



No. 13-111846- -00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:34:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPUESTOS ANTIDIABÉTICOS.

SOLICITANTE: COVX TECHNOLOGIES IRELAND LIMITED y PFIZER INC.

DIRECCIÓN: Operations Support Group, Ringaskiddy Co. Cork, Irlanda y 235
East 42nd Street, New York 10017. Estados Unidos.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 03 Mayo 2013

P2013/000073



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000073

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: COVX TECHNOLOGIES IRELAND LIMITED y PFIZER INC.

Dirección: Operations Support Group, Ringaskiddy Co. Cork, Irlanda y 235 East 42nd Street, New York 10017. Estados Unidos.

Nacionalidad o Domicilio: Irlanda y Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución Irlanda y Estados Unidos de América.

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2011/054874 Fecha Noviembre 02, 2011

Publicación Internacional No. WO 2012/059873 A2 Fecha Mayo 10, 2012

6

Título (54) COMPUESTOS ANTIDIABÉTICOS

Clasificación Internacional (51) A61K 47/48.

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
US

(32) Fecha
Noviembre 05, 2010

(31) Número de Solicitud
61/410,715

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____

10

ANEXOS

☒ x

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒ x

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. Poderes, si fuere el caso.

☒ x

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(ii) del PCT.

☒ x

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒ x

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒ x

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒ x

Otros. Búsqueda Internacional

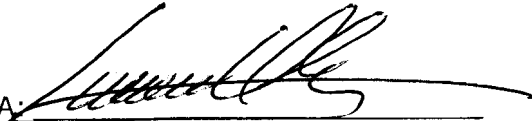
11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 99.782.747 Btá T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2011/054874

Tapan Kanti DAS

Pfizer Global Research and Development,
700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, Missouri, 63017,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

Tamara Shafer HODGE

Pfizer Global Research and Development,
700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, Missouri, 63017,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

Tetsuya ISHINO

Pfizer Global Research and Development,
87 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Japón

LEVIN, Nancy Jane

CovX Research LLC, 9381 Judicial Drive,
Suite 200, San Diego, California, 92121,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Moorthy Sitharamaiah Suriyanarayana PALANKI

CovX Research LLC, 9381 Judicial Drive,
Suite 200, San Diego, California, 92121,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

8

Erin Kristen PARSONS

Pfizer Global Research and Development,
700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, Missouri, 63017,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

VIOLAND, Bernard Norman

Pfizer Global Research and Development,
700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, Missouri, 63017,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0040671

Bogotá D.C., Abril 30 de 2013 - 12:12:26

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532438222	29/04/2013	7.078.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111846- -00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:34:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 30 de 2013 - 12:12:28



No. 13-111846- -00000-0000

Fecha: 2013-05-03 16:34:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita	Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño	
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas	
Completa ☐		Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

SIETE MIL OCHOCIENTOS CINCUENTA Y TRES (7853) - - -

FECHA DE OTORGAMIENTO:

OCHO (08) DE SEPTIEMBRE DE DOS MIL ONCE (2011) - - -

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. -----

SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO.-----

CÓDIGO NOTARIAL 1100100038.-----

FORMULARIO DE CALIFICACIÓN.-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACIÓN DE DOCUMENTOS.-----

PERSONAS QUE INTERVIENEN: CARLOS REINALDO OLARTE, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747 expedida en Bogotá.-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los ocho ----- (08) días del mes de SEPTIEMBRE de dos mil once (2011), ante mí **EDUARDO DURAN GOMEZ**-----

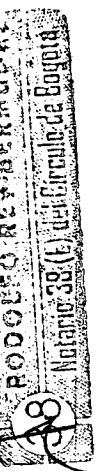
NOTARIO(A) TREINTA Y OCHO (38) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.-----

Compareció: **CARLOS REINALDO OLARTE**, mayor de edad, domiciliado y residente en la ciudad de Bogotá D.C., identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747 expedida en Bogotá, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, quien obra en nombre propio y manifestó:-----

PRIMERO.- Presenta para su Protocolización los siguientes documentos:-----

1. Cinco (05) folios útiles, en los que consta El **Poder General** otorgado por COVX TECHNOLOGIES IRELAND LIMITED. al señor CARLOS R. OLARTE, de fecha 19 de Julio de 2011 ante el Notario Público en Groton, Connecticut, USA, texto en ingles y español y su respectiva Apostilla.-----

SEGUNDO.- Que de conformidad con lo expuesto y atendiendo a las prescripciones del artículo 56, 57 y 58 del Decreto 960 de 1970, los documentos mencionados, contenidos en cinco (05) folios útiles, quedan legalmente protocolizados ante el Notario Treinta y Ocho (38) del Círculo Bogotá, de manera que desde ahora quedan bajo su custodia y guarda para que surtan los efectos legales a que haya lugar y los interesados puedan consultarlos y obtener las copias que de el solicite.-----



-----**HASTA AQUÍ LA MINUTA**-----

SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta escritura de la **obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto**, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto.-----

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. -----

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. -----

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Artículo 35 decreto ley 960 de 1.970).-----

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995, LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los comparecientes bajo la gravedad del juramento manifiestan clara y expresamente que todos los dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en este instrumento fueron adquiridos por medios y actividades lícitas. Así como el dinero con el que se efectúa el pago de los gastos notariales.-----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído el presente instrumento por el otorgante y advertido de la formalidad de Ley, estuvo de acuerdo con él lo aceptó en la forma como está redactado y en testimonio de que le da su asentimiento y aprobación lo firma por ante mí y conmigo el Notario que de todo lo expuesto doy fe lo autorizo.-----

CONSTANCIA: El presente instrumento se extiende en la siguiente hoja de papel Notarial No. 7 700140 110722/ 110739/ - - - - -

- - - - -



FOLIO ANTERIOR

7 700140 110722-----

ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

SIETE MIL OCHOCIENTOS CINCUENTA Y TRES (7853)- - -

FECHA DE OTORGAMIENTO:

OCHO (08) DE SEPTIEMBRE DE DOS MIL ONCE (2011)- - -

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. -----

RETENCIÓN EN LA FUENTE. ARTÍCULO 20 Y 64 LEY 0075 DE 1986.\$ EXENTO -- - --

DERECHOS NOTARIALES.....\$ 44.000- - - - -

SUPERINTENDENCIA.....\$3.700.00.-----

FONDO NACIONAL DEL NOTARIADO.....\$3.700.00.-----

IVA\$ 14.080-- - - - -

DECRETO 1681 DE SEPTIEMBRE 16 DE 1996 Y RESOLUCIÓN 11621 DE
DICIEMBRE 22 DE 2010 Y MODIFICADA POR LA RESOLUCIÓN 11903 DE
DICIEMBRE 30 DE 2010. -----

CARLOS REINALDO OLARTE

C.C.

DIRECCIÓN RESIDENCIA:

DIRECCIÓN OFICINA:

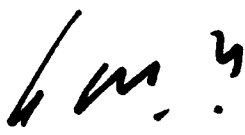
TELÉFONO RESIDENCIA:

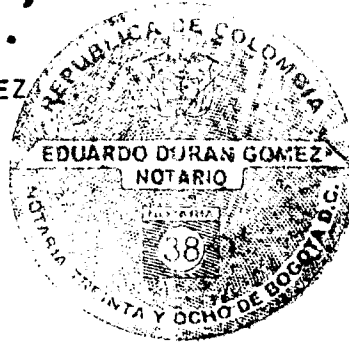
TELÉFONO OFICINA:

CELULAR:

ESTADO CIVIL:

EL NOTARIO TREINTA Y OCHO (38)
DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.


EDUARDO DURAN GOMEZ



Ma. I.

7997


Z. HDEZ.



This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions.

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the capacity of the person who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears.

This Apostille does not certify the content of the document for which it was issued.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. District of Columbia, United States of America
2. This public document has been signed by LISA RENEE JOHNSON
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of LISA RENEE JOHNSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 22nd day of AUGUST 2011
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 255078
9. Seal

10. Signature:



Cynthia Brock-Smith

Cynthia Brock-Smith

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

General Power of Attorney

Poder General

The undersigned,

Los suscritos,

COVX TECHNOLOGIES IRELAND LIMITED

domiciled in

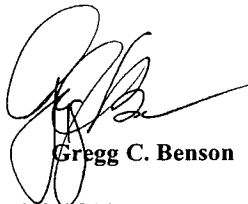
domiciliados en

Pottery Road Dub Laoghaire Country Dublin, Dublin, Irlanda

hereby appoint to **Carlos R. Olarte** as legal representative with authority to appoint judicial or extrajudicial agents for matters related to **Patents for Inventions and Industrial Designs** in the Republic of Bolivia, Republic of Colombia, Republic of Ecuador, Republic of Peru and the Bolivarian Republic of Venezuela, in order to initiate before any authorities all the necessary actions to accomplish these purposes and to intervene in all instances, steps and procedural levels; to file and prosecute applications, receive notifications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which he may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte** como nuestro representante legal con facultades para nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales para asuntos de **Patentes de Invención y Diseños Industriales** en la República de Bolivia, República de Colombia, República de Ecuador, República de Perú y la República Bolivariana de Venezuela, para iniciar ante cualquier autoridad todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, recibir notificaciones, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que crea conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma:



Name/Nombre:

Gregg C. Benson

Date/Fecha:

07/19/2011

City,Country/Ciudad,País:

Groton, Connecticut, USA

Signature/Firma:

Name/Nombre:

Date/Fecha:

City,Country/Ciudad,País:

Diagonal 34 No. 5 - 28 Bogotá D.C., Colombia.

Tel: + 57 (1) 601-7700 Fax: + 57 (1) 601-7799 e-mail: office@olartemoure.com
www.olartemoure.com

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,
19 July 2011)
The undersigned Notary Public certifies:

En esta fecha,
el Notario Público suscrito certifica:

1. That
of legal age and domiciled in
Pottery Road Dub Laoghaire Country Dublin, Dublin, Irlanda
signed the foregoing document.
2. That the grantor has executed the foregoing
document as Attorney-in-Fact
of **COVX TECHNOLOGIES IRELAND
LIMITED**

1. Que
Gregg C. Benson
mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.
2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

3. That **COVX TECHNOLOGIES
IRELAND LIMITED**
having its principal place of business located in
**Pottery Road Dub Laoghaire Country
Dublin, Dublin, Irlanda**
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the General Power is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. Que
con sede principal ubicada en
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

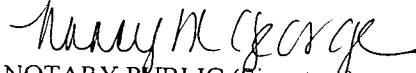
4. That the grantor has the authority to execute the
General Power and that his/her representation is
legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Power of Attorney dated 7/21/2009


NOTARY PUBLIC (Signature):

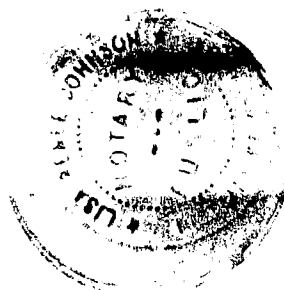
NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires
30 June 2016

I certify this to be
the original document

[Signature]
08-22-11

The District of Columbia: SS
subscribed and sworn to before me
this 22 day of August 2011

[Signature]
Lisa Renee Johnson
Notary Public, DC
My commission expires 10/14/2011



NOTARY PUBLIC
LISA RENEE JOHNSON
DISTRICT OF COLUMBIA
COMMISSION EXPIRES 10/14/2011

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés
presentado ante mí.
ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Ministerio de Justicia
Licencia 0041/1996

DISTRITO DE COLUMBIA

Esta Apostilla no tiene validez dentro de los Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones

Esta Apostilla solamente certifica la autenticidad de la firma y el cargo de la persona quien firmó el documento público, y donde fuese necesario, la identidad del sello que lleve el documento público.

Esta Apostilla no certifica el contenido del documento para la cual fue otorgada.

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

- 1. País: **Estados Unidos de América**
- 2. Este documento público ha sido firmado por **LISA RENEE JOHNSON**
- 3. Actuando en calidad de **Notario Público para el Distrito de Columbia**
- 4. Lleva el sello de **LISA RENEE JOHNSON, Notario Público para el Distrito de Columbia**

CERTIFICA

- 5. en Washington, D.C.
- 6. **22 de agosto de 2011**
- 7. por el Secretario delegado del Distrito de Columbia
- 8. Número **255078**
- 9. Sello: (ilegible)
- 10. Firma: **Cynthia Brock-Smith** (firma ilegible)

Certificación Notarial

En esta fecha
19 de julio de 2011

.....

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
Apoderado

.....

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

Poder con fecha 7/21/2009

NOTARIO PÚBLICO (firma): ilegible

SELLOS:

NANCY M. GEORGE
Notario Público
Mi comisión vence el 30 de junio de 2016

Certifico que el presente documento es el original.
(firmado ilegible)
08-22-11

El Distrito de Columbia: SS
suscrito y juramentado ante mi este 22 de agosto de 2011.
(firma ilegible)
Lisa Renee Johnson
Notario Público, D.C.
Mi comisión vence el 10/14/2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lisa Renee Johnson', with a long horizontal stroke extending to the left.

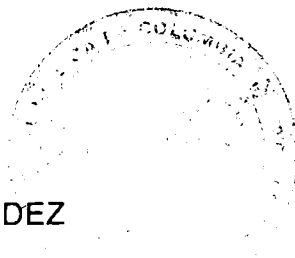
PRIMERA

(1) COPIA (FOTOCOPIA) DE LA ESCRITURA

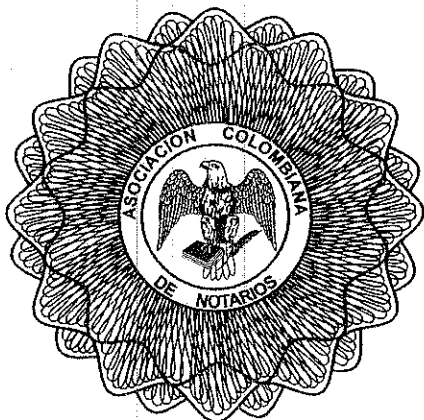
No. **7853** DE FECHA **OCHO** (**08**) DEL MES DE **SEPTIEMBRE**
DE **DOS MIL ONCE** (**2011**) TOMADA DE SU ORIGINAL CONFORME
AL ART. 41 DEL DECRETO 2148 DE 1983, QUE SE EXPIDE EN BOGOTÁ, D.C.,
A **OCHO** (**08**) DEL MES DE **SEPTIEMBRE**
DE DOS MIL ONCE (2011), EN **SEIS** (**06**) FOLIOS
UTILES CON DESTINO A: **CARLOS REINALDO OLARTE**


RODOLFO REY BERMUDEZ

NOTARIO TREINTA Y OCHO (38E)



WK 4682687



ESCRITURA PUBLICA NUMERO -----
TRESCIENTOS VEINTIUNO (321).-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Veintitres - - - (23) días del mes de
Marzo - - - - - del año dos mil siete
(2007), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE

Se Dio
3 Copias
29 MAR. 2007

URUEPA ----- NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, - - -se otorgó la escritura pública que se
consigna en los siguientes términos: -----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: -----
CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA -----
C.C. No. 79.782.747.-----

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor de
edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, obrando en su propio nombre y
dijo: -----

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en
los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta
escritura corresponda, en seis (6) folios autenticados, el poder y
sus traducciones el cual del siguiente tenor: -----

PODER GENERAL.-----

El suscrito, PFIZER INC, domiciliado en 235 East 42nd Street,
New York, New York 10017, USA, nombramos por el presente
otorga a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World
Trade Center- Torre A, Calle 100 No. 8ª-37, piso 10, Bogotá D.C.
nuestros representantes legales con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales
en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Uruea

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento, y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----

Firma (ilegible) Gregg C. Benson, Assistant General Counsel -----

Fecha: 20 February 2007.-----

Ciudad, Groton, Connecticut 06340 USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha, -----

el Notario Público suscrito certifica: -----

Que GREGG C. BENSON mayor y domiciliado PFIZER INC.,
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA

NOTARIO PUBLICO
(HAY SELLO ADHERIDO)

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. PAIS: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. HA SIDO FIRMADO POR **STEPHEN DAVID FINN**
3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE **NOTARIO PUBLIC**
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO

CERTIFICADO

5. EN **LONDRES**
6. EL DIA **FEBRERO 27, 2007**
7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y DE LA COMUNIDAD.
8. NR. **H303068**
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMADO

O. WILLIAM
(HAY FIRMA)

Si este documento va a ser usado en un país no miembro de la Convención de La Haya de Octubre 5, 1961, debe ser presentado ante la sección consular de la misión representante de ese país. Una apostilla o certificado de legalización solamente confirma que la firma, sello o estampilla en el documento es auténtica. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Extranjería de la Comunidad apruebe el contenido.

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, **anexo**.

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

Traductor e Interprete Oficial
Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia

Fidel Murcia



NOTARIA VENTISIETE
María Eugenia Rojas de Urrieta

BOGOTA DC. MARZO 12, 2007

TRADUCCIÓN OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER
(VERIFIQUE ANTES DE PROCEDER)

NOTA DE TRADUCCIÓN: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR **PFIZER INC** A **OLARTE RAISBECK & FRIERI LTD**, DE FECHA **FEB-20-2007**, SUSCRITO EN GROTON, CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACIÓN NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACIÓN NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE:

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO, NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO,

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITULADO,

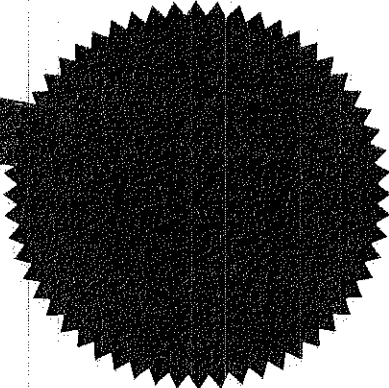
PODER, firmado por Gregg C Benson

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.

