "aproximadamente" también revela el rango definido por los valores absolutos de los dos puntos finales, por ejemplo, "aproximadamente 2 a aproximadamente 4" también revela el rango "de 2 a 4". El término "aproximadamente" puede referirse a más o menos el 10% del número indicado.

El término "identidad" se refiere a la similitud entre un par de secuencias (nucleótido o aminoácido). La identidad se mide dividiendo el número de residuos idénticos por el número total de residuos y multiplicando el producto por 100 para lograr un porcentaje. Por tanto, dos copias de exactamente la misma secuencia tienen 100% de identidad, pero las secuencias que están menos conservadas y tienen delecciones, adiciones o reemplazos pueden tener un grado de

identidad más bajo. Los expertos en la técnica reconocerán que varios programas informáticos, como los que emplean algoritmos como BLAST, están disponibles para determinar la identidad de secuencia. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa NBLAST, y las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa BLASTP, utilizando los parámetros predeterminados de los respectivos programas.

5 Dos secuencias diferentes pueden variar entre sí sin afectar la función general de la proteína codificada por la secuencia. A este respecto, es bien conocido en la técnica que los aminoácidos químicamente similares pueden reemplazarse entre sí, a menudo sin cambiar su función. Las propiedades relevantes pueden incluir ácido/básico, polar/apolar, carga eléctrica, hidrofobicidad y estructura química. Por ejemplo, los residuos básicos Lys y Arg se consideran químicamente similares y a menudo se reemplazan entre sí, al igual que los residuos ácidos Asp y Glu, los  
10 residuos hidroxilo Ser y Thr, los residuos aromáticos Tyr, Phe y Trp, y los residuos no polares. Ala, Val, Ile, Leu y Met. Estas sustituciones se consideran "conservadas". De manera similar, se conocen en la técnica codones de nucleótidos y variaciones aceptables. Por ejemplo, los codones ACT, ACC, ACA y ACG codifican todos para el aminoácido treonina, es decir, el tercer nucleótido puede modificarse sin cambiar el aminoácido resultante. La similitud se mide dividiendo el número de residuos similares por el número total de residuos y multiplicando el producto por 100 para lograr un  
15 porcentaje. Tenga en cuenta que la similitud y la identidad miden propiedades diferentes.

Un "anticuerpo" es una proteína utilizada por el sistema inmune para identificar un antígeno diana. La unidad funcional básica de un anticuerpo es un monómero de inmunoglobulina. El monómero está formado por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que forman una proteína en forma de Y. Cada cadena ligera está compuesta por un dominio constante y un dominio variable. Para las cadenas ligeras, el dominio constante también puede denominarse "región constante" y el dominio variable también puede denominarse "región variable". Cada cadena  
20 pesada está compuesta por un dominio variable y tres o cuatro dominios constantes. Para las cadenas pesadas, los dominios constantes juntos se denominan "región constante" y el dominio variable también puede denominarse "región variable". Los brazos de Y se denominan fragmento, región de unión (Fab) del antígeno y cada brazo se denomina fragmento Fab. Cada fragmento Fab está compuesto por un dominio constante y un dominio variable de una cadena pesada y un dominio constante y un dominio variable de una cadena ligera. La base de la Y se denomina región Fc y está compuesta por dos o tres dominios constantes de cada cadena pesada. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera en la región Fab son la parte del anticuerpo que se une a GIP. Más específicamente, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables se unen a su antígeno (es decir, el GIP). En la secuencia de aminoácidos de cada dominio variable, hay tres CDR dispuestas de forma no consecutiva. El término  
25 "completo" se usa en este documento para referirse a un anticuerpo que contiene la región Fab y la región Fc.

Un "antagonista de GIP" de acuerdo con la presente descripción es una molécula que se une a GIP e interfiere con la acción biológica de GIP.

La presente divulgación se refiere a una composición para uso en el tratamiento de pacientes con moléculas que antagonizan GIP, es decir, se unen a GIP. A este respecto, el polipéptido insulínico dependiente de glucosa, también denominado polipéptido inhibidor gástrico o GIP, es un péptido insulínico liberado de las células K  
35 intestinales durante el período posprandial. Como incretina, GIP estimula la secreción de insulina al estimular las células beta pancreáticas en respuesta a la ingesta de alimentos. GIP, también anotado en este documento como GIP (1-42), circula principalmente como un polipéptido de 42 aminoácidos, pero también está presente en una forma que carece de los primeros 2 aminoácidos N-terminales (GIP (3-42)). GIP (1-30)-NH<sub>2</sub> o GIP (1-30)-alfa amida es un derivado sintético de GIP (1-42) que carece de los últimos 12 aminoácidos C-terminales. GIP (1-30)-NH<sub>2</sub> tiene las mismas funciones biológicas que GIP (1-42). Se ha planteado la hipótesis de GIP (1-30)-NH<sub>2</sub> de origen natural, pero no se ha identificado en ninguna especie biológica.  
40

El GIP funciona por medio de la unión a su receptor análogo (GIPR) que se encuentra en la superficie de las células diana. GIPR es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) de glucagón-secretina, que posee siete dominios transmembrana. El GIP nativo (1-42) y el derivado sintético GIP (1-30)-NH<sub>2</sub> se unen a GIPR con alta afinidad y poseen propiedades agonistas. Los receptores GIP también se expresan en los adipocitos, que responden al aumento de los niveles de GIP con una mayor captación de glucosa, síntesis de ácidos grasos e  
45 incorporación de ácidos grasos en los lípidos dentro de los adipocitos. El GIP nativo (1-42) y el derivado sintético GIP (1-30)-NH<sub>2</sub> también inhiben la lipólisis en los adipocitos inducida por el glucagón y los agonistas del receptor β-adrenérgico, incluido el isoproterenol.  
50

El GIP está bien conservado entre humanos (*Homo sapiens*) (SEQ ID NO: 1), ratones (*Mus musculus*) (SEQ ID NO: 2), ratas (*Rattus norvegicus*) (SEQ ID NO: 3) y cerdos. (*Sus scrofa*) (SEQ ID NO: 4). Solo hay cuatro sustituciones entre las cuatro secuencias, todas las cuales están conservadas. Las secuencias de 42 aminoácidos de estas cuatro especies se enumeran a continuación:

55 SEQ ID NO: 1: YAEGT FISDY SIAMD KIHQQ DFNWV LLAQK GKKND WKHNI TQ  
SEQ ID NO: 2: YAEGT FISDY SIAMD KIRQQ DFNWV LLAQR GKKSD WKHNI TQ  
SEQ ID NO: 3: YAEGT FISDY SIAMD KIRQQ DFNWV LLAQK GKKND WKHNL TQ  
SEQ ID NO: 4: YAEGT FISDY SIAMD KIRQQ DFNWV LLAQK GKKSD WKHNI TQ

La presente solicitud se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de la obesidad, el síndrome de Cushing inducido por alimentos, el síndrome metabólico, la acumulación de tejido graso en el hígado, la acumulación de tejido graso en el epiplón o la acumulación de tejido graso subcutáneo mediante el uso de composiciones que contienen antagonistas moleculares que se unen al GIP. En realizaciones particulares, los antagonistas moleculares son anticuerpos monoclonales completos (es decir, mAb GIP). En la enfermedad del hígado graso, la esteatosis da como resultado la acumulación de grasas triglicéridas en las células del hígado. Se sabe que después de la administración oral de glucosa, los niveles séricos de GIP aumentan de 5 a 6 veces, lo que estimula la liberación de insulina, lo que promueve la absorción de glucosa. GIP también activa Akt/PKB, que promueve la translocación de la membrana del transportador de glucosa-4, lo que conduce a una mayor absorción de glucosa por los adipocitos, lo que conduce a la creación y almacenamiento de grasa. Como resultado, se planteó la hipótesis de que antagonizar el GIP y reducir su actividad biológica inhibiría la absorción de glucosa y, por lo tanto, conduciría a una menor creación y almacenamiento de grasa. La presente divulgación muestra que la retención de grasa en el hígado, el epiplón o el tejido subcutáneo se puede reducir administrando una composición que comprende un antagonista de anticuerpos monoclonales GIP a un paciente. Otros antagonistas moleculares que son variaciones de las CDR del anticuerpo monoclonal también pueden ser eficaces para reducir la acumulación de tejido graso.

Los antagonistas moleculares de GIP descritos en la presente memoria también pueden ser útiles para mejorar otras enfermedades o afecciones que pueden tratarse reduciendo la expresión de GIP o reduciendo la ingesta calórica o la pérdida de peso, como la obesidad, el síndrome metabólico, la hiperlipidemia, la diabetes de tipo II y el síndrome de Cushing inducido por la alimentación.

Los antagonistas de anticuerpos de GIP monoclonal de la presente divulgación se pueden generar y cribar de la siguiente manera. Se sintetizaron químicamente dos péptidos con las siguientes secuencias de aminoácidos:

GIP (1-17)+C: YAEGT FISDY SIAMD KIC (SEQ ID NO: 5)

C+mGIP (26-42): CLLAQ RGKKS DWKHN ITQ (SEQ ID NO: 6)

La secuencia de aminoácidos de GIP(1-17)+C corresponde a los primeros 17 aminoácidos comúnmente compartidos por GIP de humanos, ratones, ratas y cerdos maduros. La secuencia también contiene un residuo de cisteína extra en el extremo N para facilitar la conjugación con la hemocianina de lapa californiana (KLH). La secuencia de aminoácidos de C+mGIP (26-42) corresponde a los últimos 17 aminoácidos de GIP de ratón maduro, que tiene solo dos sustituciones cuando se compara por separado con GIP humano o GIP porcino, y solo tres sustituciones cuando se compara con GIP de rata. La secuencia también contiene un residuo extra de cisteína en el extremo C-terminal para facilitar la conjugación con KLH. Los dos péptidos se conjugaron con KLH. Luego, cada conjugado se usó por separado para inyectar un grupo de cuatro ratones en cuatro ocasiones diferentes. Los ratones se inyectaron en las semanas 1, 4, 7, 10 y 24 antes de recolectar los bazos.

Los bazos se retiraron de los ratones inmunizados, y se aislaron esplenocitos antes de fusionarse las células B con células de mieloma inmortalizadas *in vitro*. Se incluyó polietilenglicol (PEG) en el proceso de fusión para aumentar la eficiencia. Las células fusionadas o los hibridomas se incubaron en medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) durante 14 días para eliminar las células de mieloma que no se fusionaron con células B. A continuación, las células de hibridoma se diluyeron con medio de incubación y se transfirieron a una serie de placas de 96 pocillos. Las diluciones fueron en la medida en que cada pocillo contenía aproximadamente una célula. Las células de hibridoma se expandieron varios días antes de que se recogiera el medio acondicionado o el sobrenadante con fines de cribado.

Placas de 96 pocillos se recubrieron con el ratón sintético GIP (1-42) (Phoenix Pharmaceuticals) mediante el uso de 50 µl de un 4 µg/ml en PBS. A continuación, se recogieron los sobrenadantes de hibridomas y se añadieron a los pocillos que contenían GIP de ratón (1-42) durante 4 horas a 37°C. A continuación, se retiraron los sobrenadantes y se lavaron para eliminar cualquier anticuerpo que no se uniera a GIP de ratón. A continuación, se añadió a los pocillos una solución de IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). La IgG-HRP anti-ratón de cabra se obtuvo de Jackson Laboratories y se usó a una dilución de 1 parte por 5000. Después de 1 hora de incubación a 37° C, se eliminó la solución de anticuerpo y los pocillos se lavaron 2 veces con 0,4 mg/ml de BSA en PBS.

Una solución que contiene un sustrato de HRP de 4 mg/ml de o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPO) en 0,4 mg/ml de urea peróxido de hidrógeno y 0,05 M de fosfato-citrato, pH 5,0, se añadió entonces a cada pocillo. Para cuantificar la actividad de HRP, se midió la absorbancia de luz a una longitud de onda de 490 nm para cada pocillo usando un lector de placas ELISA. Esto permitió identificar los hibridomas que generaban anticuerpos monoclonales que se unían al GIP de ratón en los pocillos.

A continuación, los sobrenadantes de los hibridomas identificados se mezclaron posteriormente con un 4 µg/ml de solución de ratón GIP durante 30 minutos a 37° C, después se añadió a los pocillos recubiertos con el ratón GIP como se describe anteriormente. Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, se lavaron los pocillos y se añadió a los pocillos IgG-HRP anti-ratón de cabra. Después de la incubación durante 1 hora, las muestras se lavaron y se añadió a cada pocillo una solución que contenía el sustrato HRP 4 mg/ml OPO en 0,4 mg/ml de peróxido de hidrógeno de urea y fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0. Se cuantificó la actividad de HRP en cada pocillo. En esta selección, los

anticuerpos monoclonales que se unen a GIP en suspensión serían "neutralizados" y no podrían unirse a GIP fijado en los pocillos. Por tanto, los pocillos con baja actividad de HRP correspondían a anticuerpos monoclonales que se unían más eficazmente a GIP en suspensión. Usando estos criterios, se identificaron cinco hibridomas que mejor generaban anticuerpos monoclonales (mAb) que se unirían al GIP de ratón en suspensión. Debido a la alta correspondencia de identidad entre GIP de ratón y GIP humana, se esperaba que estos mAb que se unían a GIP de ratón también se unieran a GIP humana.

A continuación, la capacidad de los sobrenadantes de hibridoma para neutralizar GIP y evitar la interacción ligando-receptor, el receptor de activación y la señalización dependiente del receptor se ensayó mediante el uso de un sistema de cultivo celular. Este sistema utilizó células informadoras (células LGIPR2), que poseen el gen lacZ bajo el control de un promotor que responde al monofosfato de adenosina cíclico (cAMP-) y expresan el GIPR de rata en la superficie celular. La adición de GIP a estas células conduce a la activación de GIPR, la inducción de una cascada de señalización que conduce a la acumulación de cAMP, la inducción del gen lacZ y la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa. Después de la adición de una muestra de prueba e incubación durante 4 horas, se usó un ensayo colorimétrico para medir el contenido de  $\beta$ -galactosidasa en lisados celulares. El grado de cambio de color es proporcional al nivel de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. El nivel de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa depende de la cantidad de GIP biológicamente activo libre en la muestra de prueba.

Los sobrenadantes de los cinco clones de hibridoma desarrollados en cultivo que dieron positivo en el ensayo de suspensión se diluyeron 1:1 y 1:20 con soluciones de GIP de ratón o humano. A continuación, se añadieron las mezclas a las células LGIPR2 y se incubaron antes de lavarlas y analizarlas para determinar la  $\beta$ -galactosidasa. Tres de los cinco sobrenadantes mostraron una inhibición significativa de GIP de ratón cuando se diluyó 1:1, y dos de esos tres sobrenadantes mostraron una inhibición significativa de GIP de ratón cuando se diluyó 1:20.

A fin de demostrar que los anticuerpos monoclonales fueron específicos para GIP, los sobrenadantes procedentes de los cinco hibridomas que dieron positivo en el ensayo de suspensión se diluyeron 1:1 con una solución 0,1 nM de humano péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). A continuación, se añadieron las mezclas a células LGLP-1R. Las células LGLP-1R son idénticas a las células LGIPR2 excepto que expresan el receptor GLP-1 y no el GIPR. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C antes de retirar las mezclas, se lavaron las células y se ensayó el contenido de  $\beta$ -galactosidasa. Ninguno de los sobrenadantes inhibió el GLP-1 nativo, lo que indica especificidad para GIP.

A continuación, los dos hibridomas que produjeron los sobrenadantes que mostraban una inhibición significativa de ratón GIP cuando diluidos 1:20 se expandieron y ~ 5 X 10<sup>5</sup> células se recogieron y se preparó ARN total mediante el uso de un kit adquirido de Ambion (RNAqueous-4PCR, Life Technologies). Se utilizaron dos microgramos del ARN total para producir ADNc de primera hebra utilizando el sistema de primera hebra Superscript III para la síntesis de ADNc adquirido en Life Technologies. El cADN resultante se utilizó para amplificar el cADN que codifica las secuencias variables de las cadenas pesada y ligera en dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) separadas.