(HAY FIRMA)
STEPHEN FINN





BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive
High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary
Public

CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

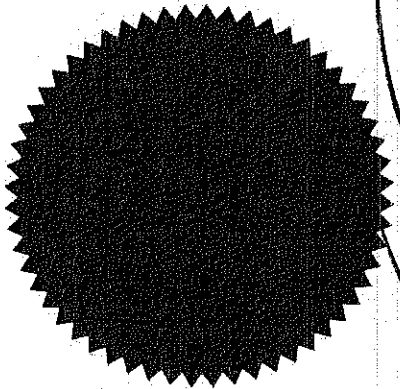
GENERAL POWER signed by Gregg C. Benson.

has this day been presented to me by Blair Consular Services on behalf of
their client Pfizer, and that the said Blair Consular Services have represented
to me by such presentation that their said client has represented to them that
the annexed document is an authentic original document.

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 23rd February
2007.



Stephen Finn
Notary Public



NOTARIA VENTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Irujo

6396

OLA

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public
2. Has been signed by **Stephen David Finn**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de
5. at London/à Londres
6. Certified/Attesté
the/le **27 February 2007**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **H303068**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **O Williams**



[Handwritten signature]

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

General Power

The undersigned,

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, New York 10017 USA

hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Signature/Firma:

Gregg C. Benson, Assistant General Counsel

Date/Fecha:

20 February 2007

City/Country:

Groton, Connecticut 06340 USA

Poder General

El suscrito,

domiciliado en

nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconveniones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas
Alexander Agudelo
Camilo A. Rodríguez

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

NOTARIA VENTISIEVE
María Eugenia Rojas de Uribe

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
20 February 2007

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

GREGG C. BENSON
PFIZER INC., EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as ASSISTANT GENERAL COUNSEL OF PFIZER INC.

3. That Pfizer Inc.
having its principal place of business located in
235 East 42nd Street, New York, NY 10017
USA

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

GREGG C. BENSON
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

4. Que

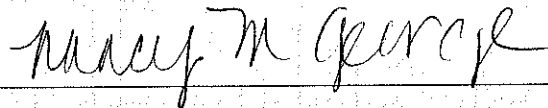
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):



NANCY M. GEORGE

Notary Public

My Commission Expires 30 June 2011

WK 4682689



suscribió el documento que antecede. ---

2- Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ----

4. Que con sede principal ubicada en.-----
está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el

poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4.- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.- -----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s): NANCY M. GEORGE Notary Public My commission Expires 30 June 2001.- -----

BOGOTA, MARZO 12, 2007- -----

TRADUCCION OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER -----

NOTA DE TRADUCCION: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR PFIZER INC A OLARTE RAISBECK & FRIER LTD DE FECHA FEB-20-2007, SUSCRITO EN GROTON CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACION NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACION NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE: -----

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO -----

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITUADO, -----

PODER, firmado por Gregg C Benson-----

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares

NOTARIA VEINTISIETE

Maria Eugenia Rojas de Uribe



Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.-----

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.-----

(HAY FIRMA) STEPHEN FINN NOTARIO PUBLICO (HAY SELLO ADHERIDO).-----

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte -----

ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: STEPHEN DAVID FINN-----

3. ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO PUBLIC-----

4 LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO -----

CERTIFICADO

5. EN LONDRES-----

6) EL DÍA FEBRERO 27, 2007 -----

7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y LA COMUNIDAD.-

8 NR.H303068 -----

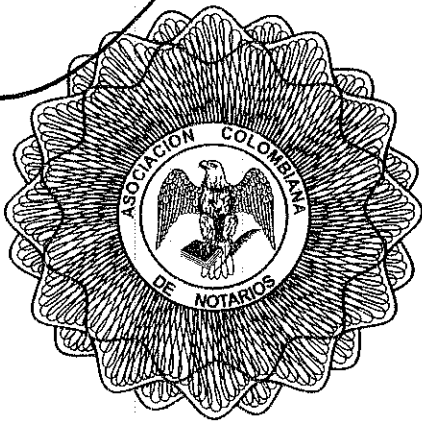
9. SELLO/ ESTAMPILLA: == -----

10. Firmado O. WILLIAM (HAY FIRMA)-----

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, anexo.-----

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA Traductor e Interprete Oficial Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia (fdo. Fidel Murcia)".-----

WK 4682690



SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Uribe

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. -- Se utilizaron las hojas de papel Notarial Nos:

WK 4682687, WK 4682689, WK 4682690.-----

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00

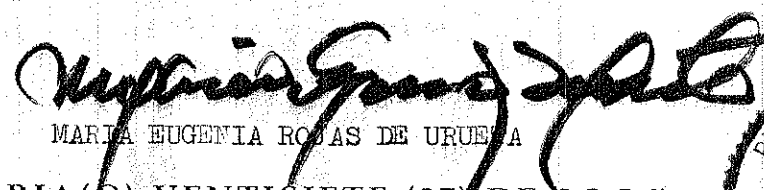
RESOLUCION 7880 DE 2006

IVA \$ 12.078.00


CARLOS REINALDO OJARTE GARCIA

C.C.No. 79'782.747 BIA

TEL: 601-7700


MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTA



redb.

Es fiel y Sexta 169
fotocopia de la Escritura Pública No. 321
de fecha 23 de Marzo de 2007
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 MAYO 2007

El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá.



(43) International Publication Date
10 May 2012 (10.05.2012)(10) International Publication Number
WO 2012/059873 A2(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/IB2011/054874(22) International Filing Date:
2 November 2011 (02.11.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/410,715 5 November 2010 (05.11.2010) US(71) Applicants (for all designated States except US): **COVX TECHNOLOGIES IRELAND, LTD.** [IE/IE]; Pottery Road Dun Laoghaire, County Dublin (IE). **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ISHINO, Tetsuya** [JP/US]; Pfizer Global Research and Development, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, Massachusetts 02140 (US). **PALANKI, Moorthy Sitharamaiah Suriyanarayana** [US/US]; CovX Research LLC 9381 Judicial Drive, Suite 200, San Diego, California 92121 (US). **VIOLAND, Bernard Norman** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 700 Chesterfield Village Parkway, Chesterfield, Missouri 63017 (US). **DAS, Tapan, Kanti** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017 (US). **HODGE, Tamara, Shafer** [US/US]; 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017 (US). **LEVIN, Nancy, Jane** [US/US]; CovX Research LLC, 9381 Judicial Drive, Suite 200, San Diego, CA 92121 (US). **PARSONS, Erin, Kristen** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, MO 63017 (US).(74) Agent: **BENSON, Gregg C.**; Pfizer Inc. Eastern Point Road MS9114, Groton, Connecticut 06340 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ANTI-DIABETIC COMPOUNDS

(57) Abstract: The present invention provides a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21. Various uses of the compounds are provided, including methods to prevent or treat diabetes or diabetes-related conditions.

**WO 2012/059873 A2**

ANTI-DIABETIC COMPOUNDS

The present invention relates to novel compounds that promote insulin secretion and lower blood glucose levels, and methods of making and using these compounds.

5 BACKGROUND

Type II diabetes is the most prevalent form of diabetes. The disease is caused by insulin resistance and pancreatic β cell failure, which results in decreased glucose-stimulated insulin secretion. Fibroblast growth factor (FGF) 21, a member of the FGF family, has been identified as a metabolic regulator and is preferentially
10 expressed in the liver and adipose tissue and exerts its biological activities through the cell surface receptor composed of FGFR1c and β -Klotho on target cells such as liver and adipose tissues (WO0136640, and WO0118172). The receptor complex is thought to trigger cytoplasmic signaling and to up-regulate the GLUT1 expression through the Ras/MAP kinase pathway. Its abilities to provide sustained glucose and
15 lipid control, and improve insulin sensitivity and β -cell function, without causing any apparent adverse effects in preclinical settings, have made FGF21 an attractive therapeutic agent for type-2 diabetes and associated metabolic disorders.

There have been a number of efforts towards developing therapies based on FGF21. WO2006065582, WO2006028714, WO2006028595, and WO2005061712
20 relate to muteins of FGF21, comprising individual amino-acid substitutions. WO2006078463 is directed towards a method of treating cardiovascular disease using FGF21. WO2005072769 relates to methods of treating diabetes using combinations of FGF21 and thiazolidinedione. WO03059270 relates to methods of reducing the mortality of critically ill patients comprising administering FGF21.
25 WO03011213 relates to a method of treating diabetes and obesity comprising administering FGF21.

However, many of these proposed therapies suffer from the problem that FGF21 has an *in-vivo* half-life of between 1.5 and 2 hrs in humans. Some attempts have been made to overcome this drawback. WO2005091944, WO2006050247 and
30 WO2008121563 disclose FGF21 molecules linked to PEG via lysine or cysteine residues, glycosyl groups and non-natural amino acid residues, respectively. WO2005113606 describes FGF21 molecules recombinantly fused via their C-terminus to albumin and immunoglobulin molecules using polyglycine linkers.

However, developing protein conjugates into useful, cost-effective pharmaceuticals presents a number of significant and oftentimes competing challenges: a balance must be struck between *in vivo* efficacy, *in vivo* half-life, stability for *in vitro* storage, and ease and efficiency of manufacture, including conjugation efficiency and specificity. In general, it is an imperative that the conjugation process does not eliminate or significantly reduce the desired biological action of the protein in question. The protein-protein interactions required for function may require multiple regions of the protein to act in concert, and perturbing any of these with the nearby presence of a conjugate may interfere with the active site(s), or cause sufficient alterations to the tertiary structure so as to reduce active-site function. Unless the conjugation is through the N' or C' terminus, internal mutations to facilitate the linkage may be required. These mutations can have unpredictable effects on protein structure and function. There therefore continues to be a need for alternative FGF21-based therapeutics.

The reference to any art in this specification is not, and should not be taken as, an acknowledgement of any form or suggestion that the referenced art forms part of the common general knowledge.

Summary of Invention

The present invention relates to a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21.

The linking residue may be cysteine or lysine. The linking residue may be located at a position selected from the group consisting of amino acid residue numbers 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 and 129, according to the numbering of SEQ ID NO:1. The linking residue may be located at a position selected from the group consisting of amino acid residue numbers 56, 59, 86, and 122 according to the numbering of SEQ ID NO:1. The linking residue may be located at a position selected from the group consisting of residue 79, 125 and 129 according to the numbering of SEQ ID NO:1.

In some aspects, the invention provides a composition comprising a FGF21 molecule covalently connected to at least one half-life-increasing moiety at a linking residue located at residue number 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 and/or 129 according to the numbering of SEQ ID NO:1. In some aspects, the FGF21 molecule is covalently connected to one half life-increasing moiety. In some aspect, the linking

residue is selected from the group consisting of residue numbers 79, 125 and 129. The term "half life-increasing moiety" refers to any molecule that when connected to the FGF21 molecule, increases the circulating half-life of the FGF21 molecule and/or inhibits or reduces renal clearance of the FGF21 molecule. Examples of half life-increasing moieties include PEG, mPEG, phosphorylcholine containing polymers, Fc domains, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, diabodies, minibodies, antibodies, catalytic antibodies (discussed below), proteins (such as albumin), and other macromolecules known in the art.

10 The side chain of the linking residue may comprise a thiol group. The linking residue may be cysteine.

The FGF21 molecule may comprise SEQ ID NO:3. The FGF21 molecule may comprise SEQ ID NO:4. The FGF21 molecule may comprise a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, and SEQ ID NO:13.

15 The linking residue may be located at position 125 according to the numbering of SEQ ID NO:1. The FGF21 molecule may comprise a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, and SEQ ID NO:7. In some embodiments, the FGF21 sequence is SEQ ID NO:7.

20 The linking residue may be located at position 129 according to the numbering of SEQ ID NO:1. The FGF21 molecule may comprise a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:10. In some embodiments, the FGF21 sequence is SEQ ID NO:10.

25 The linking residue may be located at position 79 according to the numbering of SEQ ID NO:1. The FGF21 molecule may comprise a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, and SEQ ID NO:13. In some embodiments, the FGF21 sequence is SEQ ID NO:13.

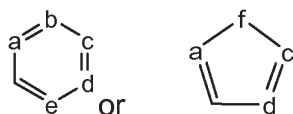
30 In some embodiments, the linking residue may be located at a position selected from the group consisting of 1, 2, 56, 59, 69, and 122 according to the numbering of SEQ ID NO:1. In some embodiments, the linking residue may be located at a position selected from the group consisting of 1, 2, 56, 59, and 122 according to the numbering of SEQ ID NO:1. The linking residue may be lysine. The

FGF21 molecule may comprise SEQ ID NO:17. The FGF21 molecule may comprise a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, and SEQ ID NO:23.

Certain suitable linkers are disclosed in US2009098130, the contents of which are incorporated herein by reference. In particular, aspects of US2009098130 pertaining to the general formulae describing linkers, specific linker structure, synthesis of linkers and combinations of different elements of X, Y and Z groups as specifically and generally described therein are herein included. The linker may be linear or branched, and optionally includes one or more carbocyclic or heterocyclic groups. Linker length may be viewed in terms of the number of linear atoms, with cyclic moieties such as aromatic rings and the like to be counted by taking the shortest route around the ring. In some embodiments, the linker has a linear stretch of between 5-15 atoms, in other embodiments 15-30 atoms, in still other embodiments 30-50 atoms, in still other embodiments 50-100 atoms, and in still other embodiments 100-200 atoms. Other linker considerations include the effect on physical or pharmacokinetic properties of the resulting compound, such as solubility, lipophilicity, hydrophilicity, hydrophobicity, stability (more or less stable as well as planned degradation), rigidity, flexibility, immunogenicity, and modulation of antibody binding, the ability to be incorporated into a micelle or liposome, and the like.

In some aspects of the invention, the compound comprises a linker covalently linked to the side chain of the linking residue. The linker may comprise the formula: X-Y-Z; wherein X is a biologically compatible connecting chain including any atom selected from the group consisting of C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, and may comprise a polymer or block co-polymer, and is covalently linked to the linking residue where the linker is linear, Y is an optionally present recognition group comprising at least a ring structure; and Z is an attachment moiety comprising a covalent link to an amino acid side chain in a combining site of an antibody.

When present, Y may have the optionally substituted structure:



wherein a, b, c, d, and e are independently carbon or nitrogen; f is carbon, nitrogen, oxygen, or sulfur; Y is attached to X and Z independently at any two ring positions of sufficient valence; and no more than four of a, b, c, d, e, or f are simultaneously

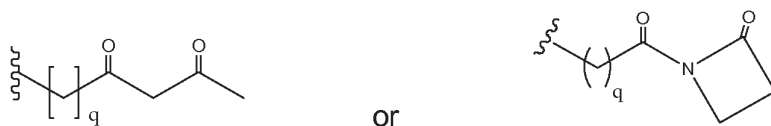
nitrogen and preferably a, b, c, d, and e in the ring structure are each carbon. In some aspects, Y may be phenyl. Although not wishing to be bound by any theory, it is believed that the Y group can assist in positioning the reactive group into an antibody combining site so that the Z group can react with a reactive amino acid side chain.

The linker may be designed such that it contains a reactive group capable of covalently or non-covalently forming a bond with a macromolecule, such as an antibody, protein, or fragment thereof. The reactive group is chosen for use with a reactive residue in a particular combining site. E.g. a chemical moiety for modification by an aldolase antibody may be a ketone, diketone, beta lactam, active ester, haloketone, lactone, anhydride, maleimide, alpha-haloacetamide, cyclohexyl diketone, epoxide, aldehyde, amidine, guanidine, imine, enamine, phosphate, phosphonate, epoxide, aziridine, thioepoxide, masked or protected diketone (e.g. ketal), lactam, haloketone, aldehyde, and the like. In embodiments of the present invention linking a peptide of the invention with a linker, Z is the reactive group.

In some embodiments, Z, prior to conjugation with the side-chain of a residue in the combining site of an antibody, includes one or more C=O groups arranged to form an azitidinone, diketone, an acyl beta-lactam, an active ester, a haloketone, a cyclohexyl diketone group, an aldehyde, a maleimide, an activated alkene, an activated alkyne or, in general, a molecule comprising a leaving group susceptible to nucleophilic or electrophilic displacement. Other groups may include a lactone, an anhydride, an alpha-haloacetamide, an imine, a hydrazide, or an epoxide. Exemplary linker electrophilic reactive groups that can covalently bond to a reactive nucleophilic group (e.g., a lysine or cysteine side chain) in a combining site of antibody include acyl beta-lactam, simple diketone, succinimide active ester, maleimide, haloacetamide with linker, haloketone, cyclohexyl diketone, aldehyde, amidine, guanidine, imine, enamine, phosphate, phosphonate, epoxide, aziridine, thioepoxide, a masked or protected diketone (a ketal for example), lactam, sulfonate, and the like, masked C=O groups such as imines, ketals, acetals, and any other known electrophilic group. In certain embodiments, the reactive group includes one or more C=O groups arranged to form an acyl beta-lactam, simple diketone, succinimide active ester, maleimide, haloacetamide with linker, haloketone, cyclohexyl diketone, or aldehyde. Z may be a substituted alkyl, substituted cycloalkyl, substituted aryl, substituted arylalkyl, substituted heterocyclyl, or

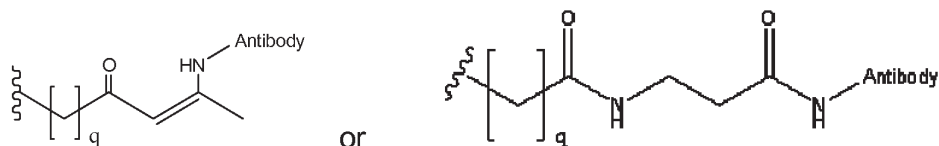
substituted heterocyclylalkyl, wherein at least one substituent is a 1,3-diketone moiety, an acyl beta-lactam, an active ester, an alpha-haloketone, an aldehyde, a maleimide, a lactone, an anhydride, an alpha-haloacetamide, an amine, a hydrazide, or an epoxide. Z group may be covalently linked to a macromolecule scaffold that can provide increased half-life to the peptides of the invention. Z group if present may be covalently linked to the combining site of an antibody.