A fin de amplificar las secuencias variables de cadena pesada, un oligonucleótido con la secuencia CAGTCGAAGC TTTGAGGAGA CGGTGACCGTG GTCCTTGGC CCCAG (SEQ ID NO: 43) se utilizó como cebador inverso, y un oligonucleótido con la secuencia: CAACTAGGAT CCAGGTSMAR CTGCAGSAGT CWGG (SEQ ID NO: 44) se utilizó como cebador directo. El cebador inverso contiene la secuencia AAGCTT (SEQ ID NO: 45) en su extremo 5', que es la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción HindIII. El cebador directo contiene la secuencia GGATCC (SEQ ID NO: 46) en su extremo 5', que es la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI. Los productos resultantes de las PCR se digirieron con las enzimas HindIII y BamHI, luego se ligaron al plásmido pUC18 que también se digirió con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. La reacción de ligación se realizó usando el kit Fast-Link adquirido de Epicenter. La reacción de ligación se utilizó para transformar células bacterianas E. coli DH5A(Life Technologies). Las bacterias que absorbieron el plásmido se seleccionaron en placas de agar que contenían 50 microgramos/mililitro ( $\mu$ g/ml) de carbenicilina. Las colonias que crecieron en las placas de agar carbenicilina se recogieron y se cultivaron en cultivos de 2 ml durante 16 horas. Se recogieron las bacterias y se aisló el ADN plasmídico utilizando el procedimiento de minipreparación de lisis alcalina. El ADN plasmídico purificado se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII antes de que el ADN se resolviera por medio de electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,2% en un tampón Tris-borato. Los fragmentos de ADN en el gel se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron usando una lámpara ultravioleta. Los plásmidos que generaron fragmentos de restricción con tamaños moleculares aproximados de 374 pares de bases se secuenciaron mediante el uso de un servicio adquirido de Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL).

A fin de amplificar las secuencias variables de cadena ligera, el mismo procedimiento se siguió generalmente como se describe anteriormente. Las principales diferencias fueron que se utilizó un oligonucleótido con la secuencia: CAGTCGAAGC TTGTTAGATC TCCAGCTTG GTCCTTGGC CCCAG (SEQ ID NO: 47) como cebador directo, y un oligonucleótido con la secuencia CAACTAGGAT CCGACATTCA GCTGACCCAG TCTCCA (SEQ ID NO: 48) se utilizó como imprimación inversa. De nuevo, el cebador directo contiene la secuencia de reconocimiento para HindIII (SEQ ID NO: 45) y el cebador inverso contiene la secuencia de reconocimiento para BamHI (SEQ ID NO: 46). Los plásmidos que generaron fragmentos de restricción con tamaños moleculares aproximados de 355 pares de bases se secuenciaron mediante el uso de un servicio adquirido de Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL).

Los mAbs resultantes identificados mediante el uso del procedimiento descrito anteriormente son anticuerpos de ratón. Estos anticuerpos de ratón se humanizaron parcialmente formando un anticuerpo quimérico que posee los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de ratón fusionadas con las regiones constantes de la cadena pesada y ligera humana, respectivamente. Esto se hizo amplificando las secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los moldes utilizados en las PCR fueron los derivados de pUC18 que contienen las correspondientes secuencias de ADNc de cadena pesada o ligera variable. Las regiones variables de la cadena pesada se amplificaron utilizando un oligonucleótido con la secuencia TCACGAATTC TCAGGTCCAG CTGCAGGAGT (SEQ ID NO: 49) como cebador directo, y un oligonucleótido con la secuencia TTGGTGCTAG CTGAGGAGAC GGTGACCGT (SEQ ID NO: 50), como cebador inverso. El cebador directo contiene la secuencia GAATTC (SEQ ID NO: 51) en su extremo 5', que es la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. El cebador inverso contiene la secuencia GCTAGC (SEQ ID NO: 52) en su extremo 5', que es la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción NheI. Después de la amplificación por PCR, los fragmentos de ADN se digirieron con EcoRI y NheI y se ligaron al plásmido pFUSEss-CHlg-hG1 que también se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y NheI. El plásmido pFUSEss-CHlg-hG1 es un vector de expresión de mamíferos adquirido de InvivoGen (San Diego, CA). La clonación de las secuencias de ADNc de cadena pesada variable en este plásmido produce un gen que codifica una cadena pesada quimérica que consta de la región variable de ratón y una región constante humana. La reacción de ligación se realizó usando el kit Fast-Link adquirido de Epicenter. La reacción de ligación se utilizó para transformar células bacterianas *E. coli* DH5A(Life Technologies). Las bacterias que absorbieron el plásmido se seleccionaron en placas de agar que contenían 50 µg/ml de zeomicina. Las colonias que crecieron en las placas de agar con zeomicina se recogieron y se cultivaron en cultivos de 2 ml durante 16 horas. Se recogieron las bacterias y se aisló el ADN plasmídico usando el procedimiento de minipreparación de lisis alcalina. El ADN plasmídico purificado se digirió con las enzimas de restricción EcoRII y NheI antes de que el ADN se resolviera mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,2% en un tampón Tris-borato. Los fragmentos de ADN en el gel se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron usando una lámpara ultravioleta. El éxito de la clonación se confirmó mediante la identificación de un fragmento de ADN con un tamaño molecular de 373 pares de bases.

Las regiones variables de la cadena ligera se amplificaron mediante el uso de un oligonucleótido con la secuencia GTCACGAATTCAGACATTCAGCTGACCCAG (SEQ ID NO: 55) la secuencia polinucleotídica contiene (SEQ ID NOs: 51) para la restricción enzima EcoRI como cebador directo, y un oligonucleótido con la secuencia AGCCACCGTA CGTTTGATCT CCAGCTTGGT CCGA (SEQ ID NO: 53) como cebador inverso. El cebador inverso contiene la secuencia CGTACG (SEQ ID NO: 54) en su extremo 5', que es la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción BsiWI. Después de la amplificación por PCR, los fragmentos de ADN se digirieron con EcoRI y BswII y se ligaron al plásmido pFUSE2ss-CLlg-hK que también se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BswII. El plásmido pFUSE2ss-CLlg-hK es un vector de expresión de mamíferos adquirido de InvivoGen (San Diego, CA). La clonación de las secuencias de ADNc de cadena ligera variable en este plásmido produce un gen que codifica una cadena ligera quimérica que consta de la región variable de ratón y la región constante humana. La reacción de ligación se realizó usando el kit Fast-Link adquirido de Epicenter. La reacción de ligación se utilizó para transformar células bacterianas *E. coli* DH5α(Life Technologies). Las bacterias que absorbieron el plásmido se seleccionaron en placas de agar que contenían 50 µg/ml de blastocidina. Las colonias que crecieron en las placas de agar con blastocidina se recogieron y se cultivaron en cultivos de 2 ml durante 16 horas. Se recogieron las bacterias y se aisló el ADN plasmídico usando el procedimiento de minipreparación de lisis alcalina. El ADN plasmídico purificado se digirió con las enzimas de restricción EcoRII y BsiWI antes de que el ADN se resolviera mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,2% en un tampón Tris-borato. Los fragmentos de ADN en el gel se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron usando una lámpara ultravioleta. El éxito de la clonación se confirmó mediante la identificación de un fragmento de ADN con un tamaño molecular de 353 pares de bases.

A fin de expresar anticuerpos quiméricos que contienen las regiones variables clonadas a partir de los hibridomas y regiones constantes humanas, pFUSEss-Chig-hG1 y los derivados de pFUSE2ss-CLlg-HK que contienen la cadena pesada variable y secuencias variables de cadena ligera, respectivamente, se introdujeron en células de ovario de hámster chino (CHO-1) en cultivo. El ADN plasmídico se introdujo mediante transfección empleando el reactivo lipídico catiónico Turbofect (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) para facilitar la entrada de ADN en las células cultivadas. Dos días después de la transfección, se recogió el sobrenadante celular y se analizó la actividad neutralizante de GIP. A fin de demostrar la capacidad de los mAb quiméricos para neutralizar GIP, el sobrenadante celular se mezcló con un volumen igual de hGIP  $2 \times 10^{-9}$  M, antes de agregarlo a las células LGIPR2 en cultivo. Después de la incubación a 37°C durante 4 horas, las células se lisaron y se ensayó la actividad de la β-galactosidasa. En este ensayo, la combinación de los plásmidos que contienen las secuencias de cadena ligera variable y las secuencias de cadena pesada variable del hibridoma designado 10g10, pudo neutralizar la actividad de GIP en el ensayo de indicador basado en células.

Las regiones variables de los mAbs hechas e identificadas mediante el uso de los procedimientos descritos anteriormente se mantuvieron, y las regiones constantes fueron sustituidas con regiones constantes humanas. Alternativamente, los antagonistas de mAb de GIP podrían prepararse usando ratones transgénicos para producir mAb "completamente" humanos, o también podrían usarse otras tecnologías. Por ejemplo, los aminoácidos en los dominios variables que se conservan en los anticuerpos de ratón podrían reemplazarse con aminoácidos que se conservan en los anticuerpos humanos.

Por lo tanto, el antagonista del anticuerpo monoclonal resultante se une a GIP. En realizaciones particulares, el antagonista molecular usado en las composiciones de la presente divulgación puede unirse a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4. Dicho de otra manera, el antagonista (p. ej., el anticuerpo monoclonal) se une a los epítomos contenidos en estas cuatro secuencias.

En diversas realizaciones, el antagonista molecular tiene un peso molecular (MW) de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 500 kDa, incluyendo de aproximadamente alrededor de 120 kDa a aproximadamente 500 kDa. En otras realizaciones, el antagonista molecular puede tener una afinidad de unión por GIP caracterizada por un  $CI_{50}$  de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 7 nM.

Como se analizó previamente, el antagonista del anticuerpo monoclonal que se une a GIP tiene dominios variables en las cadenas ligeras y cadenas pesadas que se unen a GIP, o más específicamente las CDR de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas que se unen a GIP. Generalmente se contempla que los antagonistas moleculares de GIP de la presente divulgación comprenden un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en la que el dominio variable de cadena ligera tiene una primera región determinante de complementariedad (CDR) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24; y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y en la que el dominio variable de cadena pesada tiene una primera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y en el que el antagonista molecular del polipéptido inhibidor gástrico (GIP) es un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab o Fab', un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un anticuerpo monoclonal y comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada. Estas CDR se identificaron mediante diversas modificaciones de los dominios variables en la cadena ligera y la cadena pesada identificados en el hibridoma 10g10 mencionado anteriormente. Estas modificaciones se analizan con más detalle en la sección de Ejemplos a continuación. Más preferentemente, las CDR tienen 100% de identidad con estas secuencias de aminoácidos. En otras realizaciones particulares, el antagonista molecular comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una primera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. Se identificó que un dominio variable que contiene la combinación de estas tres CDR tiene una afinidad de unión muy alta por GIP. Más preferentemente, las CDR tienen 100% de identidad con estas secuencias de aminoácidos.

El antagonista molecular comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una primera CDR con 100% de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. Se identificó que un dominio variable que contiene la combinación de estas tres CDR tiene una afinidad de unión muy alta por GIP. Más preferentemente, las CDR tienen 100% de identidad con estas secuencias de aminoácidos.

Generalmente se contempló que estos dominios variables contienen tres CDR como se ha especificado anteriormente, estando las CDR unidas entre sí mediante grupos de enlace. Los grupos de enlace generalmente pueden ser cualquier grupo que permita que las CDR se unan a GIP. Por ejemplo, los grupos de enlace pueden ser cadenas de aminoácidos, como están presentes en los dominios variables naturales de los anticuerpos. Los aminoácidos pueden tener cualquier longitud deseada.

En realizaciones particulares, el antagonista molecular comprende un dominio variable de cadena ligera con al menos 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO 19. Más deseablemente, el dominio variable de cadena ligera tiene al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o tiene 100% de identidad con una de estas secuencias de aminoácidos. Estos dominios variables contienen diversas combinaciones de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23, y SEQ ID NO: 24, unidas entre sí con aminoácidos.

En otras realizaciones, el antagonista molecular comprende un dominio variable de cadena pesada con al menos 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO 30. Más deseablemente, el dominio variable de cadena pesada tiene al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o tiene una identidad del 100% con una de estas secuencias de aminoácidos. Estos dominios variables contienen diversas combinaciones de las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 32, y SEQ ID NO: 33, unidas entre sí con aminoácidos.

También se contemplan los antagonistas moleculares que tienen cualquier combinación de los dominios variables de cadena ligera y los dominios variables de cadena pesada descritos anteriormente. Más específicamente, algunos antagonistas moleculares contienen solo un dominio variable de cadena ligera y solo un dominio variable de cadena pesada. Otros contienen múltiples dominios variables de cadena ligera y dominios variables de cadena pesada; en estas realizaciones, normalmente los dominios variables de múltiples cadenas ligeras son los mismos y los dominios variables de múltiples cadenas pesadas son los mismos.

- 5 En otras realizaciones específicas, el antagonista molecular comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada. El dominio variable de cadena ligera tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, y SEQ ID NO: 19; y el dominio variable de cadena pesada tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30. Más particularmente, el dominio variable de cadena ligera y/o el dominio variable de cadena pesada tiene al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o tiene 100% de identidad con una de sus secuencias de aminoácidos enumeradas.
- 10 En realizaciones aún más específicas, el antagonista molecular tiene un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 80% de identidad a SEQ ID NO: 18, y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30. Nuevamente, estos dominios pueden tener al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o 100% de identidad con una de sus secuencias de aminoácidos enumeradas.
- 15 En realizaciones particularmente deseables, el antagonista molecular tiene un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO: 18, y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO: 29. En realizaciones más específicas, estos dominios pueden tener al menos un 95% o pueden tener un 100% de identidad con su secuencia de aminoácidos enumerada.
- 20 Los antagonistas moleculares de la presente divulgación tienen, en diversas realizaciones diferentes, un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada como se describe anteriormente. Se contempla particularmente que el antagonista molecular sea un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento Fab o Fab', un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un anticuerpo monoclonal del cual estos dominios variables serían parte.
- 25 Un fragmento variable de cadena única (scFv) comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, unido junto con un grupo de unión que por lo general tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 aminoácidos (aunque no necesita estar dentro de este intervalo). El término N de un dominio variable está conectado al término C del otro dominio variable. Si se desea, el scFv se puede pegar (con polietilenglicol) para aumentar su tamaño, como con certolizumab pegol. Se pueden unir dos scFv con otro grupo de enlace para producir un scFv en tándem.
- 30 Si un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada se unen entre sí con un grupo de enlace más corto para formar un scFv, los dos dominios variables pueden no plegarse juntos, y el scFv se dimerizará para formar un diacuerpo. Incluso los grupos de enlace más cortos pueden resultar en la formación de trímeros (es decir, un triacuerpo) y tetrámeros (es decir, un tetracuerpo).
- 35 Un anticuerpo monoclonal entero está formado a partir de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Nuevamente, cada cadena ligera y cada cadena pesada contiene un dominio variable. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada. Las dos cadenas pesadas se unen en una región de bisagra. Si la región constante de las cadenas pesadas se elimina por debajo de la región bisagra, se produce un fragmento  $F(ab')_2$  que contiene un total de cuatro dominios variables. El fragmento  $F(ab')_2$  se puede dividir en dos fragmentos Fab'. Un fragmento Fab' contiene grupos sulfhidrilo de la región bisagra. Se forma un fragmento Fab cuando la región constante de las cadenas pesadas se elimina por encima de la región de bisagra y no contiene grupos sulfhidrilo de la región de bisagra. Sin embargo, todos estos fragmentos contienen un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada.
- 40 En realizaciones deseables exploradas en experimentos descritos a continuación, el antagonista molecular es un anticuerpo monoclonal entero formado a partir de cadenas ligeras y cadenas pesadas que tienen las regiones variables/dominios descritos anteriormente, en combinación con regiones constantes humanas. En realizaciones específicas, la región constante de la cadena pesada es el isotipo IgG1.
- 45 En realizaciones particulares, el antagonista molecular es un anticuerpo monoclonal con un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 80% de identidad a SEQ ID NO: 18, y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30. Estos dominios pueden tener al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95% o 100% de identidad con una de sus secuencias de aminoácidos enumeradas.
- 50 En otras realizaciones particulares, el antagonista molecular es un anticuerpo monoclonal entero con una cadena ligera de dominio variable que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO: 18, y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO: 29. Estos dominios pueden tener al menos un 95% o pueden tener un 100% de identidad con su secuencia de aminoácidos enumerada.
- 55 El antagonista molecular de GIP, que en formas particulares es un anticuerpo monoclonal, a continuación, se puede utilizar en una composición que puede ser administrada a una persona. La composición contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista molecular de GIP. En realizaciones particulares, la composición contiene el antagonista molecular en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 miligramos por mililitro de la composición (p/v).