In some aspects, prior to conjugation (for example, with the combining site of an antibody), Z has the structure:



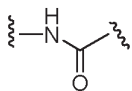
wherein $q=0-5$. q may be 1 or 2. q may be 1. In other aspects, q may be 2.

In some aspects, following conjugation with the antibody combining site, Z has the structure:

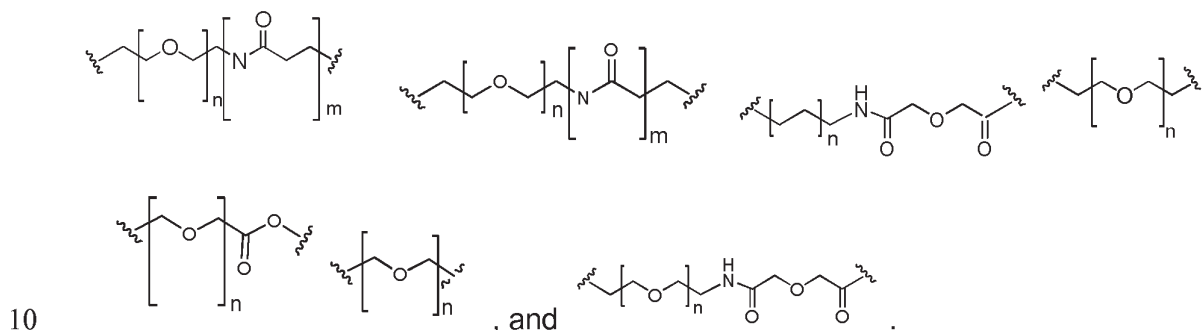


wherein $q=0-5$ and Antibody-N- is a covalent bond to a side chain in a combining site of an antibody. q may be 1 or 2. q may be 1. In other aspects, q may be 2.

X may be a group comprising three components; $X_p - X_s - X_y$, wherein X_p is a group specifically adapted to be combinable with the side chain of the linking residue of the FGF21 protein, X_s is a spacer region of the X group, and X_y is a group adapted to bind to the Y group. In some aspects, X_y is selected from an amide bond, an enamine bond, or a guanidinium bond. X_y may be selected so as to provide a hydrogen molecule adjacent (within two atoms) to the Y group. While not wishing to be bound by theory, it is believed that the H atom can assist the Y group recognition of a hydrophobic pocket through H-bond interaction, particularly in respect of the hydrophobic pocket of the binding cleft of a catalytic antibody, such as h38C2. Thus the amide bond, for example, may be orientated such that the NH group is directly bonded to the Y group, providing the H of the NH group for hydrogen bonding. Alternatively, the $\text{C}=\text{O}$ group of an amide may be bonded to the Y group, with the H of the NH group up to 2 atoms adjacent to the Y group, but still available for H-bonding. In some embodiments, X_y is absent. In some embodiments the X_y group has the formula:

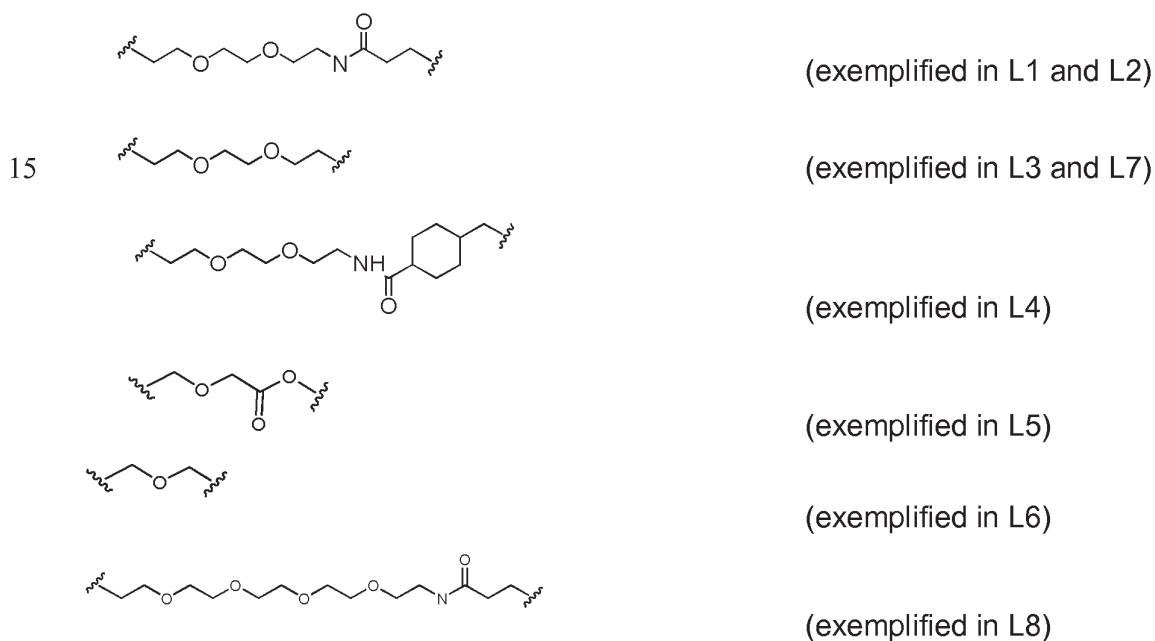


In some aspects, Xs is selected such that Xs does not provide any overly reactive groups. Xs may be selected so as to provide an overall length of the X groups of between 2-15 atoms. Xs may be selected so that the overall length of the X group is between 2 and 10 atoms. Xs may be selected so that the overall length of X group is 4-8 atoms. Xs may be selected so that the overall length of X group is 5 atoms. Xs may be selected so that the overall length of X group is 6 atoms. In some aspects, Xs may comprise one of the following formulae:



where $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, or 10 , and m is present or absent; n may be $1, 2, 3, 4, 5$, or 6 ; n may be $1, 2, 3$, or 4 ; n may be 1 ; n may be 2 ; n may be 3 ; n may be 4 .

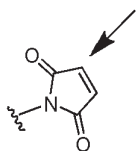
In some aspects, Xs comprises one of the following formulae:



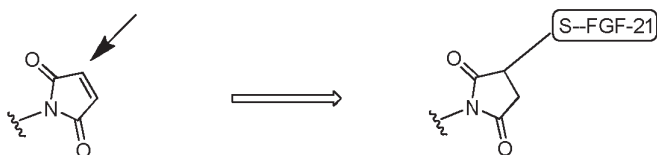
Xp ideally is selected so as to enable a specific directional covalent linking strategy to the linking residue of the FGF21 protein. For example, where the linking residue comprises a nucleophilic group, Xp may be an electrophilic group and vice versa. For example, if the linking residue side chain comprises an amine group, such as K, H, Y, orthinine, Dap, or Dab, Xp may be COOH, or other similarly reactive electrophile. If the linking residue is D or E, Xp may comprise a nucleophilic group, such as an amine group. Either of these strategies permits a covalent bond to be formed between the Xp group and the linking residue by amide bond formation strategies. Where the linking group is an amine group, Xp may comprise the formula:



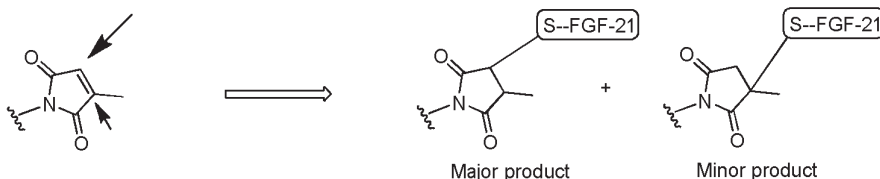
Where the linking residue is C, homologs of C, or other thiol-group containing residues, Xp may comprise a maleimide group (or similar) permitting a thiol-maleimide addition reaction strategy to covalently link the Xp group to the linking residue. In some aspects, Xp may also comprise a thiol group, allowing a disulphide bridge to be formed between the linking residue and Xp group. In some aspects, Xp may be maleimide:



wherein the arrow indicates the point of attachment to the FGF21 linking residue and the parallel line represents to attachment to the Y group of the linker. Where the FGF21 linking residue is a cysteine residue, or other thiol bearing side chain, the mechanism of conjugation may be as follows:



In some aspects, the Xp group comprises a substituted maleimide:

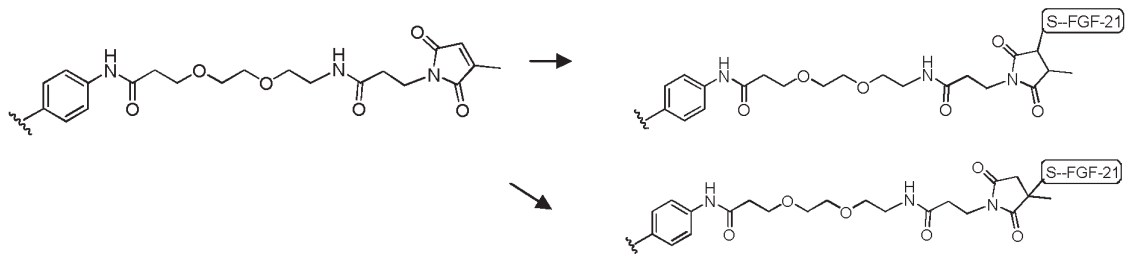


In some aspects, the XY components of the linker prior to conjugation and following conjugation may be selected from the following:

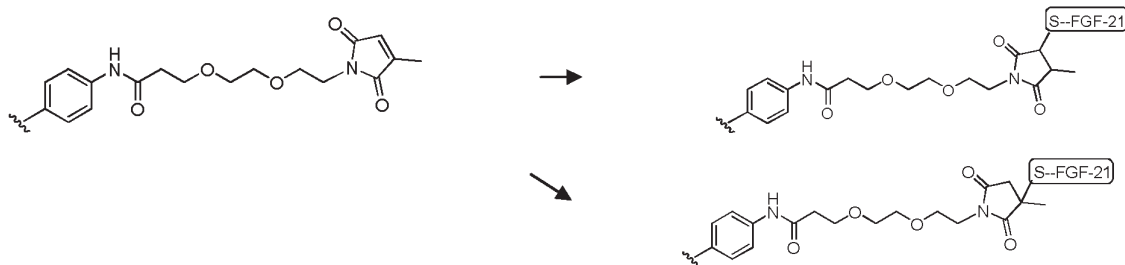
XY-1



5 XY-2

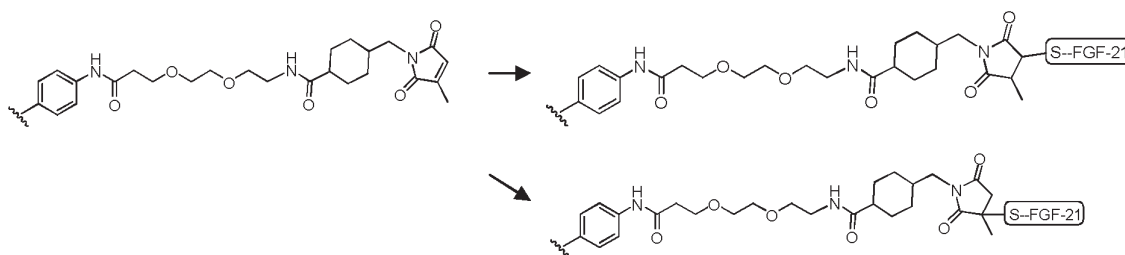


XY-3



10

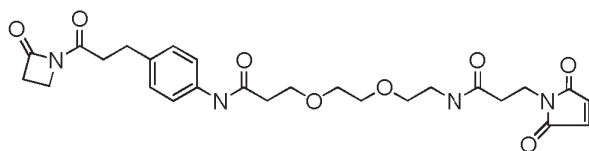
XY-4



15

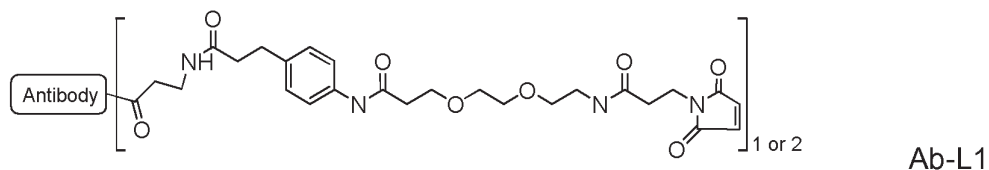
Components XY-1, XY-2, XY-3, and XY-4 are particularly useful in embodiments conjugating to a thiol-group bearing side chain on the FGF21 molecule.

In some embodiments, the linker may be Linker-1 (L1):

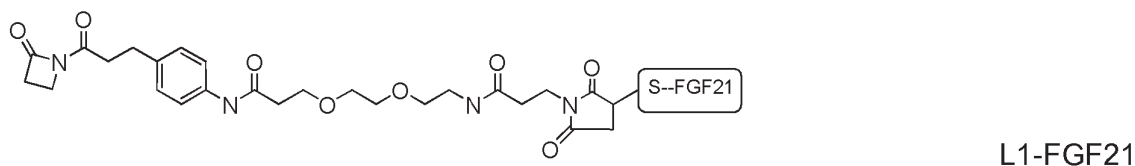


L1

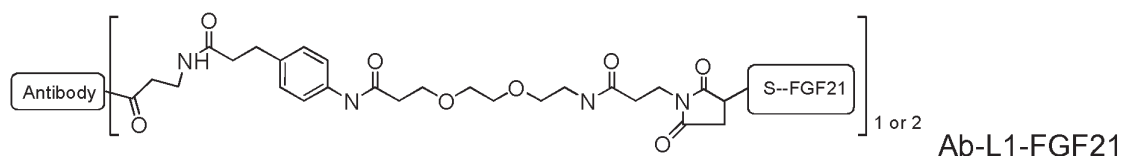
When L1 is conjugated to the antibody, the antibody-L1 complex may comprise the formula:



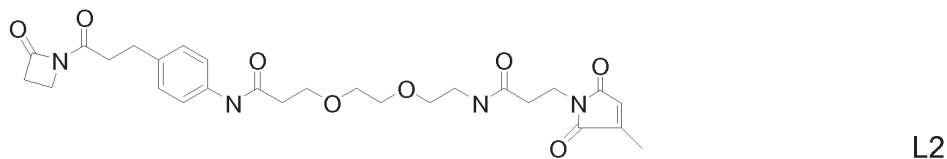
When L1 is conjugated to the FGF21 molecule, the L1-FGF21 complex may comprise the formula:



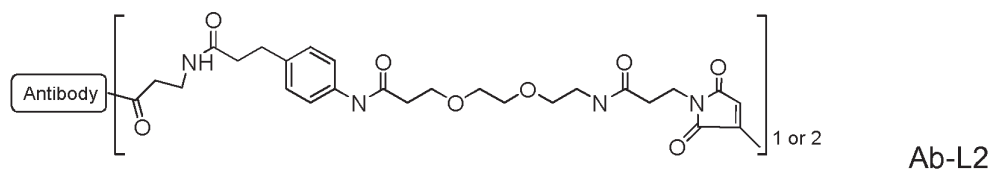
When L1 is conjugated to the antibody and FGF21 molecule, the antibody-L1-FGF21 complex may comprise the formula:



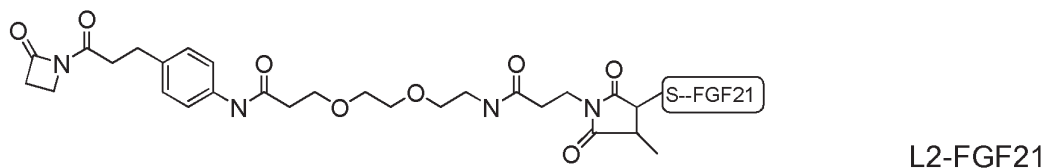
In some embodiments, the linker may be Linker-2 (L2):

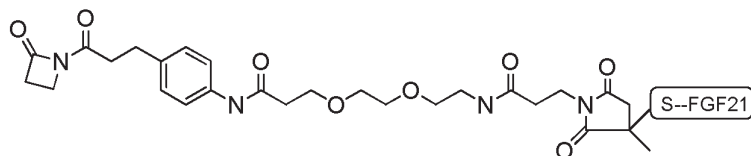


When L2 is conjugated to the antibody, the antibody-L2 complex may comprise the formula:



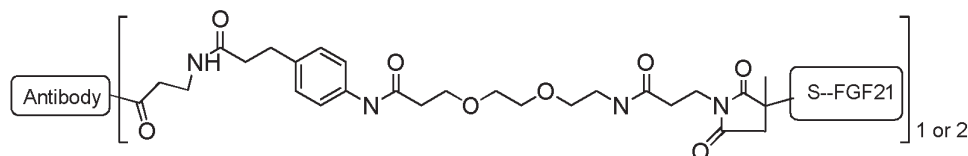
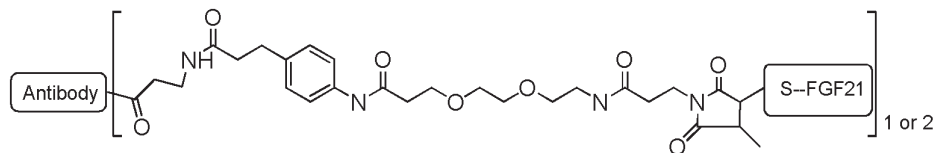
When L2 is conjugated to the FGF21 molecule, the L2-FGF21 complex may comprise one of the following formulae:





L2-FGF21

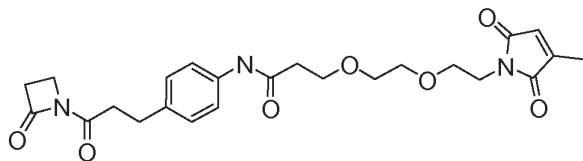
When L2 is conjugated to the antibody and the FGF21 molecule, the antibody-L2-FGF21 complex may comprise one of the following formulae:



5

Ab-L2-FGF21

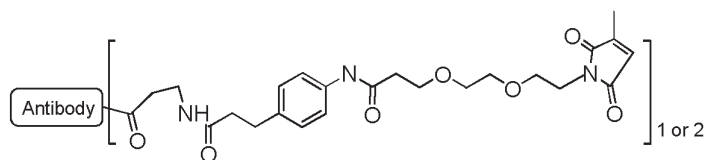
In some embodiments, the linker may be Linker-3 (L3):



L3

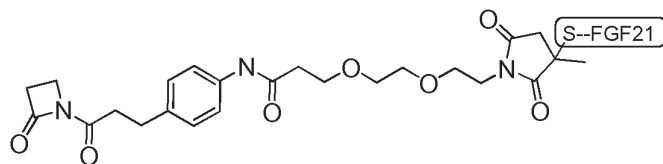
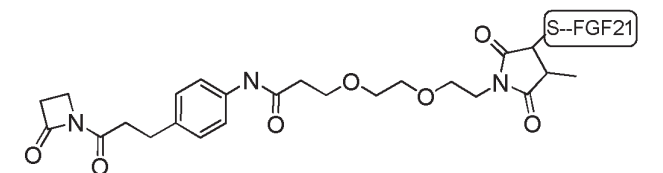
When L3 is conjugated to the antibody, the antibody-L3 complex may comprise the formula:

10



Ab-L3

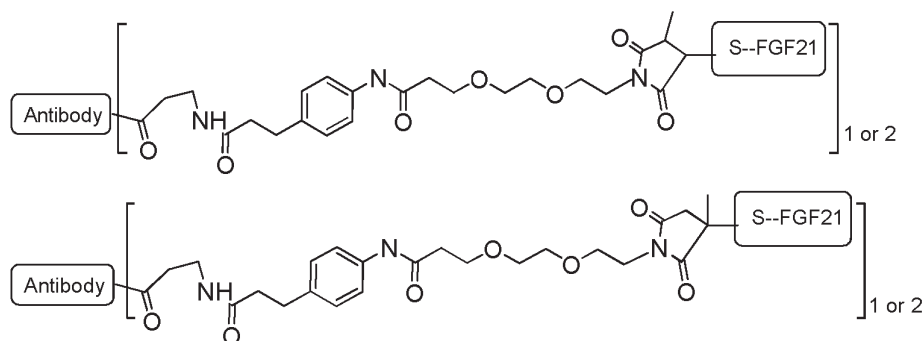
When L3 is conjugated to the FGF21 molecule, the L3-FGF21 complex may comprise one of the following formulae:



15

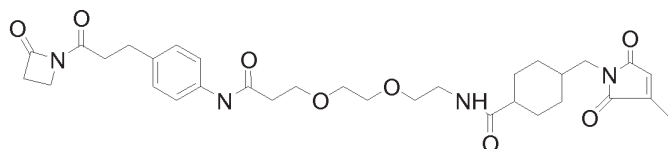
L3-FGF21

When L3 is conjugated to the antibody and the FGF21 molecule, the antibody-L3-FGF21 complex may comprise the formula:



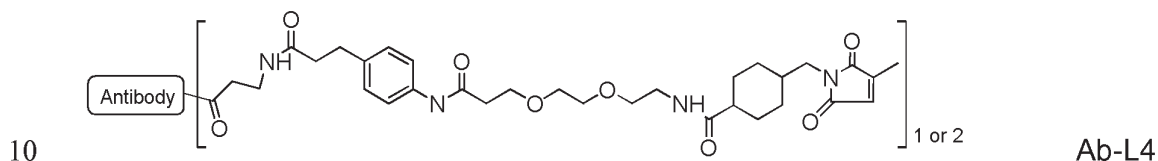
5 Ab-L3-FGF21

In some embodiments, the linker may be Linker-4 (L4):



L4

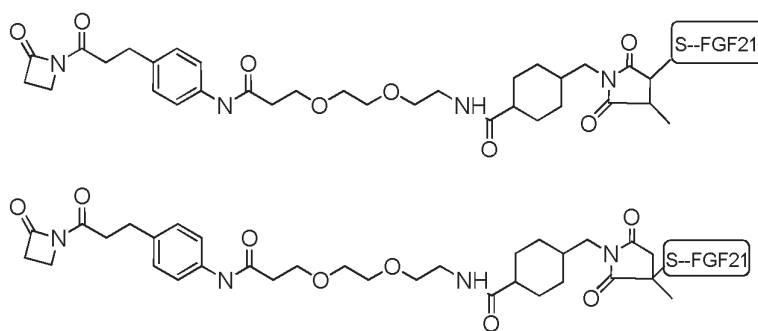
When conjugated to the antibody, the antibody-L4 complex may comprise the formula:



10

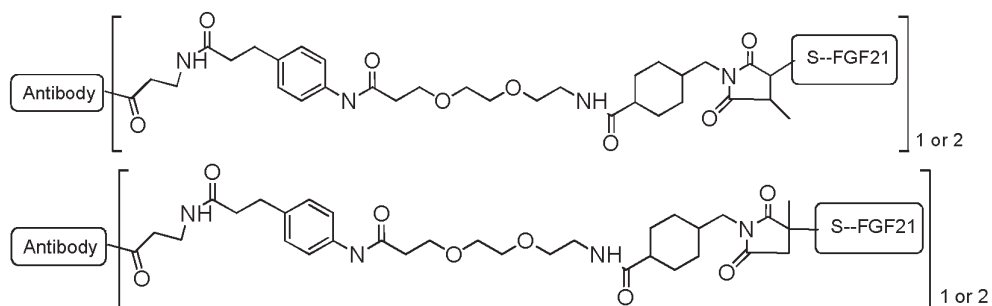
Ab-L4

When conjugated to the FGF21 molecule, the L4-FGF21 complex may comprise the formula:



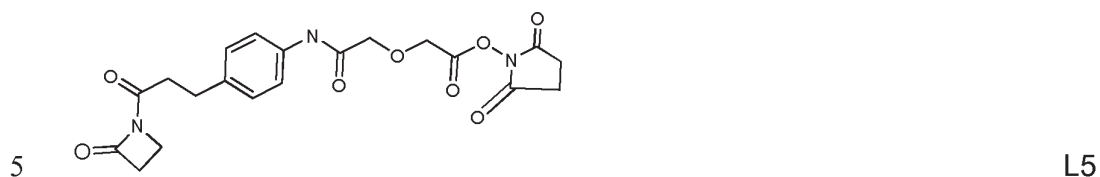
L4-FGF21

15 When L4 is conjugated to the antibody and the FGF21 molecule, the antibody-L4-FGF21 complex may comprise the formula:

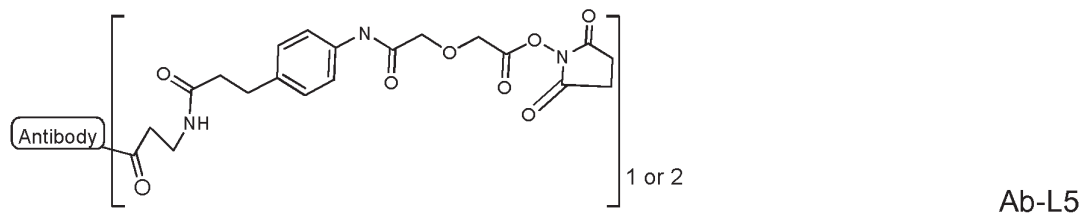


Ab-L4-FGF21

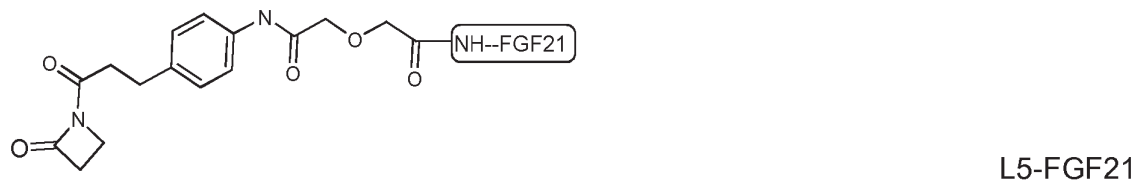
In some embodiments, the linker may be Linker-5 (L5):



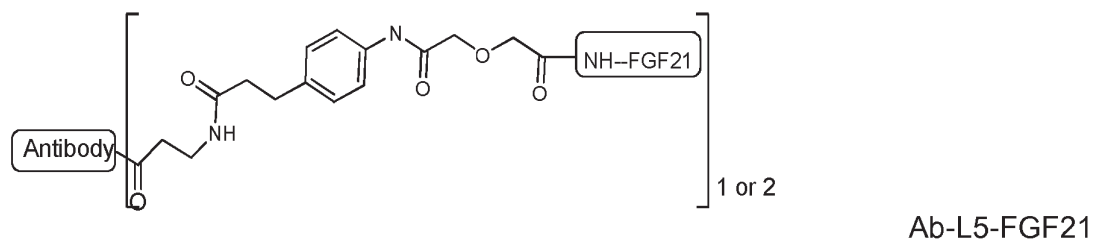
When L5 is conjugated to the antibody, the antibody-L5 complex may comprise the formula:



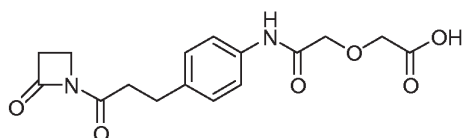
When L5 is conjugated to the FGF21 molecule, the L5-FGF21 complex may comprise the formula:



When L5 is conjugated to the antibody and FGF21 molecule, the antibody-L5-FGF21 complex may comprise the formula:

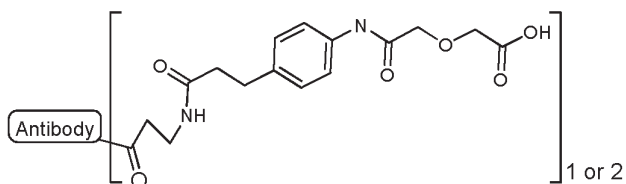


In some aspects, the linker may be Linker-6 (L6).



L6

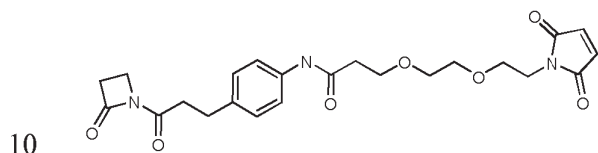
When L6 is conjugated to the antibody, the antibody-L5 complex may comprise the formula:



Ab-L6

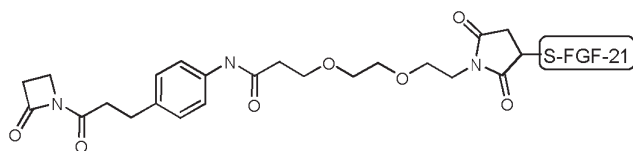
- 5 When L6 is conjugated to the FGF21 molecule, the L6-FGF21 complex may comprise the same formula as that for L5-FGF21. Similarly, when L6 is conjugated to the antibody and the FGF21 molecule, the antibody-L6-FGF21 complex may comprise the same formula as that for Ab-L5-FGF21.

In some embodiments, the linker may be Linker-7 (L7):



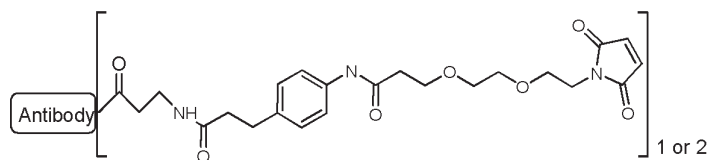
L7

When conjugated to the antibody, the antibody-L7 complex may comprise the formula:



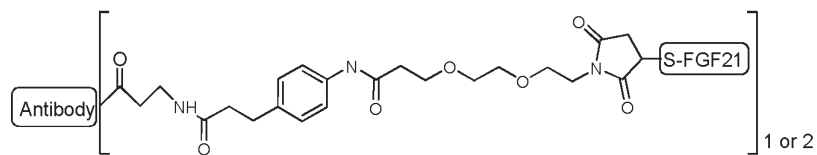
L7-FGF21

- 15 When conjugated to the FGF21 molecule, the L7-FGF21 complex may comprise the formula:



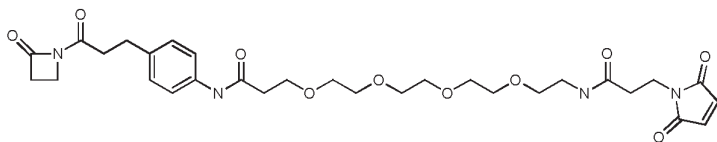
Ab-L7

When conjugated to the antibody and FGF21 molecule, the antibody-L7-FGF21 complex may comprise the formula:



Ab-L7-FGF21

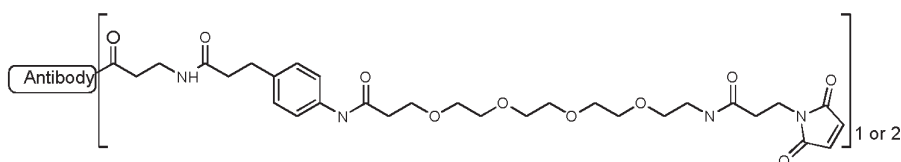
In some embodiments, the linker may be Linker-8 (L8):



L8

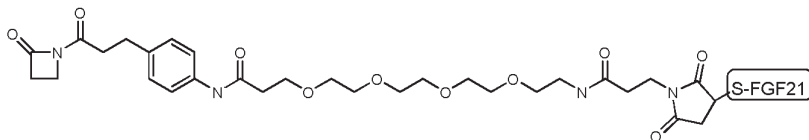
When L8 is conjugated to the antibody, the antibody-L8 complex may comprise the formula:

5



Ab-L8

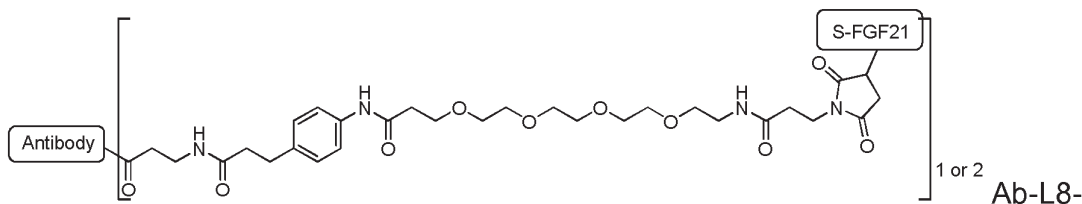
When L8 conjugated to the FGF21 molecule, the L8-FGF21 complex may comprise the formula:



L8-FGF21

When L8 is conjugated to the antibody and the FGF21 molecule, the antibody-L8-FGF21 complex may comprise the formula:

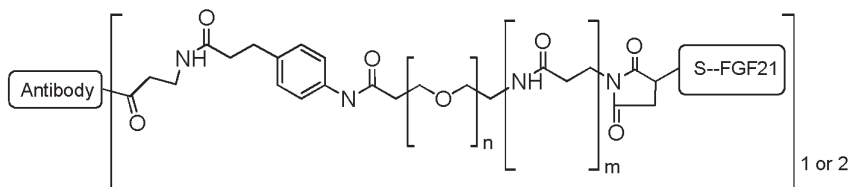
10



Ab-L8-FGF21

FGF21

In some embodiments, the Ab-linker-FGF21 conjugate may be of the formula:

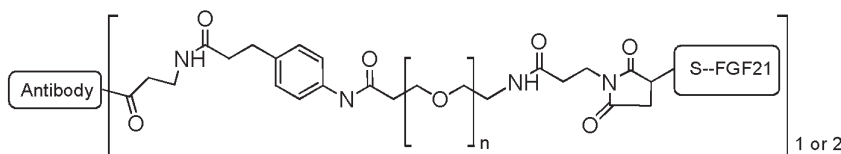


15

wherein the Antibody combining site is covalently linked to the linker, S-FGF21 is the covalent linkage to a thiol-bearing side chain on an FGF21 molecule, $n=1$, or 2, or 3,

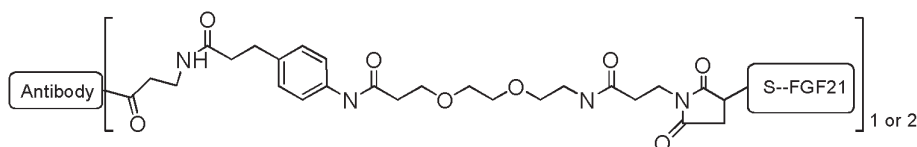
or 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10; n may be 1, 2, 3, 4, 5, or 6; n may be 1; n may be 2; n may be 3; n may be 4, and m is optional. M may be absent. M may be present.

In some embodiments, the Ab-linker-FGF21 conjugate may be of the formula:



- 5 wherein the Antibody combining site is covalently linked to the linker, S-FGF21 is a covalent linkage to a thiol-bearing side chain on an FGF21 molecule, n=1, or 2, or 3, or 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10; n may be 1, 2, 3, 4, 5, or 6; n may be 1; n may be 2; n may be 3; n may be 4.