Las composiciones farmacéuticas que contienen el antagonista molecular de GIP se administran generalmente por una vía parenteral (es decir, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intrapleural, intravesicular o intratecal), como necesario por elección del fármaco y la enfermedad. La dosis usada en una formulación o aplicación particular estará determinada por los requisitos del estado particular de enfermedad y las limitaciones impuestas por las características de las capacidades de los materiales portadores. Se contempla que en la forma más deseable, la composición se administrará por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

La composición farmacéutica puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. El portador actúa como vehículo para administrar el antagonista molecular. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos líquidos como agua, aceite y alcoholes, en los que los antagonistas moleculares se pueden disolver o suspender.

La composición farmacéutica también puede incluir excipientes. Los excipientes particulares incluyen agentes tamponantes, tensioactivos, agentes conservantes, agentes de carga, polímeros y estabilizadores, que son útiles con estos antagonistas moleculares. Los agentes tamponadores se utilizan para controlar el pH de la composición. Los tensioactivos se utilizan para estabilizar proteínas, inhibir la agregación de proteínas, inhibir la adsorción de proteínas a las superficies y ayudar en el repliegamiento de proteínas. Los tensioactivos ejemplares incluyen Tween 80, Tween 20, Brij 35, Triton X-10, Pluronic F127 y dodecil sulfato de sodio. Los conservantes se utilizan para prevenir el crecimiento microbiano. Los ejemplos de conservantes incluyen alcohol bencílico, m-cresol y fenol. Los agentes de carga se utilizan durante la liofilización para agregar volumen. Se pueden usar polímeros hidrófilos como dextrano, hidroxietilalmidón, polietilenglicoles y gelatina para estabilizar proteínas. También se pueden utilizar como tensioactivos polímeros con restos apolares tales como polietilenglicol. Los estabilizadores de proteínas pueden incluir polioles, azúcares, aminoácidos, aminos y sales. Los azúcares adecuados incluyen sacarosa y trehalosa. Los aminoácidos incluyen histidina, arginina, glicina, metionina, prolina, lisina, ácido glutámico y mezclas de los mismos. Las proteínas como la seroalbúmina humana también pueden adsorberse competitivamente a las superficies y reducir la agregación del antagonista molecular similar a una proteína. Cabe señalar que las moléculas particulares pueden tener múltiples propósitos. Por ejemplo, la histidina puede actuar como un agente tampón y un antioxidante. La glicina se puede utilizar como agente amortiguador y como agente de carga.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un polvo, inyección, solución, suspensión, o emulsión. Se contempla que la composición se administre mediante inyección. A veces, el antagonista molecular de GIP se puede liofilizar usando técnicas estándar conocidas por los expertos en esta técnica. A continuación, el antagonista liofilizado puede reconstituirse con, por ejemplo, diluyentes adecuados tales como solución salina normal, agua estéril, ácido acético glacial, acetato de sodio, combinaciones de los mismos y similares.

La dosis dependerá de una variedad de factores, incluido el índice terapéutico de los fármacos, el tipo de enfermedad, la edad del paciente, el peso del paciente y la tolerancia. La dosis se elegirá generalmente para lograr concentraciones séricas de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml en el paciente. La dosis de un paciente particular puede ser determinada por el médico experto usando enfoques farmacológicos estándar en vista de los factores anteriores. La respuesta al tratamiento puede monitorizarse mediante análisis de los niveles de glucosa o insulina en sangre o fluidos corporales, o monitorizando los niveles de grasa en el paciente. El médico experto ajustará la dosis en función de la respuesta al tratamiento revelada por estas mediciones. Normalmente, una sola administración puede ser suficiente para producir un efecto terapéutico, pero se contempla que se usarán múltiples administraciones para asegurar una respuesta continua durante un período de tiempo sustancial. Debido a la naturaleza proteica de los antagonistas moleculares descritos en este documento, se cree que los antagonistas tendrán una vida media prolongada en el cuerpo, por lo que la composición solo necesitará administrarse una o dos veces al mes, o posiblemente una vez por semana. La concentración circulante del antagonista molecular debería ser suficiente para neutralizar el GIP que se genera durante y después de la comida.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los antagonistas moleculares de GIP de la presente descripción se pueden utilizar para la enfermedad hepática grasa u otras enfermedades que implican la acumulación de grasa en el tejido. El término "tratar" se usa para referirse a una reducción en la progresión de la enfermedad, una regresión en la enfermedad y/o un uso profiláctico para reducir la probabilidad de presentación de la enfermedad. Esto se puede medir de varias formas diferentes, como a través de la fracción de grasa hepática, la fracción de grasa omental o la fracción de grasa subcutánea.

Para los individuos obesos, se cree que los antagonistas moleculares de GIP inhibirán la unión de GIP a su receptor en los enterocitos, disminuyendo la absorción de glucosa postprandial por medio de la inhibición de la translocación inducida por GIP de transportes de sodio/glucosa (SGLT1) desde el citoplasma a la membrana luminal. La secreción de insulina inducida por GIP de las células beta pancreáticas también se atenuará, disminuyendo el almacenamiento de nutrientes asociado con una respuesta de insulina elevada. La inhibición de la unión de GIP a su receptor en los adipocitos también debería disminuir la captación de glucosa inducida por GIP en las células grasas y evitar que GIP inhiba la lipólisis. En general, esto da como resultado una absorción y almacenamiento de nutrientes menos eficiente, lo que promueve la pérdida de peso. Estos efectos también benefician a los pacientes con síndrome metabólico o hiperlipidemia.

Para los pacientes con diabetes tipo II, la inhibición de la unión GIP a su receptor en los enterocitos bajará la absorción de glucosa postprandial y azúcar en la sangre. Los pacientes que comen en exceso también se beneficiarán de los efectos reductores de peso de la neutralización de GIP.

5 Para pacientes susceptibles o que padecen enfermedad del hígado graso, la inhibición de la unión de GIP a su receptor en las células beta disminuirá la secreción de insulina posprandial, para de este modo reducir la acumulación de grasa inducida por insulina en el hígado.

Para los pacientes que sufren de síndrome de Cushing inducido por alimentos, inhibiendo la unión de GIP a su receptor en células suprarrenales reducirá o evitará el aumento de la secreción de cortisol inducida por GIP después de la ingesta de alimentos.

10 La presente divulgación se ilustrará aún más por medio de los ejemplos siguientes. Todas las proporciones son en peso a menos que se indique lo contrario.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1**

15 Los anticuerpos monoclonales se generaron y se cribaron como se describió anteriormente mediante el uso de hibridomas para identificar un anticuerpo monoclonal que tiene una alta afinidad de unión para el péptido inhibidor gástrico (GIP) en suspensión. Por tanto, se identificó el anticuerpo monoclonal 10g10.

20 El dominio variable de cadena ligera 10g10 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. La primera CDR del dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. La segunda CDR del dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. La tercera CDR del dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. El ADNc que codifica el dominio variable de cadena ligera 10g10 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 35.

25 El dominio variable de cadena pesada 10g10 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. La primera CDR del dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. La segunda CDR del dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34. La tercera CDR del dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. El ADNc que codifica el dominio variable de cadena pesada 10g10 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 39.

30 A modo de comparación, el anticuerpo 14B9 fue identificado por no tener afinidad de unión por GIP. El dominio variable de cadena ligera 14B9 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. La primera CDR del dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. La segunda CDR del dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. La tercera CDR del dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. El ADNc que codifica el dominio variable de cadena ligera 14B9 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8.

35 El dominio variable de cadena pesada 14B9 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. La primera CDR del dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. La segunda CDR del dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. La tercera CDR del dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. El ADNc que codifica el dominio variable de cadena pesada 14B9 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ. ID NO: 12.

### **Ejemplo 2**

#### **Materiales y procedimientos**

40 Se adquirieron 30 ratones macho C57BL/6 de nueve semanas de edad de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). El primer día del estudio, cada ratón pesaba entre 19 y 25 gramos. Posteriormente, los ratones se dividieron al azar en tres grupos de 10 ratones cada uno.

45 Todos los ratones tuvieron acceso libre a comida y agua durante todo el estudio. Todos los ratones se alojaron en una instalación para animales mantenida a  $22 \pm 2^\circ$  Celsius con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Los ratones se alojaron en grupos de cinco por jaula hasta que cada uno alcanzó un peso de 25 gramos. Posteriormente, los ratones se alojaron de dos a tres animales por jaula.

50 Se adquirieron una dieta rica en grasas (HFD) (nº de catálogo TD.06414) y una dieta isocalórica baja en grasas (nº de catálogo TD.08806) de Harlan-Teklad (Indianapolis, IN). El HFD constaba, en peso, de aproximadamente 23,5% de proteína, 27,3% de carbohidratos y 34,3% de grasa. El HFD proporcionó el 18,4% de las calorías totales de las proteínas, el 21,3% de los carbohidratos y el 60,3% de las grasas y 5,1 kcal/gramo. La dieta isocalórica constaba, en peso, de aproximadamente 18,6% de proteínas, 62,6% de carbohidratos y 4,2% de grasas. La dieta isocalórica proporcionó el 20,5% del total de calorías de proteínas, el 69,1% de carbohidratos y el 10,4% de grasas y 3,6 kcal/gramo.

Un grupo de 10 ratones (grupo de control de HFD) se alimentó con HFD durante 17 semanas y se le administró 0,1 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) por inyección intraperitoneal (i.p.) cinco veces por semana.

5 El segundo grupo de 10 ratones (grupo HFD-mAb) se alimentó con HFD durante 17 semanas y se administró 10g10 GIP mAb en PBS cinco veces por semana. De lunes a jueves, se administró por inyección i.p. una solución de 0,1 ml que consistía en 0,2 mg/ml de mAb en PBS. Cada viernes, una solución de 0,1 ml que constaba de 0,4 mg/ml de mAb en PBS fue administrada por inyección i.p. Esto dio como resultado la administración de 10 mg/kg de peso corporal del mAb GIP en cuatro días de la semana y 20 mg/kg de peso corporal del mAb GIP en un día de la semana, para cada semana del estudio. Este régimen de dosificación se continuó durante el transcurso del estudio.

10 El tercer grupo de 10 ratones (grupo iso-dieta) se alimentó con la dieta isocalórica durante 17 semanas. No se administraron inyecciones a este grupo.

Se midió y registró el peso de cada ratón cada lunes por la noche durante la duración del estudio. Además, la cantidad de alimentos consumidos por cada grupo también se midió y registró a lo largo del curso del estudio.

### Resultados

#### **El grupo de control HFD ganó peso a casi el doble de la velocidad del grupo HFD-mAb o el grupo de iso-dieta.**

15 El peso corporal total frente al tiempo se ilustra en la FIG. 1A. La ganancia de peso porcentual para cada semana se ilustra en la FIG. 1B. Después de una semana con las dietas especiales, ambos grupos de dieta alta en grasas (HFD) (con y sin mAb GIP) ganaron aproximadamente el 10% de su peso corporal. Las ganancias de peso de ambos grupos HFD se mantuvieron aproximadamente iguales hasta la semana 4, cuando el grupo HFD-mAb comenzó a disminuir su ganancia de peso, mientras que los pesos del grupo de control HFD aumentaron constantemente. La diferencia en el aumento de peso se volvió muy significativa ( $p < 0,001$ ) en la semana 7. El grupo de iso-dieta ganó peso a un ritmo más lento durante la duración del estudio. El grupo de HFD-mAb y el grupo de iso-dieta tuvieron aproximadamente la misma cantidad de aumento de peso después de 17 semanas. La administración del antagonista de mAb de GIP tuvo un efecto claro sobre la ganancia de peso de los ratones.

20 En base a la FIG. 1B, parece que los efectos de GIP mAb no fueron inmediatos, sino que requirieron una dosificación constante a lo largo del tiempo. En las semanas 1-4 del experimento, ambos grupos de ratones alimentados con HFD experimentaron un aumento de peso casi idéntico. Solo a partir de la semana 5, la ganancia de peso del grupo de HFD-mAb comenzó a aumentar a un ritmo más lento en comparación con el grupo de control de HFD.

### MRI

#### Materiales y procedimientos

30 Después de 17 semanas en las dietas especiales, seis ratones fueron seleccionados al azar de entre el grupo de control de HFD y seis ratones del grupo HFD-mAb para formación de imágenes por resonancia magnética (IRM). Todos los ratones fueron anestesiados antes de la obtención de imágenes en el Imaging Research Core Facility en la Case Western Reserve University.

35 Se realizó un eco asimétrico 2D ponderado en T1, secuencia de adquisición rápida con mejora de la relajación (aRARE) en un escáner de resonancia magnética de animales pequeños Bruker Biospec 7T (Bruker Biospin, Billerica, MA) (TR = 1087 ms, TE = 9,1 ms, FOV = 100 x 50 mm, matriz de 512 x 256, 4 promedios, longitud del tren de eco = 4, espesor de corte = 1 mm). La secuencia aRARE proporciona un retardo de eco seleccionable por el usuario para lograr cambios radianes de  $\pi/6$ ,  $\pi/6$  y  $\pi/2$  entre grasa y agua (cambios de eco de 79, 396 y 714  $\mu$ s a 7T).

40 Las imágenes de RM obtenidas a partir de la adquisición arare se utilizaron para generar imágenes de grasa y agua separadas por una técnica de reconstrucción de la imagen IDEAL modificada para 7T y se dejan para la determinación de la biodistribución de lípidos en los ratones. En este sentido, la obesidad, el síndrome metabólico y la NAFLD no son solo una consecuencia del peso corporal total, sino que dependen de dónde se almacena el exceso de grasa.

### Resultados

45 La FIG. 3 muestra imágenes de resonancia magnética representativas de los ratones de control HFD (izquierda) y los ratones HFD-mAb (derecha). Las imágenes representan una vista lateral del ratón con la parte anterior de los ratones en la parte superior y la parte posterior en la parte inferior de la imagen. Las áreas blancas o brillantes representan áreas con alto contenido de grasa. Los ratones de control HFD tenían mucha más grasa en comparación con el HFD-mAb.

50 La FIG. 4 muestra la fracción de grasa hepática derivada de la resonancia magnética de fracción de grasa compensada por relajación (RCFF). El grupo de control HFD acumuló el doble de volumen de grasa en el hígado en comparación con los ratones del grupo HFD-mAb.

La FIG. 5 muestra la fracción de grasa omental derivada de la resonancia magnética de fracción de grasa compensada por relajación (RCFF). El grupo de control HFD acumuló casi 3,5 veces más volumen de grasa omental que los ratones del grupo HFD-mAb.

5 La FIG. 6 muestra la fracción de grasa subcutánea derivada de la resonancia magnética de fracción de grasa compensada por relajación (RCFF). Los animales de control HFD acumularon aproximadamente 2 veces más volumen de grasa subcutánea que los ratones del grupo HFD-mAb.

La FIG. 7 muestra fotografías representativas de cortes transversales de tejido teñido de hígado tomadas de ratones sacrificados. Los hígados se retiraron y se fijaron en formalina. A continuación, el tejido fijado se seccionó y se tiñó con Oil Red O, un colorante diazo lisocromo utilizado para teñir triglicéridos y lípidos neutros. El hígado de control HFD está a la izquierda, y el hígado HFD-mAb está a la derecha. Hay muchas más gotas de grasa teñidas de rojo (oscuras) en los hígados del hígado de control de HFD que en el hígado de HFD-mAb. Además, el tamaño de las gotas de grasa es mayor en el hígado de control HFD que en el hígado HFD-mAb. Hay muchas más gotitas de grasa teñidas de rojo (oscuro) en los hígados en el hígado de control HFD que en el hígado HFD-mAb. Además, el tamaño de las gotitas de grasa es mayor en el hígado de control HFD que en el hígado HFD-mAb. Esto ilustra la reducción de la grasa que se acumula en el hígado cuando se administra el mAb GIP. Estos resultados concuerdan con el volumen de la fracción grasa del hígado de la FIG. 4.

La FIG. 8 es un conjunto de dos fotografías que comparan la grasa omental encontrada en un ratón de control HFD (izquierda) con la de un ratón HFD-mAb (derecha). La grasa es blanca y se ve mucha más grasa en el ratón de control HFD.

20 En conjunto, los datos mostraron que la administración del antagonista de anticuerpo monoclonal que se une a GIP redujo significativamente la cantidad de grasa almacenada por los ratones alimentados con una dieta alta en grasas. Esto incluía la grasa almacenada en el hígado, el epiplón y debajo de la piel.

### **Pruebas de tolerancia a la glucosa**

#### **Materiales y procedimientos**

25 Después de 17 semanas en las dietas especiales, seis ratones de cada grupo de dieta fueron seleccionados al azar para pruebas intraperitoneales de tolerancia a la glucosa (IPGTTs). Todos los animales se mantuvieron en ayunas inicialmente durante seis horas antes de que se recogieran aproximadamente 2 µl de sangre de la vena de la cola de cada animal. Estas primeras muestras representaron niveles de glucosa en sangre de referencia o tiempo cero en la curva IPGTT. La glucosa en sangre se midió usando un glucómetro Truetest™ (NIPRO Diagnostics, Fort Lauderdale, FL).

Cada ratón se administra a continuación aproximadamente 2 miligramos de glucosa por kg de peso corporal por inyección intraperitoneal. La glucosa se administró como una solución al 20% en agua. Después de la administración, se recogieron aproximadamente 2 µl de sangre de la vena de la cola de cada ratón a los 10, 30, 60 y 120 minutos. Se midieron y registraron los niveles de concentración de glucosa en sangre.

#### **Resultados**

Los resultados se muestran en la FIG. 2. El nivel de glucosa en suero en los ratones de control HFD se elevó a una concentración mucho mayor en comparación con los ratones HFD-mAb y los ratones Iso-diet. Además, el nivel de glucosa en suero en los ratones HFD-mAb y los ratones Iso-diet comenzó a disminuir mucho antes. Esto es coherente con el desarrollo de intolerancia a la glucosa en los ratones de control HFD, pero no en los ratones HFD-mAb ni en los ratones Iso-diet.

### **Mediciones de suero en sangre**

#### **Materiales y procedimientos**

Después de 17 semanas en las dietas especiales, se sacrificaron los ratones en los tres grupos. Se recogió sangre completa, se preparó suero y se midieron los niveles de muchos componentes diferentes.

#### **Resultados**

La FIG. 9 muestra los niveles de triglicéridos (TG) medidos en el suero de cada grupo de ratones. Los niveles de TG en ratones de control HFD fueron 1,44 veces mayores que los niveles de TG en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de TG están asociados con la obesidad y el síndrome metabólico.

La FIG. 10 muestra los niveles medios de colesterol total (TC) medidos en el suero de cada grupo de ratones. Los niveles de TC en ratones de control HFD fueron 1,55 veces mayores que los niveles de TC en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de CT están asociados con la obesidad y el síndrome metabólico.

La FIG. 11 muestra la relación media de lipoproteína de alta densidad (HDL) a colesterol total (TC) medida en el suero de cada grupo de ratones. La relación de HDL a colesterol total en ratones de control HFD fue un 20% más baja que la relación de HDL a niveles de colesterol total en ratones HFD-mAb. Las proporciones más bajas de HDL a los niveles de colesterol total se asocian con la obesidad y el síndrome metabólico.

5 La FIG. 12 muestra los niveles medios de lipoproteínas de baja densidad (LDL) medidos en el suero de cada grupo de ratones. Los niveles de LDL en ratones de control HFD fueron 1,95 veces mayores que los niveles de LDL en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de LDL (el colesterol "malo") están asociados con la obesidad y el síndrome metabólico.

10 La FIG. 13 muestra los niveles medios de insulina medidos en el suero de cada grupo de ratones. Los niveles de insulina en ratones de control HFD fueron 2,6 veces mayores que los niveles de insulina en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de insulina están asociados con la obesidad, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico.

La FIG. 14 muestra los niveles medios de adiponectina medidos en el suero de cada grupo de ratones. Los niveles de adiponectina en ratones de control HFD fueron 1,35 veces mayores que los niveles de adiponectina en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de adiponectina están asociados con un aumento de la grasa corporal total.

15 La FIG. 15 muestra los niveles medios de leptina medidos en el suero de cada grupo de ratones. Los niveles de leptina en ratones de control HFD fueron 5,73 veces mayores que los niveles de leptina en ratones HFD-mAb. Los niveles más altos de leptina están asociados con un aumento de la grasa corporal total.

La FIG. 16 muestra los niveles medios de glucagón medidos en el suero de cada grupo de ratones. No hubo diferencias significativas en los niveles de glucagón sérico entre los grupos.

20 La FIG. 17 muestra los niveles medios de péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) medidos en el suero de cada grupo de ratones. No hubo diferencias significativas en los niveles de GLP-1 sérico entre los grupos.

En conjunto, estos datos mostraron que la administración del antagonista de anticuerpo monoclonal que se une a GIP mejoraron significativamente todos los marcadores asociados con la obesidad y el síndrome metabólico. Estos datos sugieren que la administración del mAb puede reducir las complicaciones asociadas con la obesidad y el síndrome metabólico. El hecho de que no hubo cambios en los niveles séricos de glucagón o GLP-1 indicó que el mAb era específico de GIP, y sugiere que debería haber pocos (si los hay) efectos secundarios de la inhibición del glucagón o GLP-1, que comparten algunas vías biológicas comunes con GIP pero que también tienen otros efectos biológicos que no comparten con GIP.

## **DISCUSIÓN**

30 Los resultados de estos experimentos mostraron que los anticuerpos monoclonales por vía intraperitoneal entregados que se unen a GIP pueden reducir significativamente acumulación adiposa en los tejidos y la acumulación de grasa en el hígado. Los ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) mientras recibían el mAb GIP mostraron un contenido de grasa notablemente menor que los ratones de control HFD. Se observó una reducción del contenido de grasa en el hígado, el epiplón y la fracción de grasa subcutánea. Esto indica que cantidades moderadas del antagonista de mAb de GIP pueden reducir o prevenir la acumulación de grasa en el tejido inhibiendo GIP. La inhibición de GIP reduce la captación intestinal de glucosa, reduce la captación de péptidos intestinales, reduce la secreción de insulina posprandial, reduce la captación de glucosa en los adipocitos, aumenta la lipólisis e inhibe la captación de nutrientes. El cambio en los niveles séricos de los marcadores asociados con la obesidad y el síndrome metabólico también indica que el antagonista del mAb GIP puede ser útil contra las consecuencias para la salud de esas condiciones.

## **EJEMPLO 3: MODIFICACIÓN DE ANTICUERPOS**

La región variable de cadena ligera del mAb 10g10 se modificó adicionalmente sustituyendo aminoácidos específicos conservados en anticuerpos de ratón con aminoácidos específicos conservados en anticuerpos humanos. Esto se hizo para "humanizar" la región variable de la cadena ligera para hacerla más similar a una región variable humana y aumentar la posibilidad de que el sistema inmunológico humano no reconociera el mAb "humanizado" como una sustancia extraña. Para humanizar la región variable de la cadena ligera, se sintetizaron químicamente oligonucleótidos. Las secuencias de los oligonucleótidos eran similares a la secuencia de la región variable de la cadena ligera del mAb 10g10, excepto que se cambiaron las bases específicas. Se predijo que los pares de bases cambiados cambiarían aminoácidos específicos de la región variable de la cadena ligera cuando la secuencia se tradujo en proteína. Se utilizó una reacción de síntesis de ADN para producir ADN de doble hebra (ds). Se sintetizaron tres ds-oligonucleótidos diferentes y luego se digirieron con las endonucleasas de restricción HindIII y NotI, antes de ligarse en un vector de expresión de mamífero. El vector de expresión de mamífero contenía una secuencia señal y la región constante de una cadena ligera humana. Los ds-oligonucleótidos se ligaron al vector de tal manera que la región variable y la región constante, cuando se expresan como ARNm y luego se traducen en proteína, generarían una cadena ligera de anticuerpo.

55 Las tres cadenas ligeras resultantes humanizadas se denominan LC1, LC2 y LC3 en el presente documento. La secuencia de aminoácidos de LC1 es SEQ ID NO: 17, y la secuencia de ADNc para LC1 es SEQ ID NO: 36. La

secuencia de aminoácidos de LC2 es la SEQ ID NO: 18, y la secuencia de ADNc para LC1 es SEQ ID NO: 37. La secuencia de aminoácidos de LC3 es la SEQ ID NO: 19, y la secuencia de ADNc para LC1 es SEQ ID NO: 38.

La región variable de la cadena pesada del mAb 10g10 también se modificó adicionalmente de la misma manera. De nuevo, se predijo que los pares de bases cambiados cambiarían aminoácidos específicos de la región variable de la cadena pesada cuando la secuencia se tradujo en proteína. Se sintetizaron tres ds-oligonucleótidos diferentes para la cadena y luego se ligaron en un vector de expresión de mamífero. El vector de expresión de mamífero contenía una secuencia señal y la región constante de una cadena pesada humana. Los ds-oligonucleótidos se ligaron al vector de tal manera que la región variable y la región constante, cuando se expresan como ARNm y luego se traducen en proteína, generarían una cadena pesada de anticuerpo.

Las tres cadenas pesadas humanizadas resultantes se denominan en el presente documento HC1, HC2 y HC3. La secuencia de aminoácidos de HC1 es la SEQ ID NO: 28 y la secuencia de ADNc para HC1 es SEQ ID NO: 40. La secuencia de aminoácidos de HC2 es la SEQ ID NO: 29 y la secuencia de ADNc para HC1 es SEQ ID NO: 41. La secuencia de aminoácidos de HC3 es la SEQ ID NO: 30 y la secuencia de ADNc para HC1 es SEQ ID NO: 42.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) que contienen las regiones variables de cadena ligera y regiones variables de cadena pesada humanizadas fueron producidos en células CHO. Un vector de mamífero que posee la secuencia codificante de una cadena ligera de anticuerpo se cotransfectó con un vector de mamífero que posee la secuencia de codificación de una cadena pesada de anticuerpo. Se transfectaron un total de 9 combinaciones únicas en células CHO: LC1/HC1, LC1/HC2, LC1/HC3, LC2/HC1, LC2/HC2, LC2/HC3, LC3/HC1, LC3/HC2 y LC3/HC3. Los anticuerpos monoclonales derivados de estas combinaciones se compararon con el mAb 10g10.

Se hicieron crecer en cultivo células CHO cotransfectadas con los vectores de expresión de mamíferos y se recogió el sobrenadante. Se evaluó en el sobrenadante la presencia de mAb de unión a GIP mediante ELISA de unión directa. Se fijó GIP humano al fondo de los pocillos en placas de 96 pocillos. Se agregaron diluciones en serie del sobrenadante a diferentes pocillos de la placa de 96 pocillos. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron dos veces con PBS antes de añadir a cada pocillo un anticuerpo secundario que se une específicamente a la IgG humana. El anticuerpo que se une específicamente a la IgG humana se conjugó con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de la incubación durante una hora, los pocillos se lavaron con PBS antes de añadir el sustrato de HRP. Si había HRP en un pocillo, el sustrato se convertía en un compuesto coloreado. La cantidad de intensidad de color se leyó usando un espectrofotómetro. La cantidad de color producida fue proporcional a la cantidad de conjugado de anticuerpo HRP que quedaba en cada pocillo. La cantidad de color producida también fue proporcional a la cantidad de mAb unido a hGIP en cada pocillo.

Los resultados de esta evaluación indicaban que las diversas combinaciones del GIP humano unido a vectores de cadena ligera/cadena pesada en el orden siguiente (afinidad de unión más alta a afinidad de unión más baja): LC2/HC1, LC2/HC2, LC3/HC2, LC1/HC2, LC2/HC3, LC3/HC1, LC1/HC1, 10g10, LC1/HC3 y LC3/HC3.

Los anticuerpos producidos en 100 ml de cultivos en suspensión de células CHO co-transfectadas con la combinación de vectores de expresión de LC2/HC1, LC2/HC2, y LC2/HC3 fueron purificados mediante el uso de agarosa de proteína A.

A continuación, la capacidad de estos tres mAbs purificados para neutralizar hGIP y evitar la interacción ligando-receptor, el receptor de activación y la señalización dependiente del receptor se ensayó mediante el uso de un sistema de cultivo celular. Este sistema utilizó células informadoras (células LGIPR3a), que poseen el gen lacZ bajo el control de un promotor que responde al monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y expresa el GIPR de rata en la superficie celular. La adición de GIP a estas células conduce a la activación de GIPR, la inducción de una cascada de señalización que conduce a la acumulación de cAMP, la inducción del gen lacZ y la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa. Después de la adición de una muestra de prueba e incubación durante 4 horas, se usó un ensayo colorimétrico para medir el contenido de  $\beta$ -galactosidasa en lisados celulares. El grado de cambio de color fue proporcional al nivel de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. El nivel de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa dependía de la cantidad de GIP biológicamente activo libre en la muestra de prueba.

Los mAbs se mezclaron con una solución de GIP humano (hGIP) en medio DMEM a concentraciones finales de 25 g/ml para el mAb y 0,1 nM para hGIP. A continuación, se añadieron las mezclas a las células LGIPR3a y se incubaron antes de lavarlas y analizarlas para determinar la  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se muestran en la **FIG. 18**. 10g10 representa el mAb de ratón original. El GIP actuó como control positivo. Fc representa un fragmento de Fc humano purificado, que actuó como control negativo.

Los resultados mostraron que los anticuerpos humanizados neutralizaron hGIP *in vitro* similarmente al mAb de ratón 10g10. El anticuerpo humanizado LC2/HC2 fue el más eficaz de los tres mAb humanizados. También fue más eficaz que el mAb de ratón original. Aquí se desea una actividad relativa más baja, y la LC2/HC2 tenía una actividad relativa de 0,0035, frente a 0,0055 para el mAb de ratón 10g10.

También se determinaron las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de las seis cadenas ligeras humanizadas (LC1, LC2, LC3) y cadenas pesadas (HC1, HC2, HC3). LC1 tenía las CDR de SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 23, y SEQ ID NO: 22. LC2 tenía las CDR de SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, y SEQ ID

## ES 2 984 113 T3

NO: 22. LC3 tenía las CDR de SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 24, y SEQ ID NO: 22. HC1, HC2 y HC3 tenían todas las mismas CDR, que eran SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 32, y SEQ ID NO: 33.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de la obesidad, el síndrome de Cushing inducido por la alimentación, el síndrome metabólico, la acumulación de tejido graso en el hígado, la acumulación de tejido graso en el epiplón o la acumulación de tejido graso subcutáneo, que comprende:
  - 5 una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista molecular de polipéptido inhibidor gástrico (GIP), en el que el antagonista molecular del polipéptido inhibidor gástrico (GIP) es un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab o Fab', un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un monoclonal anticuerpo y comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada,
  - 10 en donde el dominio variable de cadena ligera tiene una primera región determinante de complementariedad (CDR) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 24; y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y
  - 15 en donde el dominio variable de cadena pesada tiene una primera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el dominio variable de cadena ligera tiene una primera región determinante de complementariedad (CDR) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; una segunda CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una tercera CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el dominio variable de la cadena pesada tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30.
4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el antagonista molecular se une a una secuencia de aminoácidos de GIP, seleccionándose la secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4.
5. La composición para uso de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1 ó 3, en la que el antagonista es un anticuerpo monoclonal completo que comprende regiones constantes humanas.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la región constante humana es un isotipo IgG1.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que el antagonista tiene un peso molecular de 30 kDa a 500 kDa.
8. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que el antagonista tiene una afinidad de unión para GIP **caracterizada por** una CI<sub>50</sub> de 0,1 nM a 7 nM.
9. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde la composición debe administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que el dominio variable de cadena ligera tiene al menos un 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.
11. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antagonista molecular es un anticuerpo monoclonal completo con un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 18, y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad a SEQ ID NO: 29.
12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el antagonista molecular es un anticuerpo monoclonal completo con un dominio variable de cadena ligera que es SEQ ID NO: 18, y un dominio variable de cadena pesada que es SEQ ID NO: 29.