In some embodiments, the composition comprises the formula:



10

wherein Antibody is a covalent linkage to the combining site of an antibody, S-FGF21 is a covalent linkage to a thiol-bearing side chain on an FGF21 molecule. In some embodiments, the FGF21 molecule comprises SEQ ID NO:10. In some embodiments, the FGF21 molecule comprises SEQ ID NO:7.

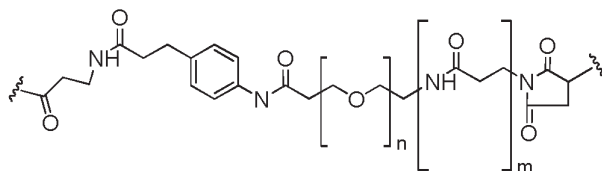
15

In some aspects, the invention is directed towards the linkers and linker components as described herein, particularly, but not limited to, the X groups described herein. In some aspects, the invention is directed towards compositions comprising an antibody or antigen binding portion thereof, covalently conjugated to a linker or linker group as described herein. In some aspects, the linker or linker group may be further directly or indirectly conjugated to a peptide or protein. It will be apparent that the usefulness of the linkers and antibody linker conjugates is not limited by application with FGF21 molecules, and said Ab-linker conjugates may be conjugates with other peptides, proteins and therapeutic and targeting agents. For these purposes, the same structures as herein described depicting S-FGF21 and

20

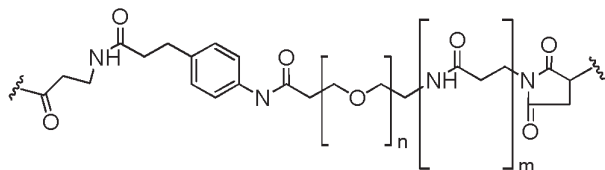
25 NH-FGF21 may be understood to apply to other proteins, peptides and therapeutic and targeting molecules; the FGF21 nomenclature of the represented structure being replaced with said protein, peptide or molecule.

In some aspects, the invention provides a linker of the formula:



wherein $n=1$, or 2, or 3, or 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10; n may be 1, 2, 3, 4, 5, or 6; n may be 1; n may be 2; n may be 3; n may be 4. M may be absent. M may be present.

In some aspects, the invention provides a linker of the formula:



wherein $n=1$, or 2, or 3, or 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10; n may be 1, 2, 3, 4, 5, or 6; n may be 1; n may be 2; n may be 3; n may be 4. M may be absent. M may be present.

In some embodiments, the invention is directed towards a composition comprising a linker selected from the group consisting of L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 and L8, as well as other specific and general linker formulae herein described. IN some aspects, the invention is directed towards methods of making said linkers and antibody-linker, protein-linker, or antibody-linker-protein conjugates thereof.

In some embodiments, the invention relates to a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21 forming a conjugated protein-antibody complex, such that the subcutaneous half-life of the conjugated protein-antibody complex is at least about 20 hrs in murine models. In some embodiments, the SC half-life is at least about 25 hrs. In some embodiments, the SC half-life is at least about 30 hrs. In some embodiments, the SC half-life is at least about 33 hrs. In some embodiments, the SC half-life is at least about 35 hrs in rat models. In some embodiments, the SC half-life is at least about 36 hrs in rat models. In some embodiments, the SC half-life is at least about 40 hrs in primate models. In some embodiments, the SC half-life is at least about 45 hrs in primate models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life of at least about 28 hrs in murine models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life of at least about 55 hrs in rat models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an

IV half-life of at least about 55 hrs in rat models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life of at least about 60 hrs in rat models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life of at least about 60 hrs in primate models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life of at least about 65 hrs in primate models. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life following a single dose of at least about 30 hrs in humans. In some embodiments, the invention provides a conjugated antibody-protein complex with an IV half-life following a single dose of at least about 35 hrs in humans.

In some embodiments, the invention relates to a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21 forming a conjugated protein-antibody complex, such that the subcutaneous bioavailability of the conjugated protein-antibody complex is at least about 50% in murine models. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 55 %. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 65%. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 50% in rat models. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 50% in primate models. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 60% in primate models. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 65% in primate models.

In some embodiments, the invention relates to a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21 forming a conjugated protein-antibody complex, such that the subcutaneous bioavailability of the conjugated protein-antibody complex is at least about 50% in murine models. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 55 %. In some embodiments, the SC bioavailability is at least about 65%.

In some embodiments, the invention relates to a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21 forming a conjugated protein-antibody complex, such that the conjugated protein-antibody complex has a EC_{50} potency in a Glut1 Taqman assay of less than

about 5nM. In some embodiments, the EC₅₀ potency in a Glut1 Taqman assay is less than about 4nM. In some embodiments, the EC₅₀ potency in a Glut1 Taqman assay is less than about 3nM.

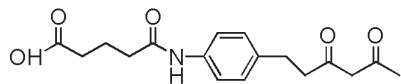
In some embodiments, the conjugated protein-antibody complex combines two or more favourable advantages, such as SC half-life, IV half-life, glucose uptake, potency, bioavailability, ease of manufacture, conjugation efficiency, *in vivo* stability, *in vitro* stability, resistance to hydrolysis, and compatibility between antibody, linker and protein.

Antibodies

The contents of US2006205670 are incorporated herein by reference- in particular paragraphs [0153]-[0233], describing antibodies, useful fragments and variants and modifications thereof, combining sites and CDRs, antibody preparation, expression, humanization, amino acid modification, glycosylation, ADCC, CDC, increasing serum half life of antibodies, expression vectors, mammalian host systems, and folding, amongst other elements of antibody technology.

“Combining site”, as used herein, (also known as the antibody binding site) refers to the region of the immunoglobulin or Ig domains that combine (or can combine) with the determinant of an appropriate antigen (or a structurally similar protein). The term generally includes the CDRs and the adjacent framework residues that are involved in antigen binding.

“Aldolase antibodies” as used herein, refers to antibodies containing combining site portions that, when unencumbered (for example by conjugation), catalyze an aldol addition reaction between an aliphatic ketone donor and an aldehyde acceptor. Aldolase antibodies are capable of being generated by immunization of an immune-responsive animal with an immunogen that includes a 1,3 diketone hapten of the formula:



coupled to a carrier protein, and further characterized by having a lysine with a reactive ε-amino group in the combining site of the antibody. Aldolase antibodies are further characterized by their catalytic activity being subject to inhibition with the 1,3-diketone hapten by formation of a complex between the 1,3-diketone hapten and the ε-amino group of the lysine of the catalytic antibody.

As discussed, in certain embodiments, certain antibodies that can be used in conjunction with compounds of the invention may require a reactive side chain in the antibody combining site. A reactive side chain may be present naturally or may be placed in an antibody by mutation. The reactive residue of the antibody combining site may be associated with the antibody, such as when the residue is encoded by nucleic acid present in the lymphoid cell first identified to make the antibody. Alternatively, the amino acid residue may arise by purposely mutating the DNA so as to encode the particular residue (e.g. WO 01/22922). The reactive residue may be a non-natural residue arising, for example, by biosynthetic incorporation using a unique codon, tRNA, and aminoacyl-tRNA as discussed herein. In another approach, the amino acid residue or its reactive functional groups (e.g., a nucleophilic amino group or sulfhydryl group) may be attached to an amino acid residue in the antibody combining site. Thus, covalent linkage with the antibody occurring "through an amino acid residue in a combining site of an antibody" as used herein means that linkage can be directly to an amino acid residue of an antibody combining site or through a chemical moiety that is linked to a side chain of an amino acid residue of an antibody combining site. In some embodiments, the amino acid is cysteine, and the reactive group of the side chain is a sulfhydryl group. In other embodiments, the amino acid residue is lysine, and the reactive group of the side chain is the ϵ -amino group. In some embodiments, the amino acid is Lys93 on the heavy chain according to Kabat numbering. In some embodiments, the amino acid is Lys-99 on HC h38C2 (SEQ ID NO:26).

Catalytic antibodies are one source of antibodies with suitable combining sites that comprise one or more reactive amino acid side chains. Such antibodies include aldolase antibodies, beta lactamase antibodies, esterase antibodies, and amidase antibodies.

One embodiment comprises an aldolase antibody such as the mouse monoclonal antibodies mAb 33F12 and mAb 38C2, as well as suitably chimeric and humanized versions of such antibodies (e.g. h38C2, SEQ ID NOs:25 and 26). Mouse mAb 38C2 (and h38C2) has a reactive lysine near to but outside HCDR3, and is the prototype of a new class of catalytic antibodies that were generated by reactive immunization and mechanistically mimic natural aldolase enzymes. See C.F. Barbas 3rd *et al.*, Science 278:2085-2092 (1997). Other aldolase catalytic antibodies that may be used include the antibodies produced by the hybridoma 85A2, having ATCC

accession number PTA-1015; hybridoma 85C7, having ATCC accession number PTA-1014; hybridoma 92F9, having ATCC accession number PTA-1017; hybridoma 93F3, having ATCC accession number PTA-823; hybridoma 84G3, having ATCC accession number PTA-824; hybridoma 84G11, having ATCC accession number PTA-1018; hybridoma 84H9, having ATCC accession number PTA-1019; hybridoma 85H6, having ATCC accession number PTA-825; hybridoma 90G8, having ATCC accession number PTA-1016. Through a reactive lysine, these antibodies catalyze aldol and retro-aldol reactions using the enamine mechanism of natural aldolases. Aldolase antibodies and methods of generating aldolase antibodies are disclosed in U.S. Patents Nos. 6,210,938, 6,368,839, 6,326,176, 6,589,766, 5,985,626, and 5,733,75, which are incorporated herein by reference.

Compounds of the invention may also be formed by linking a compound of the invention to a reactive cysteine, such as those found in the combining sites of thioesterase and esterase catalytic antibodies. Suitable thioesterase catalytic antibodies are described by K.D. Janda *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:2532-2536 (1994). Suitable esterase antibodies are described by P. Wirsching *et al.*, Science 270:1775-1782 (1995). Reactive amino acid-containing antibodies may be prepared by means well known in the art, including mutating an antibody combining site residue to encode for the reactive amino acid or chemically derivatizing an amino acid side chain in an antibody combining site with a linker that contains the reactive group.

The antibody may be a humanized antibody. Where compounds of the invention are covalently linked to the combining site of an antibody, and such antibodies are humanized, it is important that such antibodies be humanized with retention of high linking affinity for the Z group. Various forms of humanized murine aldolase antibodies are contemplated. One embodiment uses the humanized aldolase catalytic antibody h38c2 IgG1 or h38c2 Fab with human constant domains C_K and C_{Y1}1. C. Rader *et al.*, J. Mol. Bio. 332:889-899 (2003) discloses the gene sequences and vectors that may be used to produce h38c2 Fab and h38c2 IgG1. Human germline V_K gene DPK-9 and human J_K gene JK4 were used as frameworks for the humanization of the kappa light chain variable domain of m38c2, and human germline gene DP-47 and human J_H gene JH4 were used as frameworks for the humanization of the heavy chain variable domain of m38c2. Figure 1 illustrates a sequence alignment between the variable light and heavy chains in m38c2, h38c2,

and human germlines. h38c2 may utilize IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 constant domains, including any of the allotypes thereof. In certain embodiments of compounds of the invention wherein the antibody is h38c2 IgG1 with the G1m(f) allotype, Z binds to the side chain of the lysine residue at position 99 of the heavy chain. Another embodiment uses a chimeric antibody comprising the variable domains (V_L and V_H) of h38c2 (SEQ ID NOS:27 and 28) and the constant domains from an IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4. The antibody may be a full-length antibody, Fab, Fab', $F(ab')_2$, F_v , dsF_v , scF_v , V_H , V_L , diabody, or minibody comprising V_H and V_L domains from h38c2. The antibody may be an antibody comprising the V_L and V_H domains from h38c2 and a constant domain selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4. The antibody may be h38C2 IgG1 (SEQ ID NOS:25 and 26). The antibody may be a humanized version of a murine aldolase antibody comprising a constant region from a human IgG, IgA, IgM, IgD, or IgE antibody. In another embodiment, the antibody is a chimeric antibody comprising the V_L and V_H region from a murine aldolase antibody and a constant region from a human IgG, IgA, IgM, IgD, or IgE antibody. In some embodiments, the antibody comprises the V_L and V_H regions from m38C2 (SEQ ID NOS:29 and 30). In further embodiments, the antibody is a fully human version of a murine aldolase antibody comprising a polypeptide sequence from natural or native human IgG, IgA, IgM, IgD, or IgE antibody.

Various forms of humanized aldolase antibody fragments are also contemplated. One embodiment uses h38c2 $F(ab')_2$. h38c2 $F(ab')_2$ may be produced by the proteolytic digestion of h38c2 IgG1. Another embodiment uses an h38c2 scF_v comprising the V_L and V_H domains from h38c2 which are optionally connected by the intervening linker $(Gly_4Ser)_3$ (SEQ ID NO:31). As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization (or reactive immunization in the case of catalytic antibodies) of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production.

Alternatively, phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro* using immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. As indicated above, human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells, e.g., U.S. Patent Nos. 5,567,610 and 5,229,275.

Amino acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of an antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, insertions into, and/or substitutions of residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites

An antibody or antibody portion of the invention can be derivatized or linked to another molecule (e. g. another peptide or protein). In general, the antibodies or portion thereof is derivatized such that the ability of the linker to covalently conjugate to the antibody combining is not affected adversely by the derivatization or labelling. Accordingly, the antibodies and antibody portions of the invention are intended to include both intact and modified forms of the antibodies described herein. E.g. an antibody or antibody portion of the invention can be functionally linked (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody (e. g. a bispecific antibody or a diabody), a detection agent, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide that can mediate association of the antibody or antibody portion with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag).

In other embodiments, the antibody or antigen binding portion thereof of the invention may be a fusion antibody or an antibody linked to another polypeptide. In some aspects, only the variable regions of the antibody are linked to the polypeptide. In some aspects, the antibody is covalently conjugated to a peptide in such a way so as to not interfere with the binding ability of the combining site.

The polypeptide may be a therapeutic agent, such as a targeting agent, peptide, protein agonist, protein antagonist, metabolic regulator, hormone, toxin, growth factor or other regulatory protein, or may be a diagnostic agent, such as an enzyme that may be easily visualized, such as horseradish peroxidase. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent

antibody on a single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

One type of derivatized antibody is produced by crosslinking two or more antibodies (of the same type or of different types, e. g. to create bispecific antibodies). Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (e. g., m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) or homobifunctional (e. g., disuccinimidyl suberate).

Another type of derivatized antibody is a labelled antibody. Useful detection agents with which an antibody or antibody portion of the invention may be derivatized include fluorescent compounds, including fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, 5-dimethylamine-1-naphthalenesulfonyl chloride, phycoerythrin, lanthanide phosphors and the like. An antibody may also be labelled with enzymes that are useful for detection, such as horseradish peroxidase, galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, glucose oxidase and the like. When an antibody is labelled with a detectable enzyme, it is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a reaction product that can be discerned. For example, when the agent horseradish peroxidase is present, the addition of hydrogen peroxide and diaminobenzidine leads to a colored reaction product, which is detectable. An antibody may also be labelled with biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding. An antibody may be labelled with a magnetic agent, such as gadolinium. An antibody may also be labelled with a predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e. g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags). In some embodiments, labels are attached by spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance.

The antibody may also be derivatized with a chemical group such as polyethylene glycol (PEG), a methyl or ethyl group, or a carbohydrate group. These groups may be useful to improve the biological characteristics of the antibody, e.g. to increase serum half-life or to increase tissue binding.

Pharmaceutical Compositions

Another aspect of the invention provides pharmaceutical compositions comprising compositions and/or compounds of the invention. Agents comprising compositions of the invention may be formulated and administered systemically.

Techniques for formulation and administration may be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA.

For injection, compositions of the invention may be formulated in aqueous solutions, emulsions or suspensions, or nonaqueous solutions, suspensions, 5 emulsions, dispersions or sterile powders or lyophilisates suitable for reconstitution into sterile injectible solutions or dispersions. Examples of suitable aqueous and nonaqueous diluents, solvents, and carriers include water, ethanol, polyols (such as propylene glycol, polyethylene glycol, glycerol, and the like), suitable mixtures thereof, and oils. Fluidity can be maintained or improved, for example, by the use of 10 a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

Compositions of the invention may be formulated in aqueous solutions containing physiologically compatible buffers such as citrate, acetate, histidine or phosphate. Where necessary, such formulations may also contain various tonicity 15 adjusting agents, solubilizing agents and/or stabilizing agents (e.g., salts such as sodium chloride, sugars such as sucrose, mannitol, and trehalose, proteins such as albumin, amino acids such as glycine and histidine, surfactants such as polysorbates (Tweens), or cosolvents such as ethanol, polyethylene glycol and propylene glycol). Compositions of the invention may also comprise adjuvants, such as wetting agents, 20 emulsifying and suspending agents, dispersing agents, and preserving agents. Compositions of the invention may also comprise suspending agents, such as agar-agar, aluminum metahydroxide, bentonite, ethoxylated isostearyl alcohols, microcrystalline cellulose, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan esters, and tragacanth, or mixtures thereof.

25 Compositions of the invention may also comprise various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, for example, sugars, sodium chloride, and the like. Prolonged absorption of injectable compositions of the invention may be affected by the use of agents capable of delaying absorption, for 30 example, aluminum monostearate and gelatin.

Compositions of the invention may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include,

but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as L-methionine ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as sodium acetate, lactate, borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents
5 (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), DPTA), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl- beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring
10 and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin,
15 propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides -
20 preferably sodium or potassium chloride - or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants.

The formulation components may be present in concentrations that are acceptable to the site of administration. Buffers may be used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range
25 of from about 5 to about 8.