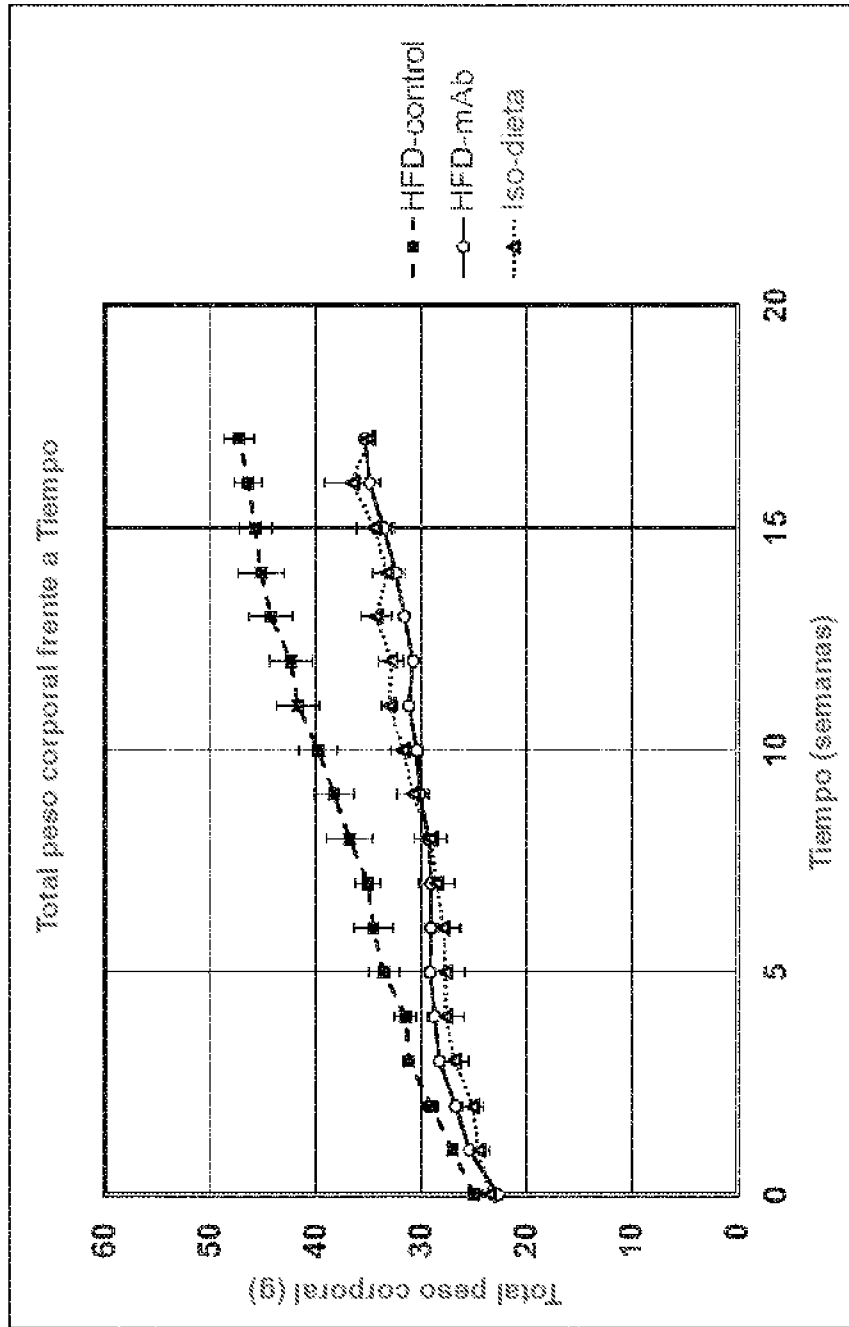


Figura 1A

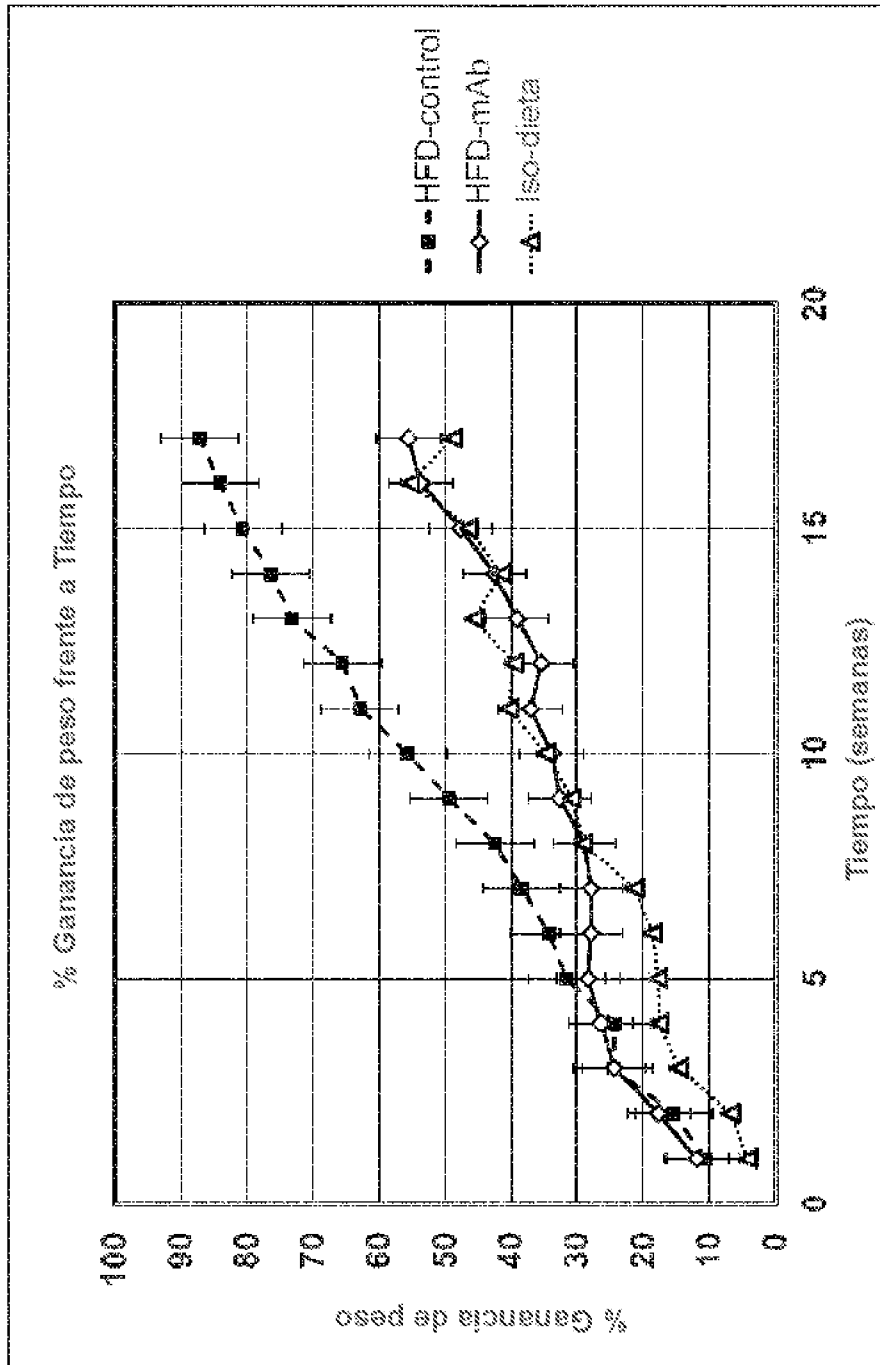


Figura 13

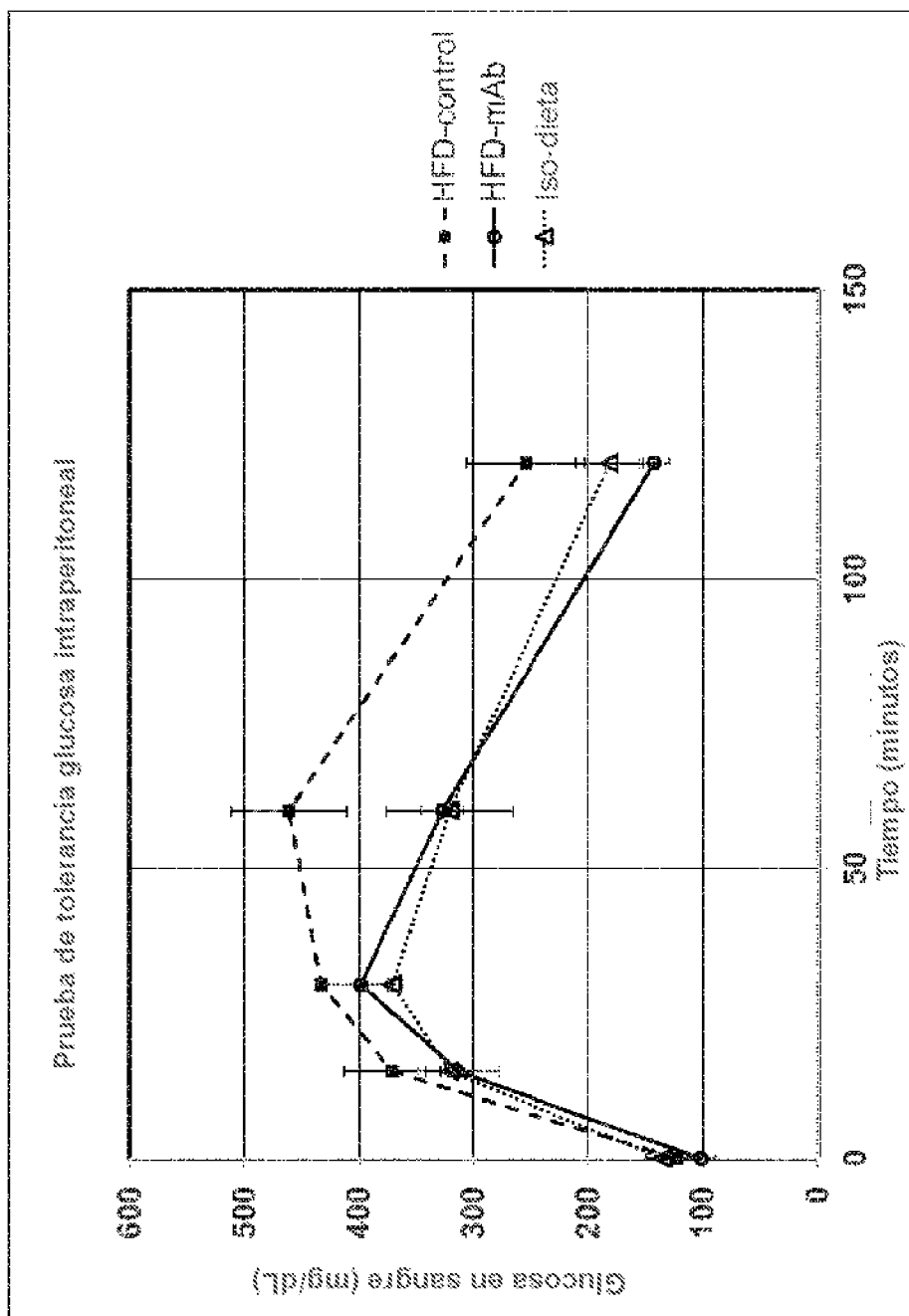
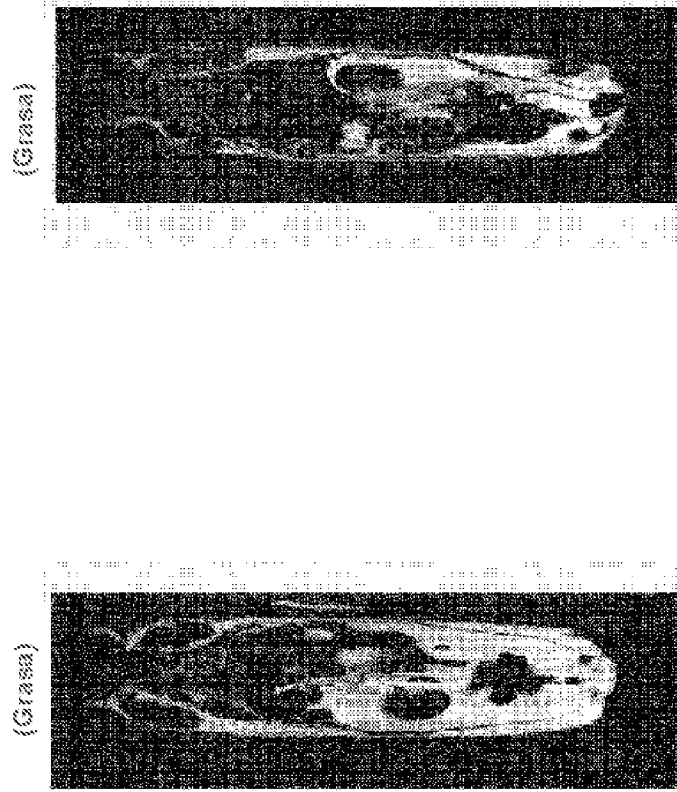


Figura 2

Resonancia magnética de imágenes (RMN)



HFD-mAb

HFD-control

Figura 3

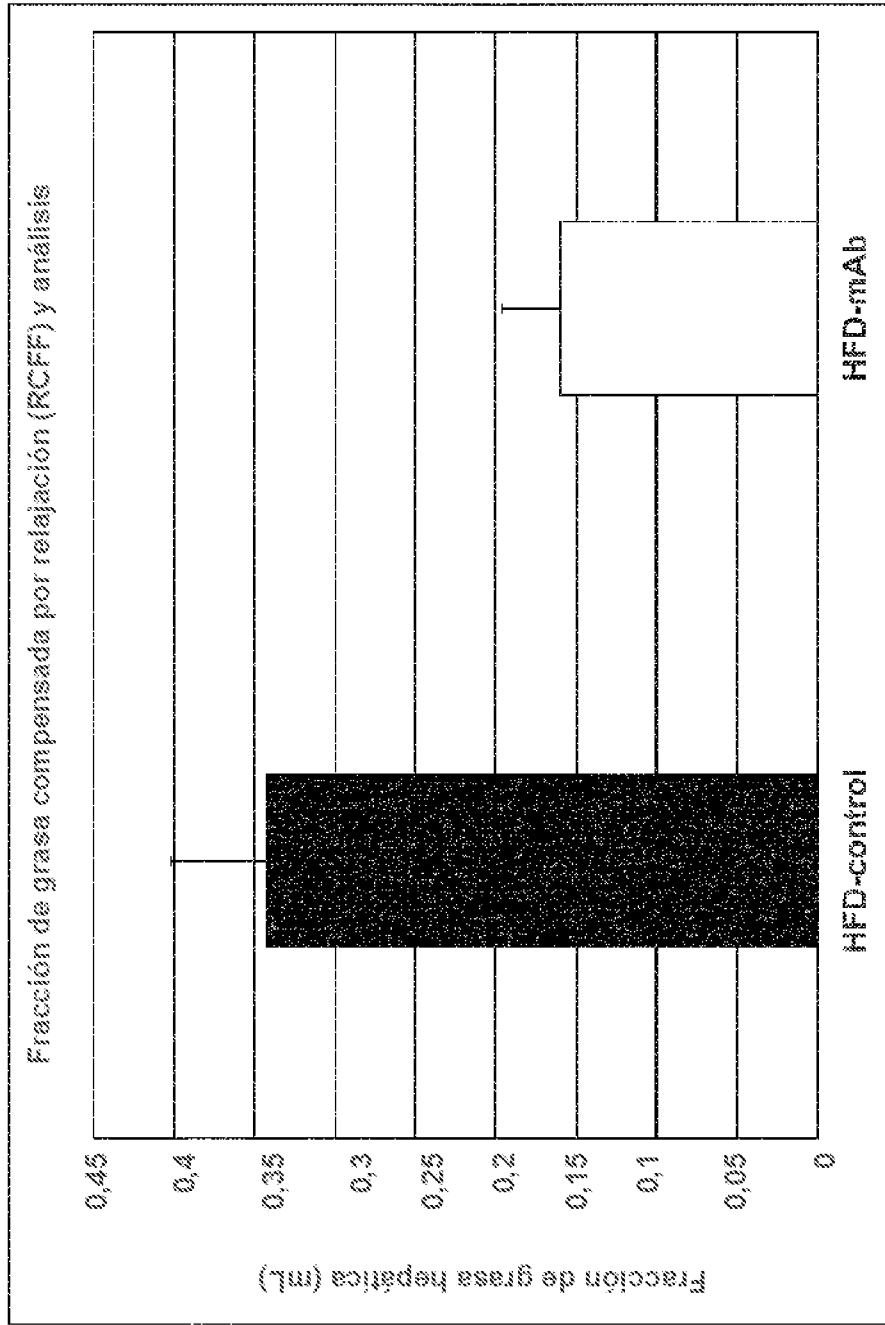


Figura 4

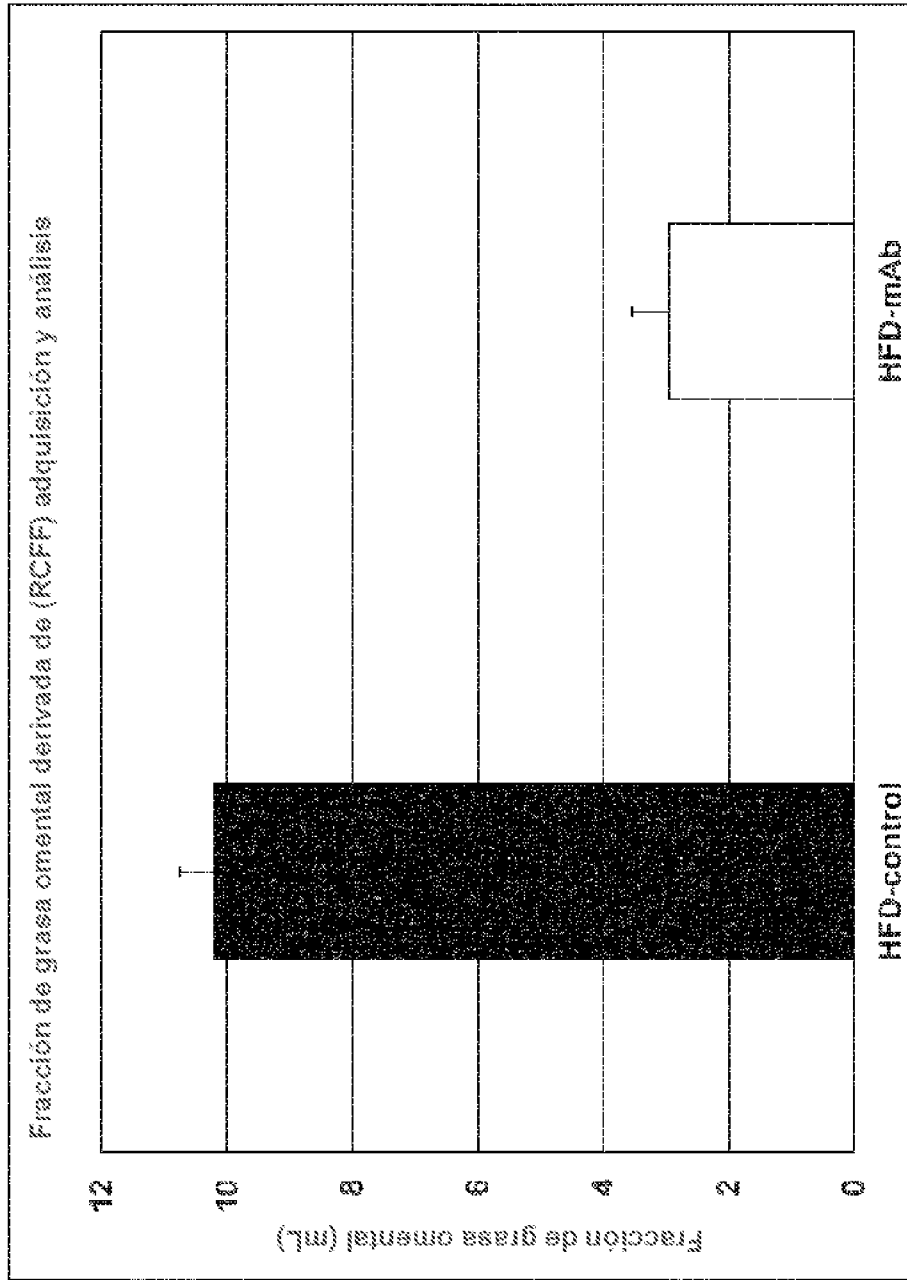


Figura 2

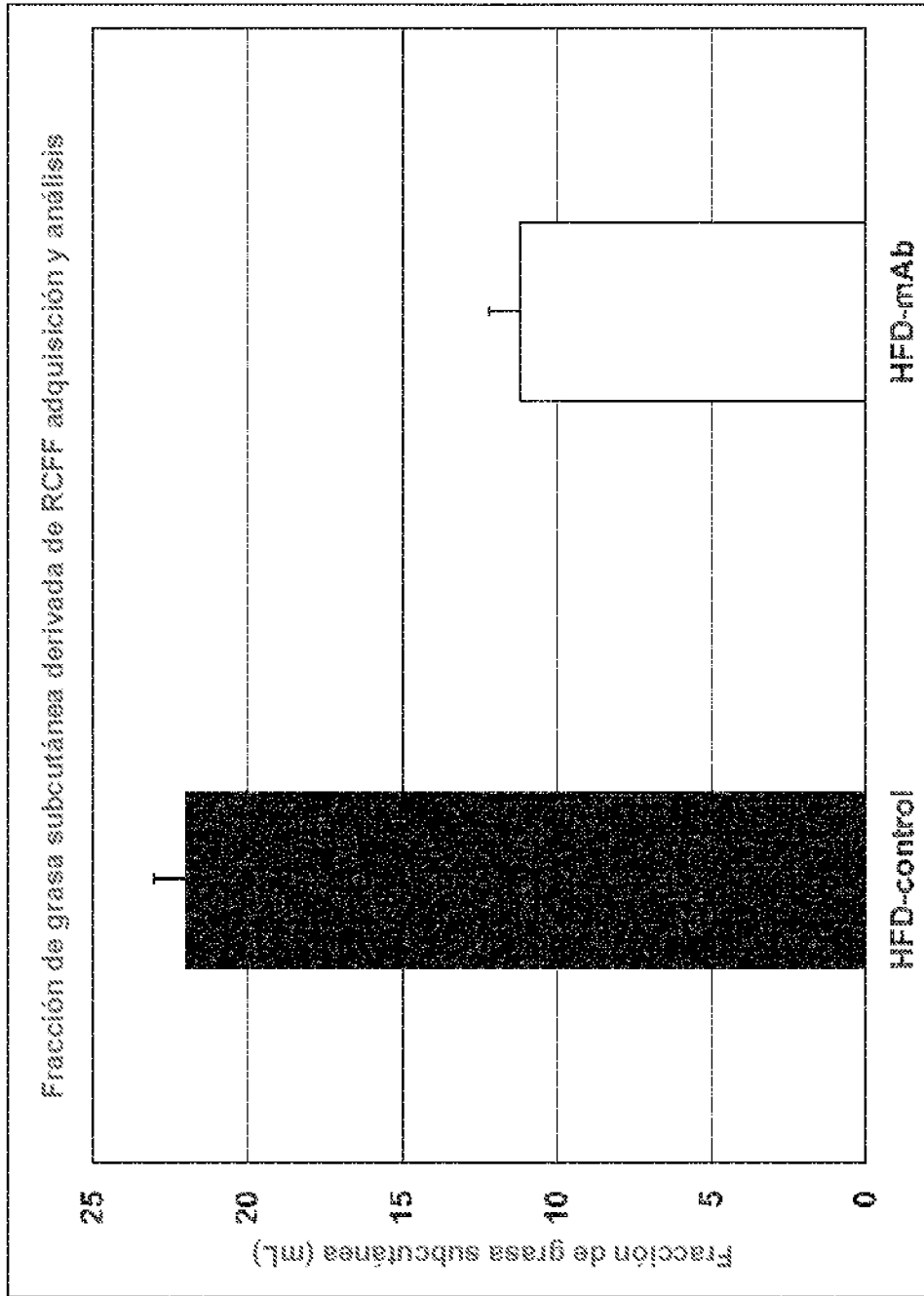


Figura 6

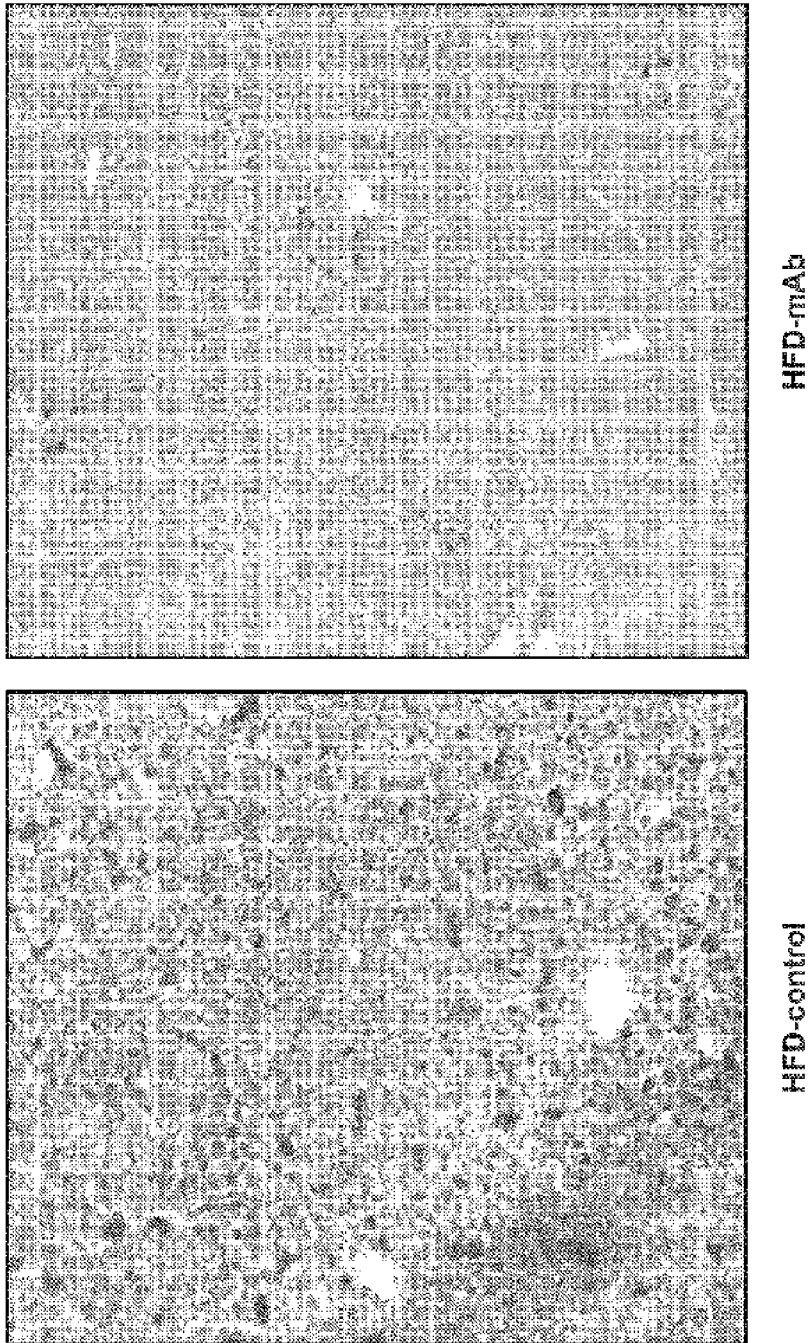
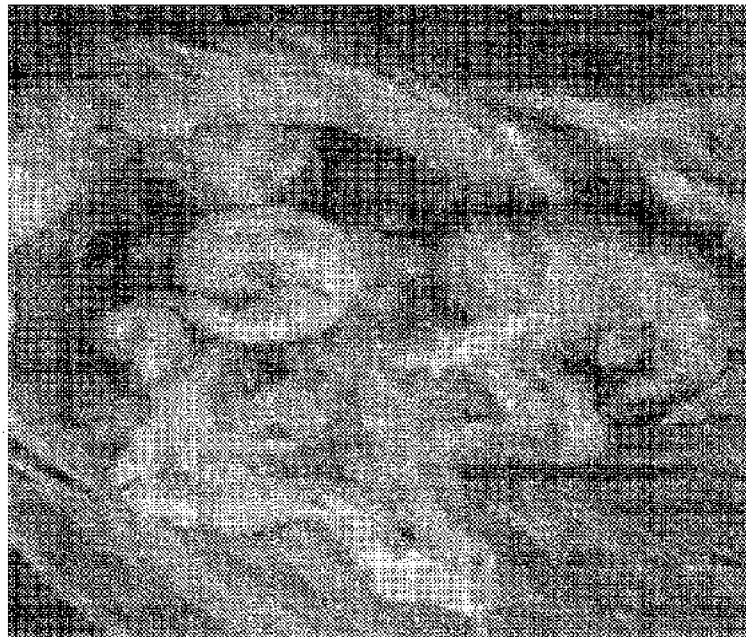