In some aspects, pharmaceutical compositions of the invention may be prepared wherein compounds of the invention are formulated for the controlled or sustained release of the compound. Examples include hyaluronic acid and the like, polymeric gels, beads, particles, injectable microspheres, liposomes, films,
30 microcapsules, sustained release matrices, and implantable drug delivery devices.

In some aspects, pharmaceutical compositions of the invention are provided in single- or multi-chambered pre-filled syringes.

In some aspects, the invention provides for a kit comprising at least one compound or composition of the invention together with at least one additional

ingredient suitable for use in a pharmaceutical composition. In some aspects, the invention provides for a kit comprising at least one compound or composition of the invention together with at least one means for delivery of said composition to a patient.

5 Compositions of the invention may be synthesized by covalently linking a FGF21 molecule to a linker and conjugating the linker to a combining site of a multivalent antibody. For example, a FGF21-linker conjugate, where the linker includes a diketone or AZD (β -lactam) reactive moiety, can be incubated with 0.5 equivalents of an aldolase antibody such as h38C2 IgG1 to produce a composition of
10 the invention.

Methods of use

For therapeutic use in humans, a human, humanized, or human chimeric antibody or antigen binding portion thereof is a preferred antibody form of the antibody portion of the compound or composition of the invention.

15 One aspect of the invention is a method for treating diabetes or a diabetes-related condition comprising administering a therapeutically effective amount of a composition of the invention to a subject suffering from diabetes or a diabetes-related condition.

Another aspect of the invention is a method for increasing insulin secretion in
20 a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for decreasing blood glucose levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

25 Another aspect of the invention is a method for treating obesity in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for controlling or reducing weight levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective
30 amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for treating dislipidemia in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for treating hypertension in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

5 Another aspect of the invention is a method for treating hepatosteatososis in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for treating cardiovascular disease in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative
10 thereof.

Another aspect of the invention is a method for reducing glucagon levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for reducing triglyceride levels in
15 a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for increasing non-esterified free fatty acid levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative
20 thereof.

Another aspect of the invention is a method for reducing low density cholesterol levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for reducing C-reactive protein
25 levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for reducing fructosamine levels in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

30 Another aspect of the invention is a method for controlling glycemic control in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for increasing levels of adipsin in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

Another aspect of the invention is a method for increasing levels HDL in a
5 subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutical derivative thereof.

In some aspects, the invention provides for a method of treating diabetes related conditions, obesity, dislipidemia, hypertension, hepatosteaotosis, or cardiovascular disease; or controlling or reducing weight levels; or controlling
10 glycemic control; or increasing insulin secretion, or levels of non-esterified free fatty acids, HDL or adipsin; or reducing levels of blood glucose, glucagon, triglyceride, fructosamine, low density cholesterol, or C-reactive protein; comprising administering a therapeutically effective amount of a compound or a pharmaceutical composition of the invention to a subject.

15 In some aspects, the invention provides for the use of a composition or a pharmaceutical composition of the invention in the preparation of a medicament for treating diabetes related conditions, obesity, dislipidemia, hypertension, hepatosteaotosis, or cardiovascular disease; or controlling or reducing weight levels; or controlling glycemic control; or increasing insulin secretion, HDL, or non-esterified
20 free fatty acid levels; or reducing levels of blood glucose, glucagon, triglyceride, fructosamine, low density cholesterol, or C-reactive protein.

The term "therapeutically effective dose," as used herein, means that amount of compound, composition or pharmaceutical composition of the invention that elicits the biological or medicinal response in a tissue system, animal, or human being
25 sought by a researcher, medical doctor, or other clinician, which includes alleviation of the symptoms of a disease or disorder being treated.

Methods of Administration and Dosages

Administration routes of composition of the invention may include parenteral delivery, including intramuscular, SC, or intramedullary injections, as well as
30 intrathecal, direct intraventricular, IV, and intraperitoneal delivery. In some embodiments, administration is intravenous. The compositions of the invention may be administered through any of the parenteral routes either by direct injection of the formulation or by infusion of a mixture of the formulation of the composition of the

invention with an infusion matrix such as normal saline, D5W, lactated Ringers solution or other commonly used infusion media.

In treating mammals, including humans, having diabetes or a diabetes-related condition (or in some aspects, one or more of the following conditions: diabetes, obesity, dislipidemia, hypertension, hepatosteatois, cardiovascular disease, high blood glucose, low insulin levels, or any of the conditions discussed herein or a condition associated with a symptom herein discussed), a therapeutically effective amount of a composition of the invention or a pharmaceutically acceptable derivative is administered. For example, a composition of the invention may be administered as a daily IV infusion from about 0.1 mg/kg body weight to about 15 mg/kg body weight. Accordingly, some embodiments provide a dose of about 0.5 mg/kg body weight. Other embodiments provide a dose of about 0.75 mg/kg body weight. Other embodiments provide a dose of about 1.0 mg/kg body weight. Other embodiments provide a dose of about 2.5 mg/kg body weight. Other embodiments provide a dose of about 5 mg/kg body weight. Other embodiments provide a dose of about 10.0 mg/kg body weight. Other embodiments provide a dose of about 15.0 mg/kg body weight. Doses of a composition of the invention or a pharmaceutically acceptable derivative should be administered in intervals of from about once per day to 2 times per week, or alternatively, from about once every week to once per month. In some embodiments, a dose is administered to achieve peak plasma concentrations of a composition of the invention according to the invention or a pharmaceutically acceptable derivative thereof from about .002 mg/ml to 30 mg/ml. This may be achieved by the sterile injection of a solution of the administered ingredients in an appropriate formulation (any suitable formulation solutions known to those skilled in the art of chemistry may be used). Desirable blood levels may be maintained by a continuous infusion of composition of the invention according to the invention as ascertained by plasma levels measured by a validated analytical methodology.

One method for administering a composition of the invention to an individual comprises administering a FGF21-linker conjugate to the individual and allowing it to form a covalent compound with a combining site of an appropriate antibody *in vivo*. The antibody portion of a composition of the invention that forms *in vivo* may be administered to the individual before, at the same time, or after administration of the FGF21-linker conjugate. Alternatively, or in addition, an antibody may be present in the circulation of the individual following immunization with an appropriate

immunogen. For example, catalytic antibodies may be generated by immunizing with a reactive intermediate of the substrate conjugated to a carrier protein. In particular, aldolase catalytic antibodies may be generated by administering with keyhole limpet hemocyanin linked to a diketone moiety.

5 The composition can therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them.
10 Appropriate dosages can be ascertained through use of appropriate dose-response data.

 The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, e.g. orally, through injection by SC, IV, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular,
15 intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions can be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

 Alternatively or additionally, the composition can be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the
20 desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device can be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule can be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

Combination Therapies

25 In another aspect of the invention, a composition of the invention may be used in combination with other therapeutic agents used to treat diabetes or diabetes-related conditions, or to increase insulin secretion or decrease blood glucose levels, or to treat any of the conditions discussed herein. In one embodiment, a composition of the invention may be administered in combination with insulin, such as for
30 example synthetic human insulin, including rapid acting, short-acting, intermediate-acting, or long-lasting insulin. In other embodiments, a composition of the invention may be administered in combination with compounds belonging to the α -glucosidase inhibitor, sulfonylurea, meglitinide, biguanide, or thiazolidinedione (TZD) families. Compositions of the invention may also be administered in combination with

metabolism-modifying proteins or peptides such as glucokinase (GK), glucokinase regulatory protein (GKRP), uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2 and UCP3), glucagon, glucagon like peptide 1 and 2 (Glp1 and Glp2), an exendin, (such as exendin-4), gastric inhibitory polypeptide (GIP), Glp2peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), leptin receptor (OB-Rb), DPP-IV inhibitors, sulfonylureas, or other incretin peptides. One of ordinary skill in the art would know of a wide variety of agents that are currently used in the treatment of diabetes or diabetes-related conditions.

In order to evaluate potential therapeutic efficacy of a composition of the invention or a pharmaceutically acceptable derivative thereof in combination with other therapeutic agents used to treat diabetes or diabetes-related conditions, increase insulin secretion, or decrease blood glucose levels, these combinations may be tested using methods known in the art. For example, the ability of a combination of a composition of the invention and another therapeutic agent to increase insulin secretion may be measured using an *in vitro* glucose-stimulated insulin secretion assay. In such an assay, pancreatic β cells are treated with various concentrations of glucose for a set period of time, and insulin levels are measured using methods known in the art, such as for example a radioimmunoassay. The effect of compositions of the invention and other therapeutic agents on insulin secretion may also be measured *in vivo*, by administering the agents directly to a subject and measuring insulin levels in bodily fluid samples at various time points. Methods for administering known therapeutic agents to a subject for use in combination therapies will be well known to clinical health care providers.

Effective dosages of composition of the invention to be administered may be determined through procedures well known to those in the art which address such parameters as biological half-life, bioavailability, and toxicity. Effective amounts of therapeutic agents to be used in combination with composition of the invention or pharmaceutically acceptable derivatives thereof are based on the recommended doses known to those skilled in the art for these agents. These recommended or known levels will preferably be lowered by 10% to 50% of the cited dosage after testing the effectiveness of these dosages in combination with a composition of the invention or a pharmaceutically acceptable derivative. It should be noted that the attending physician would know how and when to terminate, interrupt, or adjust therapy to lower dosage due to toxicity, bone marrow, liver or kidney dysfunctions or

adverse drug-drug interaction. The attending physician would also know to adjust treatment to higher levels if the clinical response is inadequate (precluding toxicity).

A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms or a prolongation of survival in a patient. The effective *in vitro* concentration of a composition of the invention may be determined by measuring the EC₅₀. Toxicity and therapeutic efficacy of such agents *in vivo* can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from these cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e. the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of RT production from infected cells compared to untreated control as determined in cell culture). Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography (HPLC).

In those embodiments wherein compositions of the invention are administered in combination with other therapeutic agents, the combined effect of the agents can be calculated by the multiple drug analysis method of Chou and Talalay (T.C. Chou and P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55 (1984)) using the equation:

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

where *CI* is the combination index, $(Dx)_1$ is the dose of drug 1 required to produce *x* percent effect alone, D_1 is the dose of drug 1 required to produce the same *x* percent effect in combination with D_2 . The values of $(Dx)_2$ and $(D)_2$ are similarly derived from

drug 2. The value of α is determined from the plot of the dose effect curve using the median effect equation:

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

where fa is the fraction affected by dose D , fu is the uninfected fraction, Dm is the dose required for 50% effect and m is the slope of the dose-effect curve. For mutually exclusive drugs (*i.e.*, similar modes of action), both drugs alone and their parallel lines in the median effect plot. Mutually nonexclusive drugs (*i.e.*, independent mode of action) will give parallel lines in the median effect plot, but in mixture will give a concave upward curve. If the agents are mutually exclusive α is 0, and if they are mutually non-exclusive, α is 1. Values obtained assuming mutual non-exclusiveness will always be slightly greater than mutually exclusive drugs. $C/$ values of <1 indicate synergy, values >1 indicate antagonism and values equal to 1 indicate additive effects. The combined drug effects may also be calculated using the CalcuSyn software package from Biosoft (Cambridge, UK).

The compounds according to the invention may be solvated, especially hydrated. Hydration may occur during manufacturing of the compounds or compositions comprising the compounds, or the hydration may occur over time due to the hygroscopic nature of the compounds. The compounds of the invention may be lyophilized.

The invention also provides for stereoisomers, tautomers, solvates, prodrugs, and pharmaceutically acceptable salts of compounds of the invention. The invention also provides for compounds according to any of the sequences disclosed herein.

SEQUENCES

SEQ ID NO:	Description	Sequence
1	FGF21 genus x1= H or absent (H/ Δ), x146= L/P.	<u>x</u> P P IPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDG <u>T</u> VGGAADQSPE SLLQL <u>K</u> AL <u>K</u> P GVIQILGV <u>K</u> T SRFLCQRP <u>D</u> G ALYGS <u>L</u> HFDP EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG N <u>K</u> SP <u>H</u> RDP <u>A</u> P RGPARFLPLP GLPPAXPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYA <u>S</u>
2	FGF21 Δ H:	H1 absent (Δ H1), P146.
3	FGF21 Cys mutant genus 1:	x1= H/ Δ , x79 = D/C, x125 = H/C, x129 = A/C, x146= P/L
4	FGF21 Cys mutant genus 2	x1= H/ Δ , x125 = C/H, x129 = A/C, x146 = L/P
5	FGF21 H125C genus:	x1 = H/ Δ , H125C, x146 = L/P
6	FGF21 Δ H-H125C-L146:	Δ H1 H125C L146
7	FGF21 Δ H-H125C:	Δ H1 H125C P146

8	FGF21 A129C genus:	x1 = H/ Δ , A129C, x146 = L/P
9	FGF21 Δ H-A129C-L146:	Δ H1, A129C, L146
10	FGF21 Δ H-A129C:	Δ H1, A129C, P146
11	FGF21 D79C genus:	x1 = H/ Δ , D79C, x146 = P/L
12	FGF21 Δ H-D79C:	Δ H1, D79C, P146
13	FGF21 Δ H-D79C-L146:	Δ H1, D79C, L146
14	FGF21 Δ H-L86C:	Δ H1, L86C, P146
15	FGF21 Δ H-T40C:	Δ H1, T40C, P146
16	FGF21 Δ H-H1C:	H1C, P146
17	FGF21 Lys mutant genus:	x1=H/ Δ , x56, x59, x122= K/R, R69, x146=L/P
18	FGF21 Δ H-K56:	Δ H1-K56-K59R-K69R-K122R-P146
19	FGF21 Δ H-K59:	Δ H1-K56R-K69R-K122R-P146
20	FGF21 Δ H-K69:	Δ H1-K56R-K59R-K122R-P146
21	FGF21 Δ H-K122:	Δ H1-K56-K59R-K69R-P146
22	FGF21 Δ H-Knull1-P2:	Δ H1-K56R-K59R-K69R-K122R-P146
23	FGF21 Δ H-Knull1-H1K:	Δ H1-H1K-K56R-K59R-K69R-K122R-P146
24	FGF21 Δ H-Knull1-S181K:	Δ H1-K56R-K59R-K69R-K122R- P146-S181K
25	h38C2 light chain	<u>ELQMTQSPSS LSASVGDRVIT</u> <u>ITCRSSQSLL</u> <u>HTYGSPLYLNW</u> <u>YLQKPGQSPK</u> <u>LLIYKVSNRF</u> <u>SGVPSRFSGS</u> <u>GSGTDFTLT</u> <u>ISLQPEDFAV</u> <u>YFC</u> <u>SGTHLP</u> <u>YTFGGGTKVE</u> <u>IKRTVAAPSV</u> <u>FIFPPSDEQL</u> <u>KSGTASVVCL</u> <u>LNNFYPREAK</u> <u>VQWKVDNALQ</u> <u>SGNSQESVTE</u> <u>QDSKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSKAD</u> <u>YEKHKVYACE</u> <u>VTHQGLSSPV</u> <u>TKSFNRGEC</u>
26	h38C2 heavy chain	<u>EVQLVESGGG</u> <u>LVQPGGSLRL</u> <u>SCAASGFTFS</u> <u>NYWMSWVRQS</u> <u>PEKGLEWVSE</u> <u>IRLRSDNYAT</u> <u>HYAESVKGRF</u> <u>TISRDNSKNT</u> <u>LYLQMNSLRA</u> <u>EDTGIYYCKT</u> <u>YFYSFSYWGQ</u> <u>GTLLVTVSSAS</u> <u>TKGPSVFPLA</u> <u>PSSKSTSGGT</u> <u>AALGCLVKDY</u> <u>FPEPVTWSN</u> <u>SGALTSGVHT</u> <u>FPAVLQSSGL</u> <u>YSLSSVTVTP</u> <u>SSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHKPSNT</u> <u>KVDKRVEPKS</u> <u>CDKTHTCP</u> <u>PPAPPELLGGPS</u> <u>VFLFPPKPKD</u> <u>TLMISRTPEV</u> <u>TCVVDVDSHE</u> <u>DPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLT</u> <u>TVLHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVY</u> <u>TLPPSREEMT</u> <u>KNQVSLTCLV</u> <u>KGFPYSDIAV</u> <u>EWESNGQPEN</u> <u>NYKTTTPVLD</u> <u>SDGSFFLYSK</u> <u>LTVDKSRWQQ</u> <u>GNVFCSSVMH</u> <u>EALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGK</u>
27	VL h38C2	
28	VH h38C2	
29	VL m38C2	
30	VH m38C2	
31	(Gly ₄ Ser) ₃	
32	FGF21 28 aa N-terminal leader sequence	
33	FGF21 209 residue sequence, P174 (P146) isoform	

SEQ ID NO:1 shows the 181-residue expressed protein where H¹ is optional and residue 146 may be L or P. Residue positions tested for conjugation are underlined and in bold. The numbering for SEQ ID NO:1 is used throughout.

The amino acid sequence of the light and heavy chain (SEQ ID NOs:25 and 26, respectively) of one embodiment of a humanized 38c2 IgG1 are also shown. The variable regions (VC and VH) are underlined and complementarity determining

regions (CDRs) presented in bold. Lysine 99, whose side chain covalently combines with the linkers described herein, is adjacent HC CDR3.

Brief Description of the Drawings

Figure 1. Amino acid sequence alignment of the variable domains of m38c2, h38c2, and human germlines. Framework regions (FR) and CDRs are defined according to Kabat *et al.* Asterisks mark differences between m38c2 and h38c2 or between h38c2 and the human germlines.