Figura 7



HFD-mAb



HFD-control

Figure 8

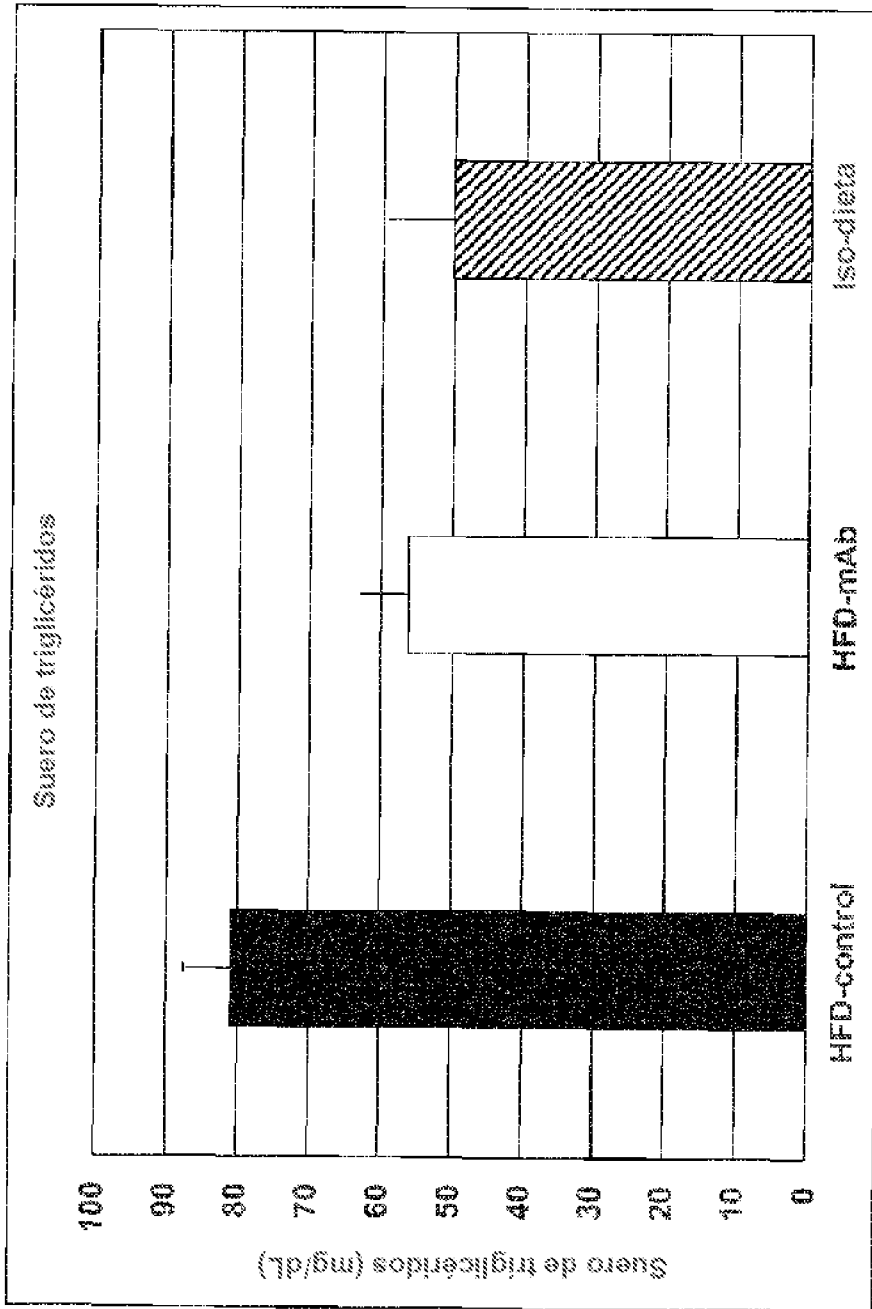


Figura 9

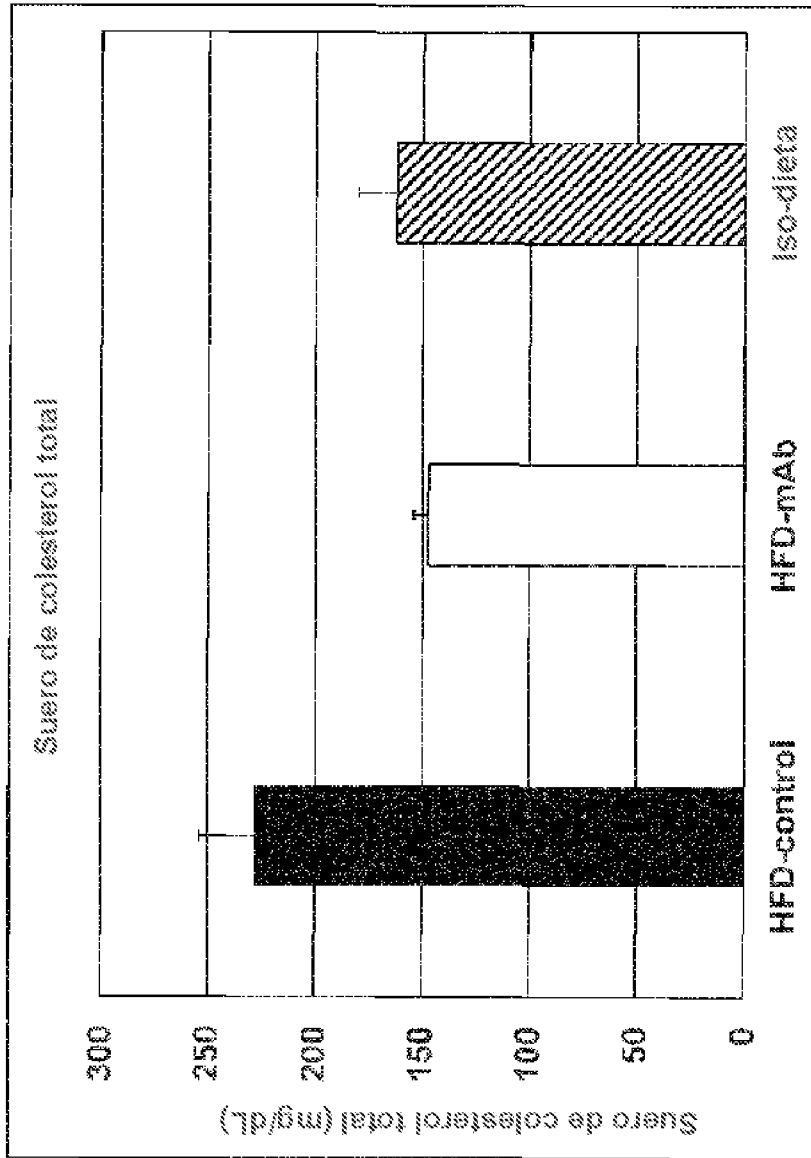


Figura 10

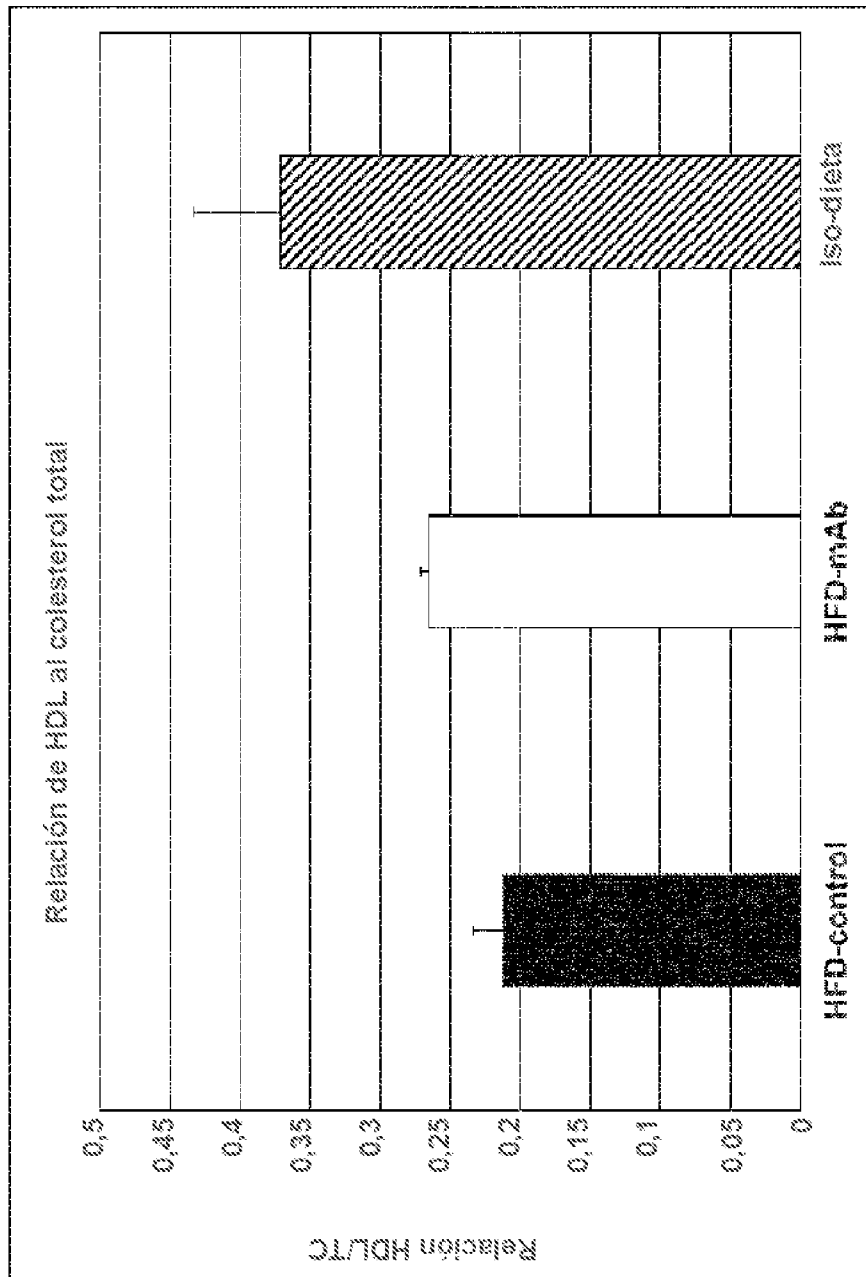


Figura 11

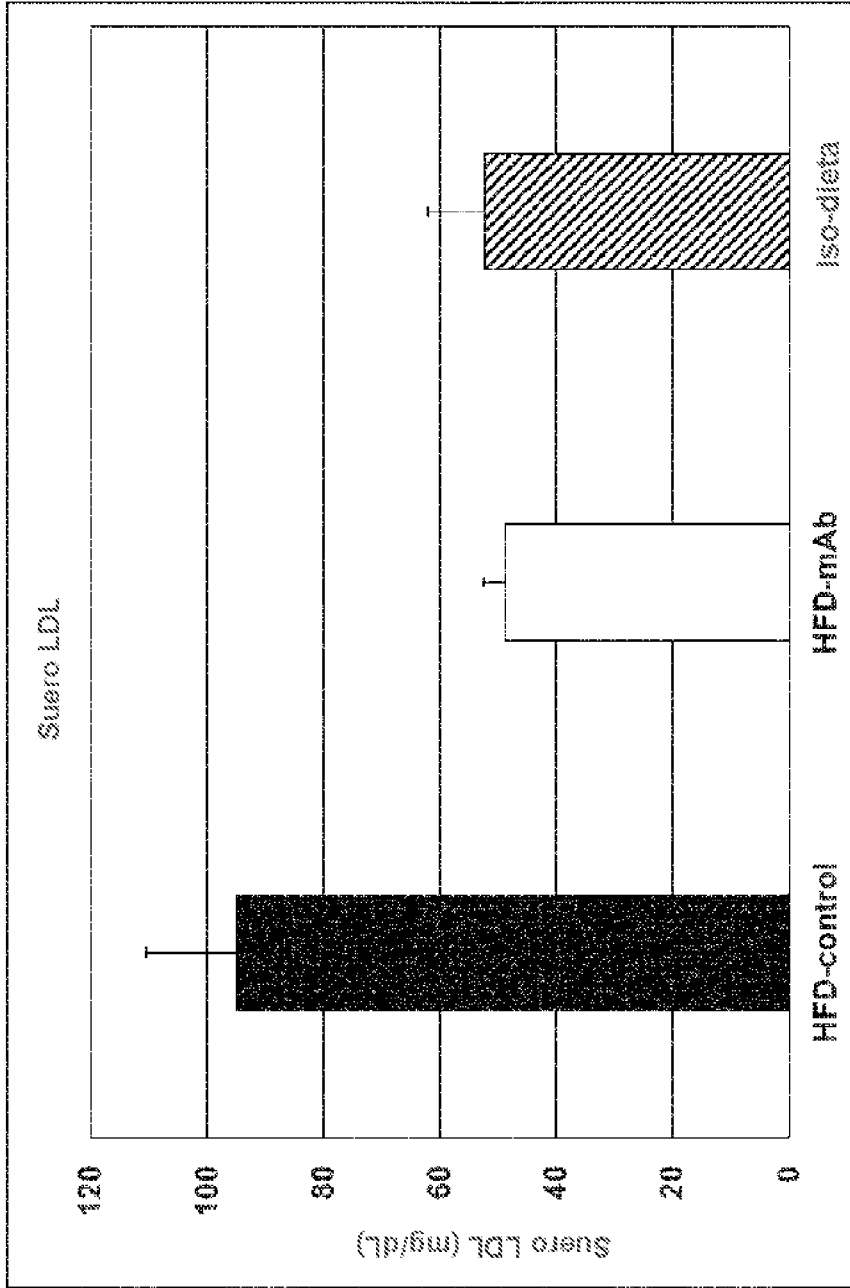


Figura 12

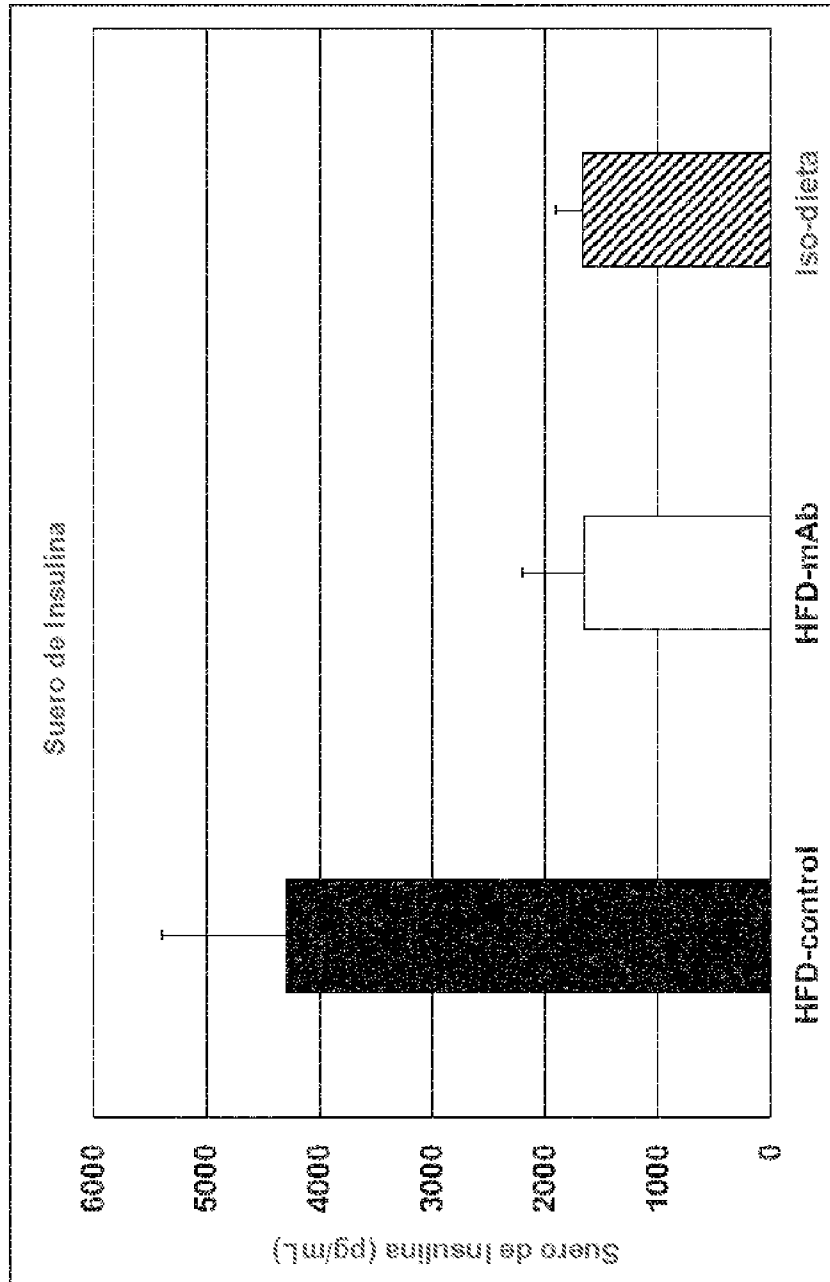


Figura 13

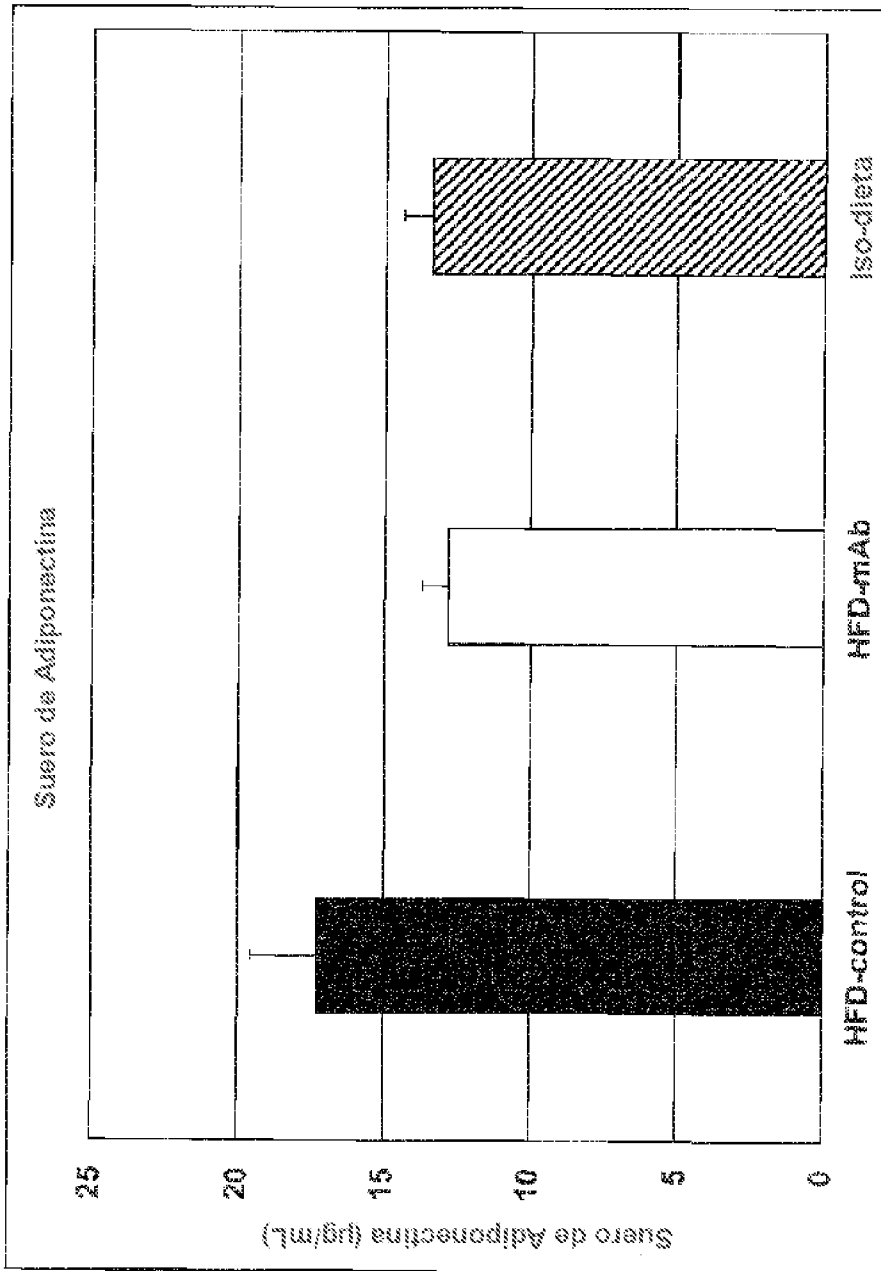


Figura 14

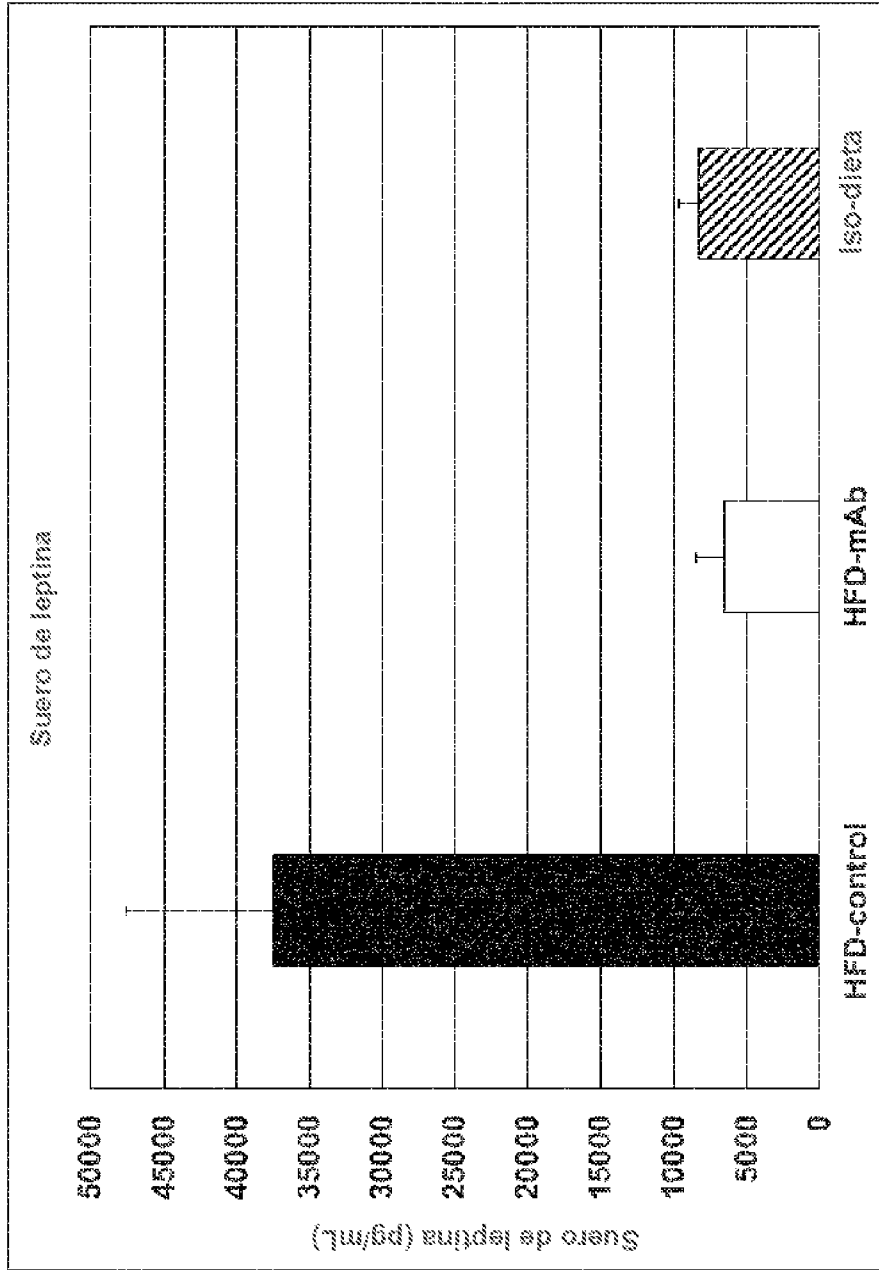


Figura 13

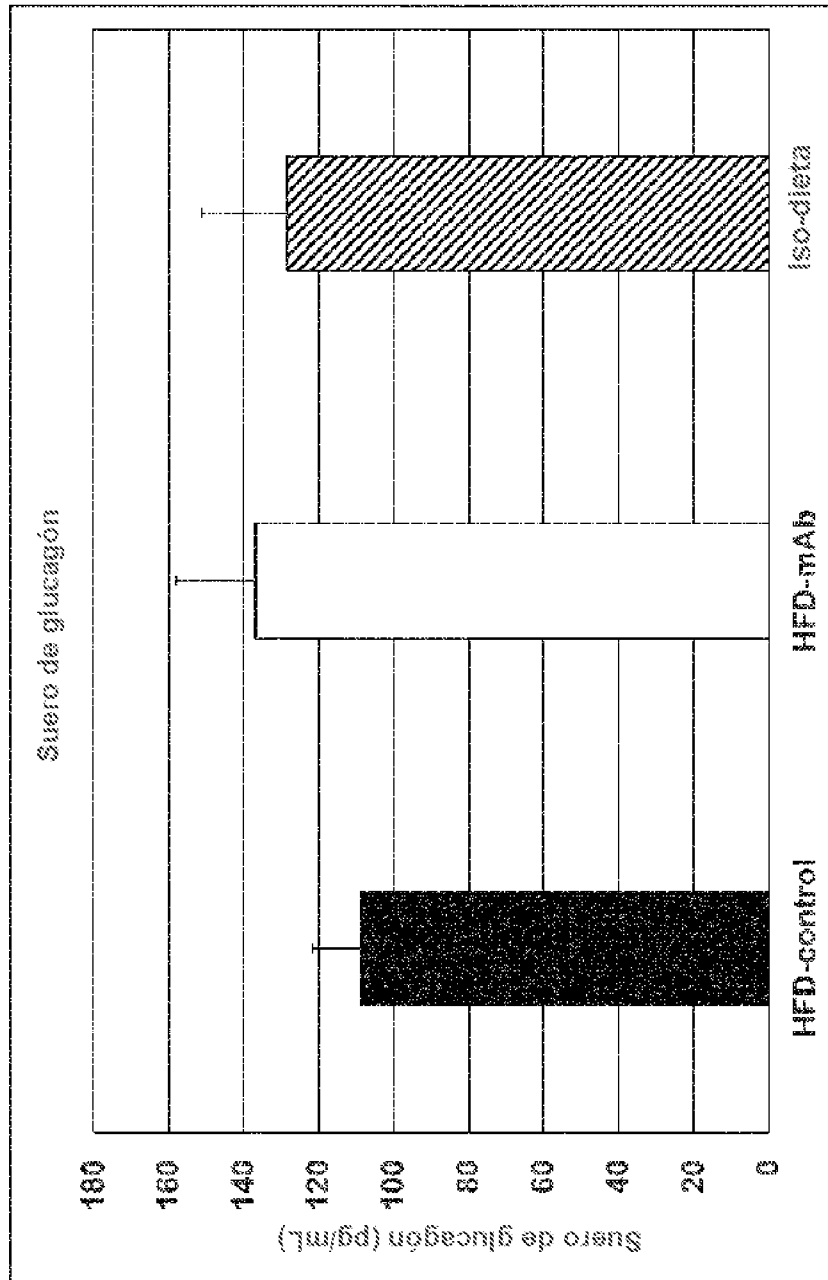


Figura 16

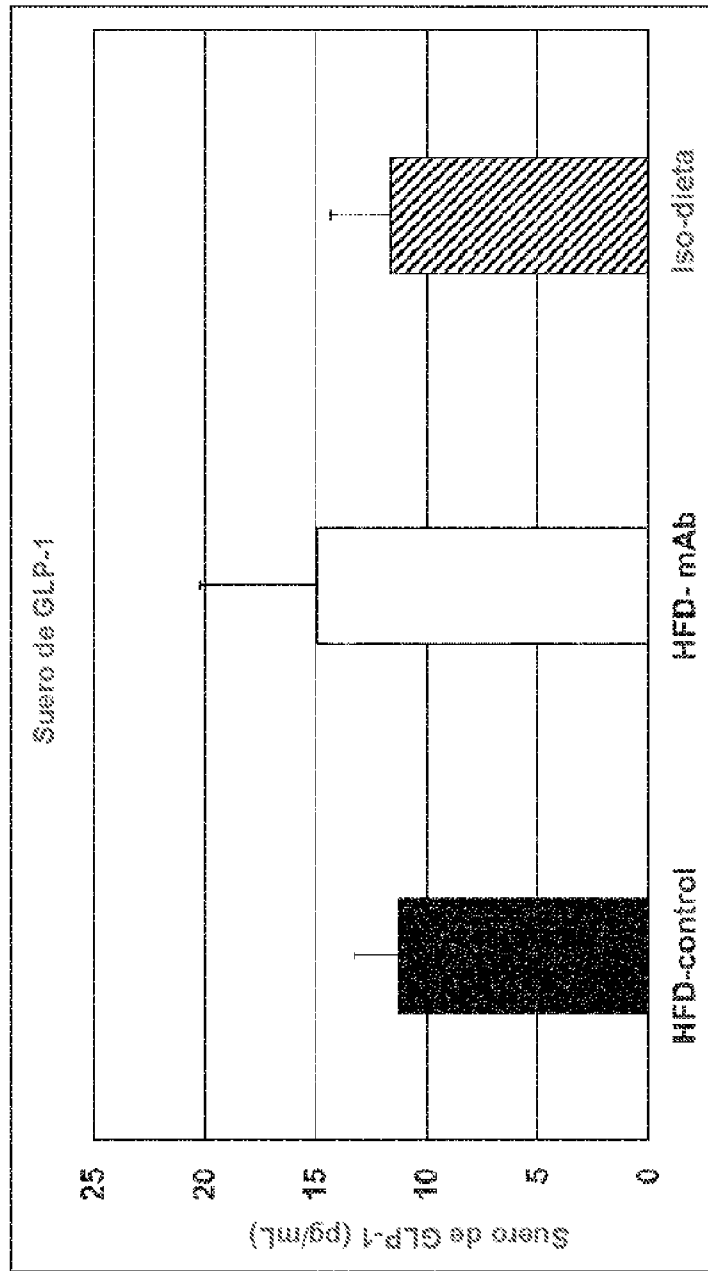


Figura 17

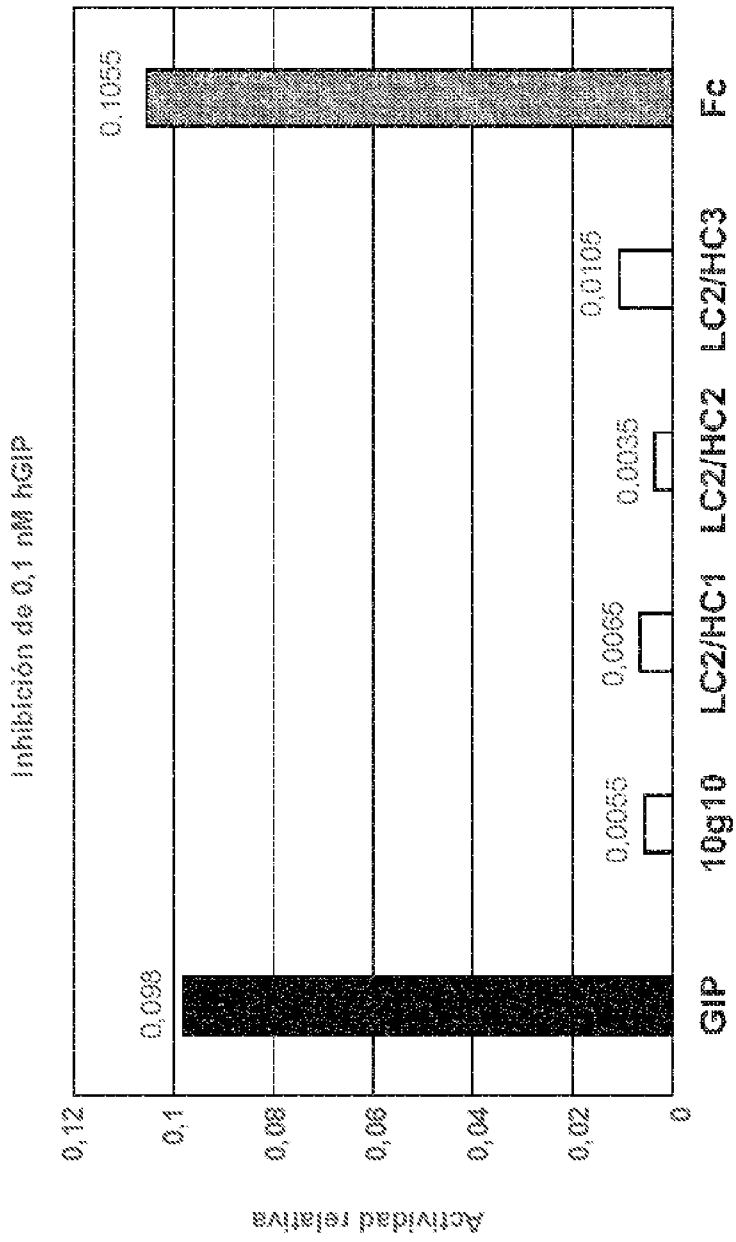


Figura 18