Figure 2A, 2B, and 2C. Single dose mouse pharmacokinetic studies with Ab-FGF21ΔH-A129C conjugated with Linker-1 (L-1) in comparison with L-2, L-3, or L-4. Young adult male Swiss-Webster mice were dosed either IV or SC at 3 mg/kg. In all cases, the conjugate with L-1 performed better with respect to half-life (~33 hrs SC and IV for L-1 conjugate, 13-23 hrs SC and 22-37 hrs IV for L-2, -3, and -4 conjugates) and/or SC bioavailability (~100% for L-1 conjugate, 48-53% for L-2, -3, or -4 conjugates).

Figure 3A. Single dose rat pharmacokinetic study with Ab-FGF21ΔH-A129C conjugated with L-1 in comparison with L-2. Adult male Sprague Dawley rats were dosed either IV or SC at 3 mg/kg. For both routes of administration, the conjugate with L-1 performed better than the L-2 conjugate with respect to half-life (~39 hrs SC and ~60 hrs IV for L-1 conjugate, ~33 hrs SC and ~52 hrs IV for L-2 conjugate) and SC bioavailability (~52% for L-1 conjugate, 36% for L-2 conjugate). Figure 3B. Comparison of PK of Ab-L1-FGF21ΔH-D79C, Ab-L7-FGF21ΔH-D79C, and Ab-L8-FGF21ΔH-D79C.

Figures 4A and 4B. Glucose area under the curve (AUC) during oral glucose tolerance test (OGTT) in ob/ob mice given a single SC dose (Mean Glucose AUC (% of vehicle control) in square brackets): Vehicle [100], FGF21ΔH (1 mg/kg [74]), FGF21ΔH (0.6 mg/kg [103]) (not shown in Figure 4B for clarity), Ab-FGF21ΔH-H125C (3 mg/kg [66] and 1mg/kg [87]) (conjugated with L1), Ab-FGF21ΔH-K59 (3 mg/kg [105]) (conjugated with L5), Ab-FGF21ΔH-Knull-H1K (3 mg/kg [100]) (conjugated with L5), Lean control [56]. *P<0.05, **P<0.01 vs PBS by one-way ANOVA.

Figure 5A and 5B. Cumulative body weight (A) and liver weight (B) change during OGTT in ob/ob mice given a single SC dose (mean body weight (g) in square brackets, mean liver weight (g) in curly brackets): Vehicle [2.6] {2.4}, FGF21ΔH (1 mg/kg [2.5] {2.2}), FGF21ΔH (0.6 mg/kg [3.2] {2.4}), Ab-FGF21ΔH-A129C (3

mg/kg[1.7] {2.0}) (conjugated with L1), Ab-FGF21ΔH-K59 (3 mg/kg [2.7] {2.4}) (conjugated with L5), Ab-FGF21ΔH-Knull-H1K (3 mg/kg [2.6] {2.4}) (conjugated with L5), lean control [0.6] {1.0}. *P<0.05, **P<0.01 vs PBS by two-way ANOVA (A) and one-way ANOVA (B).

5 Figure 6A. Cumulative body weight change in ob/ob mice given a single dose (mean body weight (g) in square brackets): Vehicle [1.7], FGF21ΔH [1.9], FGF21ΔH-D79C (2mg/kg [2.1]), Ab-FGF21ΔH-D79C (10mg/kg [1.4]), Ab-FGF21ΔH-H125C (10mg/kg [0.8]), and Ab-FGF21ΔH-A129C (10 mg/kg [0.9]), lean vehicle [0.6]. d0: day 0. All Ab conjugates used L1. **P<0.01 vs PBS by two-way ANOVA.

10 Figure 6B. Glucose AUC during OGTT in ob/ob mice given a single dose (mean glucose AUC % in square brackets): vehicle [100], FGF21ΔH [63], Ab-FGF21ΔH-D79C (2mg/kg [86]), FGF21ΔH-D79C (10mg/ml [54]), Ab-FGF21ΔH-H125C (10mg/ml [51]), and Ab-FGF21ΔH-A129C (10 mg/kg [54]), lean control [48]. All Ab conjugates used L1. **P<0.01 vs Vehicle by one-way ANOVA.

15 Figure 6C. Glucose AUC during OGTT in ob/ob mice dosed with FGF21ΔH and Ab-FGF21ΔH-D79C, (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-D79C was conjugated with Linker-1. **P<0.01 vs Vehicle.

 Figure 6D. Glucose AUC during OGTT in ob/ob mice dosed with FGF21ΔH and Ab-FGF21ΔH-D79C (10 mg/kg) on day 6. Ab-FGF21ΔH-D79C was conjugated
20 with L1. **P<0.01 vs ob/ob-PBS.

 Figure 6E. Glucose AUC during OGTT conducted on d6 in ob/ob mice given a single dose of Ab-FGF21ΔH-A129C on day 0, 1, 2, or 3 (3 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1. *P<0.05, ***P<0.001 vs PBS by one-way ANOVA.

 Figure 6F. A single dose of Ab-FGF21ΔH-A129C increases Ucp1 expression
25 in white adipose tissue in ob/ob mice (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1.

 Figure 6G. A single dose of Ab-FGF21ΔH-A129C decreases liver triglycerides in ob/ob mice (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1. *P<0.05, ***P<0.001 vs Vehicle by one-way ANOVA.

30 Figure 6H. Cumulative body weight change in ob/ob mice given a single dose of Ab-FGF21ΔH-A129C on day 0, 1, 2, or 3 (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1.

 Figure 7A. Repeat dose of Ab-FGF21ΔH-A129C (10 mg/kg on day 0 and 7) improves glucose tolerance in DIO mice. OGTT was conducted on day 10. Ab-

FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Vehicle by one-way ANOVA.

Figure 7B. Cumulative body weight change in DIO mice given two doses of Ab-FGF21ΔH-A129C on day 0 and 7 (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C was
5 conjugated with L1. *P<0.05, vs Vehicle by two-way ANOVA.

Figure 7C. Repeat dose of Ab-FGF21ΔH-A129C increases Ucp1 expression in white adipose tissue in DIO mice (10 mg/kg). Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1. **P<0.01 vs Vehicle by one-way ANOVA.

Figure 7D. Ab-FGF21ΔH-A129C lowers serum triglycerides in DIO mice (10
10 mg/kg). Figure 7E. Ab-FGF21ΔH-A129C lowers serum non-esterified fatty acids in DIO mice (10 mg/kg). Figure 7F. Ab-FGF21ΔH-A129C Liver weight. Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Vehicle (A, B) and vs PBC (C) by one-way ANOVA.

Figure 7G, 7H, 7i. Effect of Ab-FGF21ΔH-A129C on Hepatic Gene Expression
15 in *ob/ob* Mice. (7G) SCD1: stearyl-CoA desaturase 1, (7H) MOGAT2: monoacylglycerol acyltransferase 2 (7i) FoxA2: forkhead transcription factor A2. Ab-FGF21ΔH-A129C was conjugated with L1. **P<0.01 vs Vehicle by one-way ANOVA.

Figure 7J, 7K. Dose related serum levels of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in *ob/ob* mice (7J) dosed at 10mg/kg and (7K) dosed at 3mg/kg.

20 Figure 8A. Plasma glucose levels over the full period of the hyperinsulinemic euglycemic clamp. Figure 8B. Glucose infusion rates over the full period of the hyperinsulinemic euglycemic clamp. Figure 8C. Hepatic glucose production under basal and clamped conditions (***) = P< 0.0001).

Figures 9A-E and 9H-9P. Values represent mean ±SEM, n=5 for AB-L1-FGF21ΔH-A129C 1.5mg/kg and FGF21ΔH (control protein), n=6 for AB-L1-FGF21ΔH-A129C 0.15 mg/kg and vehicle group. For AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated groups significance at each timepoint is calculated vs. vehicle. For the FGF21ΔH group significance at each timepoint is calculated vs. baseline. Significance values are a = p<0.05, b = p<0.01, c = p<0.005 and d = p<0.001. Y axis
30 shows changes from the baseline.

Figure 9A. Effect of AB-L1-FGF21ΔH-A129C on body weight.

Figure 9B. Effect of AB-L1-FGF21ΔH-A129C on fasted plasma glucose.

Figure 9C. Effect of AB-L1-FGF21ΔH-A129C on fasted plasma insulin.

Figure 9D. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma fructosamine.

Figure 9E. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma glucagon.

Figure 9F. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on intravenous glucose tolerance test (IVGTT) Δ AUC glucose. Values represent mean Δ AUC $\pm$ SEM. For the AB-L1-FGF21 Δ H-A129C 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg treated groups statistical significance was assessed vs. vehicle by one way analysis of variance (ANOVA) with Dunnetts post test. Significance across the IVGTT timepoints vs. baseline was assessed for the FGF21 control protein group by repeated measure ANOVA with Dunnetts post test.

Figure 9G. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on IVGTT Δ AUC insulin. Values represent mean Δ AUC $\pm$ SEM. For the AB-L1-FGF21 Δ H-A129C 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg treated groups statistical significance was assessed vs. vehicle by one way ANOVA with Dunnetts post test. Significance across the IVGTT timepoints vs. baseline was assessed for the FGF21 control protein group by repeated measure ANOVA with Dunnetts post test

Figure 9H. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted total plasma cholesterol.

Figure 9i. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma triglycerides.

Figure 9J. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma free fatty acids.

Figure 9K. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma low-density lipoprotein cholesterol.

Figure 9L. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma total ketone bodies.

Figure 9M. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma adiponectin.

Figure 9N. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma C-reactive protein.

Figure 9o. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma leptin.

Figure 9P. Effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C on fasted plasma adipisin.

EXAMPLES

The versatility of the invention is illustrated by the following Examples, which illustrate typical embodiments of the invention and are not limiting of the claims or specification in any way.

Example 1 Identifying optimal tether site on FGF-21

A study was undertaken to identify the optimal site for conjugation of FGF21 via a linker to a catalytic antibody combining site. Two conjugation strategies were considered: conjugation through a surface lysine side-chain, and conjugation through a surface cysteine side-chain. Generally, globular proteins do not have unpaired cysteine residues on their surface, and thus incorporation of a single cysteine in the protein surface can be used to engineer in a single site for specific conjugation. However, the mutation of surface residues with cysteine can often cause problems such as inter-molecular dimerization, mis-pairing of native disulphide bonds, and interference with receptor binding. For these reasons, protein conjugation is most commonly affected through lysine residues.

Homology modelling of FGF21 receptor and its activation mechanism

FGF21 binds to both FGFR1c and FGFR4, but the receptor complex can be activated only through FGFR1c. Although FGFR1b and FGFR1c share 87% identity (FGFR1b is identical to FGFR1c except for the IIIb/c alternative splicing region), FGF21 specifically recognizes only FGFR1c. Here, homology modelling of the complex structure of FGF21-FGFR1c was performed by using the FGFR2-FGFR1c crystal structure as a template. MOE software was used for homology modelling and structural analyses. The activation of the receptor requires another cell-surface receptor, β Klotho. β Klotho has two domains which are very similar (~ 35% identical) to human cytosolic β -glucosidase. The human β Klotho structure was modelled by using human cytosolic β -glucosidase, and the structure in the modelled structure of FGF21-FGFR1c aligned. This modelled complex structure provided rational guidelines for the optimum lysine conjugation sites and optimum cysteine residue incorporation in FGF21, which should not interrupt the binding interfaces between FGF21 and FGFR1c and between FGF21 and β Klotho.

The following criteria were used for conjugation site selection: (1) residues should be exposed to the solvent in the structure as much as possible; (2) residues should be far from the disulphide bond; (3) residues should be far from the receptor and β -Klotho binding surfaces.

Exposure to solvent can be assessed based on the accessible surface area (ASA). Calculation of ASA from the modelled structure of FGF21 was done with CCP4 software (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". (1994) Acta Cryst. D50, 760-763) and an in-house program. Briefly the program in CCP4 calculates a value in square angstroms per residue in its log file. In order to calculate

the fraction of ASA (fASA), an in-house program was used to normalize ASA per residue. Table 1 shows residues of ASA as well as fASA. Residues whose side chain is predicted to be obscured the surface are not included. Column 1 is the amino acid name, 2 is the residue number, 3 is ASA (as square angstrom), 4 is the fraction exposed. The fASA value defines the accessibility of solvent to the amino acid residue in a given polypeptide. A fASA value close to zero indicates that the residue is predicted to be inaccessible to solvent, suggesting that it is more unlikely to be accessible to the linkers for conjugation. An absolute minimum fASA value of 0.3 was used, with surface area values >1.00 suggestive of particularly likely candidate conjugation sites.

Based on the ASA analysis, K122 (surface area of 164.4) and K59 (surface area of 117.2) were considered the most promising candidate sites for conjugation. K69 (surface area 91) and K56 (surface area 73) were also conjugated for comparative purposes.

Amino Acid	Residue Number	Surface Area	Fraction Exposed	Amino Acid	Residue Number	Surface Area	Fraction Exposed
GLY	14	105.2	1.25387	PHE	88	123	0.55083
GLN	15	158.5	0.83774	ASP	89	50.7	0.32626
VAL	16	81.5	0.50216	PRO	90	107.5	0.7424
ARG	17	91.6	0.36743	GLU	91	121.5	0.64904
ARG	19	78.6	0.31528	ARG	96	92.6	0.37144
ALA	26	93.9	0.8067	LEU	98	114	0.57576
GLN	27	126.5	0.66861	LEU	99	113.2	0.57172
GLN	28	169.4	0.89535	GLU	101	182.1	0.97276
THR	29	64.2	0.43349	ASP	102	94.6	0.60875
GLU	30	103.9	0.55502	GLY	103	56.1	0.66865
GLU	37	117.1	0.62553	GLN	108	72.6	0.38372
ASP	38	90.5	0.58237	GLU	110	132.4	0.70727
THR	40	49.8	0.33626	ALA	111	62.7	0.53866
GLY	43	38.1	0.45411	GLY	113	56.8	0.677
ALA	45	93.6	0.80412	LYS	122	164.4	0.79229
ASP	46	95	0.61133	PRO	124	67.4	0.46547
PRO	49	82.4	0.56906	HIS	125	168.4	0.84836
GLN	54	66.8	0.35307	ARG	126	131.4	0.52708
LYS	56	73	0.35181	PRO	128	91.3	0.63053
ALA	57	46.6	0.40034	ALA	129	78.8	0.67698
LEU	58	82.7	0.41768	ARG	131	225.5	0.90453
LYS	59	117.2	0.56482	GLY	132	65.8	0.78427
PRO	60	153.8	1.06215	PRO	133	84.9	0.58633
GLY	61	27.9	0.33254	ARG	135	106.2	0.42599
VAL	68	58.8	0.36229	GLY	141	30.4	0.36234

LYS	69	91	0.43855	LEU	142	69.1	0.34899
SER	71	69	0.54893	PRO	143	71.4	0.49309
ARG	77	129.4	0.51905	ALA	145	86.4	0.74227
PRO	78	98.9	0.68301	LEU	146	123.3	0.62273
ASP	79	109.8	0.70656	PRO	147	131.1	0.90539
TYR	83	84.4	0.35418	GLU	148	67.3	0.35951
LEU	86	119.4	0.60303	PRO	149	170	1.17403
HIS	87	104.8	0.52796				

Table 1 Comparison of surface residues of FGF21

Example 2 Generation of FGF21 proteins and mutants

FGF21 cDNA was purchased from ATCC. Mammalian and bacterial expression vectors were constructed by using pcDNA3.1 (Invitrogen® and pET21b (EMD), respectively. For the mutational variants of FGF21, mutations were introduced into the expression vectors using a QuikChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene®). The presence of the desired mutations was verified by DNA sequencing.

For mammalian expression, HEK293F cells (Invitrogen®) were transfected with the mammalian expression vector of FGF21 using 293fectin reagent (Invitrogen®) and grown in serum-free medium. Sterile-filtered, conditioned media were dialyzed against buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5) and loaded onto a HiTrap Q column (GE healthcare®) pre-equilibrated with buffer A. FGF21 protein was eluted with a linear gradient from buffer A to buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 100 mM NaCl). The pooled fraction was concentrated and loaded onto Sephadex 300 with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). The resulting protein solution was concentrated and stored below -80 °C. The purity was confirmed by SDS-PAGE and RP-HPLC.

For production of FGF21 Δ H from *E. coli*, the bacterial expression vector was transformed into the host strain BL21- (DE3)-RIL (Stratagene®). The transformed cells were grown in 1 liter of LB medium at 37 °C, and expression was initiated by addition of 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside. After 4 hr, cells were harvested and frozen at -20 °C. The frozen cell paste was suspended in lysis buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.5), and passed through the microfluidizer 4 times. After 30 min centrifugation at 17,000 X g, 4°C, the inclusion body (IB) containing pellet was resuspended in 50 mM Tris, pH 7.5. The washed IB slurry was centrifuged (30 min, 17,000 X g, 4°C). The IB pellet was stored at -80°C. The frozen IB pellet was solubilized with 7 M urea, 5 mM DTT and 50 mM bis-tris propane, pH 10.5 at 1

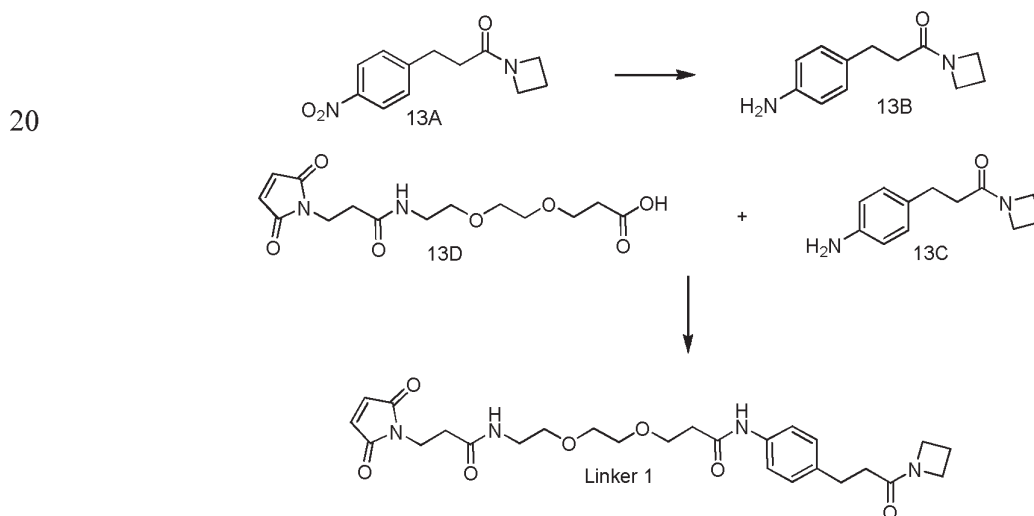
to 10 mg/ml FGF21 and stirred for 1 hr to dissolve and reduce protein. The solubilized IB was then diluted 10 times into 50 mM Bis-Tris propane, pH 8.0. Final protein concentration was 0.1 to 1 mg/mL. The solution was stirred for ~2 days and dialyzed against 4 liters of 20 mM Tris-HCl, pH7.5. The protein solution was

5 centrifuged at 14,000 X g for 30 min. The supernatant was loaded to HiTrap Q HP (GE Healthcare®) and equilibrated with buffer A (see above). Unbound bacterial proteins were washed with buffer A and FGF21 protein was eluted with a linear gradient of buffer B. The FGF21 fraction was then loaded onto a HiTrap chelating HP column (GE Healthcare®) pre-equilibrated with PBS buffer. FGF21 protein was

10 eluted with a linear gradient from PBS to PBS buffer plus 100 mM imidazole (pH was adjusted to 7.4). The fractions were collected and concentrated (up to 50 mg/mL) and the protein solution applied to a size exclusion column (Hiload 26/60, superdex 300) equilibrated with PBS (Gibco®, pH7.4). Purified protein was sterilized by 0.22 µm filter and stored at -80°. Typical yield of FGF21ΔH from 8L culture media was

15 600 ~ 700 mg. Typical purity was > 95%. Typical endotoxin level was ~ 1 EU/mg. The cysteine and lysine-to-arginine mutants of FGF21 were produced and purified in a similar manner to FGF21ΔH. A typical yield of purified protein was 350 ~ 400 mg. Free cysteine was confirmed by using Ellman's reagent.

Example 3 Synthesis of Linker 1



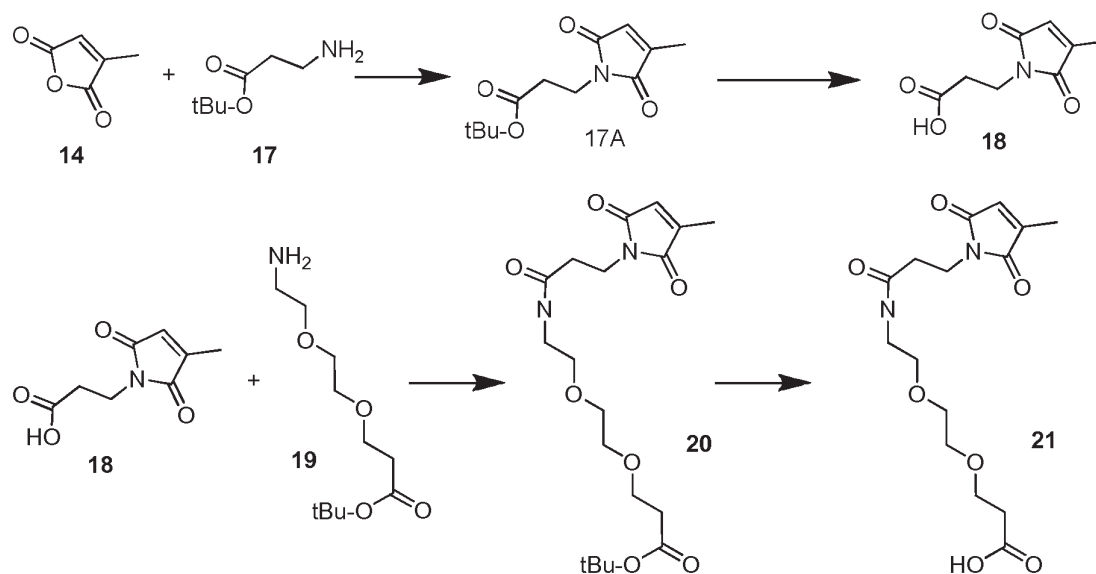
Synthesis of Linker 1: Palladium on carbon (e.g. about 1.0 g, about 0.47 mmol) was added in one portion followed by hydrochloric acid (e.g. about 2.5 mL, about 30.2 mmol) dropwise to a suspension of **13A** (e.g. about 5 g, about 20.1 mmol) in methanol (e.g. about 200 mL) at about 35 °C under an atmosphere of

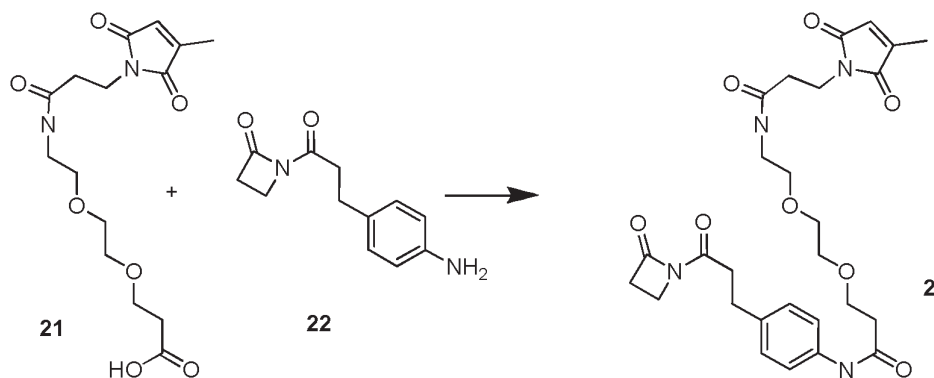
25

nitrogen. Hydrogen was slowly bubbled in to the solution at about 35 °C and the solution was stirred for approximately about 2 hrs at that temperature. The solid was filtered through a bed of celite, and collected. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the solid was dried under vacuum to give **13B** as

5 hydrochloride salt. Compound **13B** was mixed with dichloromethane (e.g. about 200 mL) and saturated solution of sodium bicarbonate (for example, about 250 mL), and the dichloromethane layer was separated. The dichloromethane layer was washed with saturated sodium chloride (e.g. about 250 mL) and dried on sodium sulphate. The organic layer was filtered, concentrated under reduced pressure and purified
10 using flash chromatography (SiO₂, about 60% ethyl acetate in hexanes) to give a yield of about 68% (e.g. about 2.94 g) of **13C**. A solution of **13C** (e.g. about 4.65 g, about 21.3 mmol), **13D** (e.g. about 7.00 g, about 21.3 mmol) N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (e.g. about 3.3 g, about 21.3 mmol), and N,N-diisopropylethylamine (e.g. about 2.75 g, about 21.3 mmol) in
15 dichloromethane (e.g. about 200 mL) at about 0 °C under nitrogen was stirred for 5 mins and at room temperature for about 4 hrs. The organic layer was washed with dilute sodium bicarbonate solution, and, saturated sodium chloride solution, concentrated under vacuum, and purified using flash chromatography (SiO₂, acetonitrile) to afford Linker 1 (e.g. about 8.25 g a yield of about 73%).

20 Example 4 Synthesis of Linker 2





A solution of citraconic anhydride, **14** (e.g. about 2.0 mg, about 16.7 mmol), β -alanine, **17** (e.g. about 1.5 g, about 16.7 mmol) in DMF (e.g. about 10 mL) was stirred at room temperature for about 5 hrs. Then reaction solution was cooled to about 0 °C and a DMF (e.g. about 10 mL) solution containing diisopropylcarbodiimide (e.g. about 2.6 mL, about 16.7 mmol) and HOBT (e.g. about 1.9 g, about 16.7 mmol) was added. Diisopropylethylamine (e.g. about 5 eq, about 83.5 mmol) was added and the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for another about 16 hrs. The reaction was poured into water, acidified with 1N HCl, and extracted with ethyl acetate (e.g. about 3x about 30 mL). The organic layer was washed with water (e.g. about 2 X about 30 mL) and brine (e.g. about 30 mL), and then dried over sodium sulphate. The solvent was removed under vacuum and the crude mixture was purified by column chromatography. The desired fractions were pooled and concentrated under reduced pressure to give **17A**.

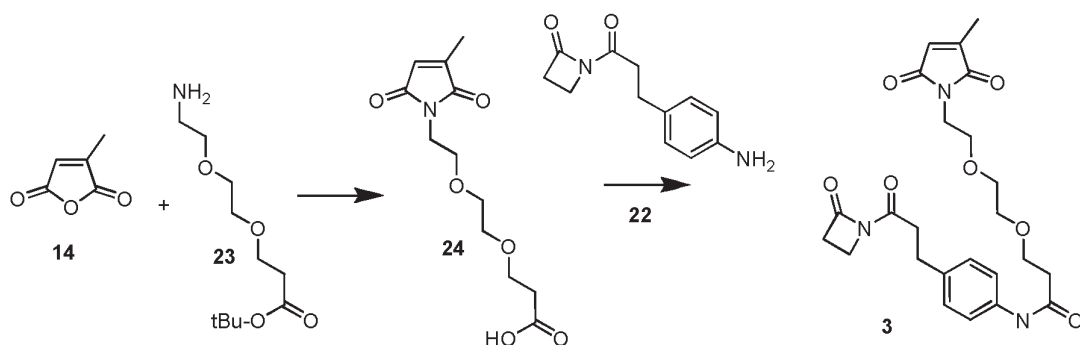
Compound **17A** (e.g. about 0.5 g, about 2.09 mmol) was stirred in about 15% trifluoroacetic acid in dichloromethane at room temperature for about 2 hrs and concentrated to dryness under reduced pressure. The free acid **18** was added to N-hydroxysuccinimide (e.g. about 0.25 g, about 2.09 mmol) in tetrahydrofuran (e.g. about 20 mL), followed by diisopropylcarbodiimide (e.g. about 0.33 mL, about 2.09 mmol) and was stirred for about 4 hrs at room temperature. Diisopropyl urea was filtered off. The filtrate was evaporated to dryness. Petroleum ether (e.g. about 30 mL) was added to the residue, triturated, shaken and the petroleum ether layer was decanted. This procedure was repeated one more time with petroleum ether and the product **18** dried under vacuum.

Amine-peg2-tbutyl ester, **19** (e.g. about 0.5 g, 2.09 mmol) was added to a THF solution of the activated **18** followed by excess DIPEA (e.g. about 3 equivalents). The solution was stirred at room temperature for a minimum of 1 hr and

purified by HPLC-MS collecting Mass of 343 and 399. The fractions containing the desired product were pooled and lyophilized to collect **20**. The residue was dissolved in about 15% trifluoroacetic acid in dichloromethane and few drops of water and stirred at room temperature for about 2 hrs. The reaction was concentrated to approximately 1 ml and treated with water precipitate the product. The crude material was purified using HPLC-MS to yield **21** (M+343).

A solution of acid **21** (e.g. about 60 mg, about 0.18 mmol), HBTU (e.g. about 137 mg, about 0.36 mmol), and aniline hydrochloride **22** (e.g. about 45 mg, about 0.18 mmol), diisopropylethylamine (e.g. about 0.14 ml, about 0.90 mmol) in DMF (e.g. about 2 mL) was stirred at room temperature for about 30 mins and purified on the HPLC-MS. The desired fraction was pooled and concentrated to collect **L2** (e.g. about 16 mg, about 0.03 mmol).

Example 5 Synthesis of Linker 3

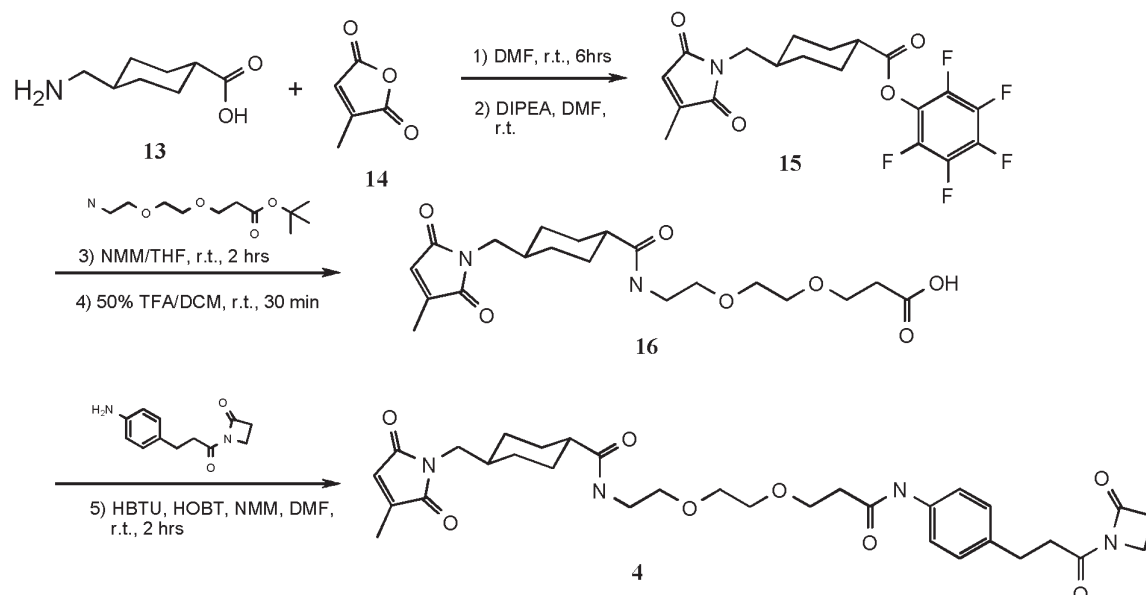


A solution of citraconic anhydride, **14** (e.g. about 0.5 g, about 16.4 mmol), amine-peg2-tbutyl ester **23** (e.g. about 1.0 g, about 4.2 mmol) in DMF (e.g. about 10 mL) was stirred at room temperature for about 2 hrs. Diisopropylcarbodiimide (e.g. about 0.8 mL, about 5.2 mmol) and HOBt (e.g. about 0.7 g, about 6.1 mmol) were added and the reaction was heated at about 80°C for about 2 hrs. The reaction was allowed to cool to room temperature overnight and the urea filtered. The filtrate was poured into water and extracted with DCM. The organic layer was washed with brine and concentrated to oil. The crude product was dissolved in about 50% 6N HCl in acetonitrile to deprotect the acid. The product was dissolved in DMF, filtered, and purified using HPLC-MS to collect **24** (e.g. about 208 mg, about 0.7 mmol).

A solution of maleimide, **24** (e.g. about 0.16 g, about 0.6 mmol) and aniline hydrochloride **22** (e.g. about 150 mg, about 0.6 mmol) in DMF was added excess HBTU and DIEA (e.g. about over 3 equivalents of each). The crude material was purified via about 2 injections on an HPLC-MS. The desired fractions containing the

purest material were pooled and lyophilized to collect **L3** (e.g. about 17.3 mg, about 36.7 mmol).

Example 6 Synthesis of Linker 4



- 5 A solution of citraconic anhydride (**14**, e.g. about 510 mg, about 4.55 mmol) and trans-4-aminomethyl cyclohexane carboxylic acid (**13**, e.g. about 716 mg, about 4.55 mmol) in dimethylformamide (e.g. about DMF, about 5 mL) under nitrogen (N_2) was stirred at room temperature for about 6 hrs. The reaction solution was cooled to about 0°C , DIPEA (e.g. about 1.98 mL, about 11.4 mmol) followed by
- 10 pentafluorophenyl trifluoroacetate (e.g. about 1.96 mL, about 11.4 mmol) in DMF (e.g. about 3 mL) were added. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for another about 16 hrs under N_2 . The solid was filtered, and the filtrate was poured into about 30 mL of water, extracted with dichloromethane (e.g. about 2x about 30 mL) and the dichloromethane layer was
- 15 dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed under vacuum and the crude mixture was purified by column chromatography to yield about 550 mg of the pentafluorophenyl ester intermediate (**15**, e.g. about 29% yield).

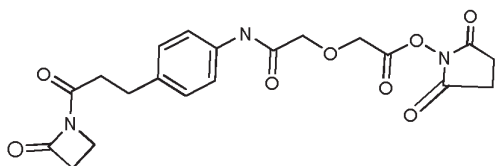
- N-Methyl morpholine (e.g. about 290 μL , about 2.64 mmol) was added to the solution of the pentafluorophenyl ester intermediate (**15**, e.g. about 550 mg, about 1.32 mmol) and 3-[2-(2-amino-ethoxy)-ethoxy]-propionic acid *tert*-butyl ester (e.g. about 295 mg, about 1.32 mmol) in tetrahydrofuran (THF, e.g. about 5 mL) and
- 20 stirred at room temperature for about 2 hrs. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in DMF and purified by preparative HPLC. The *tert*-

butyl ester intermediate obtained was treated with about 50% trifluoroacetic acid in dichloromethane (e.g. about 4mL) for about 30 mins. The solvent was removed under vacuum and the residue was purified by preparative HPLC to afford about 300 mg of the acid intermediate **16** as white solid (e.g. about 55% yield; MS: 411.2

5 (M+H⁺)).

A solution of the above acid intermediate (**16**, e.g. about 33 mg, about 0.08 mmol), 1-[3-(4-amino-phenyl)-propionyl]-azetidin-2-one (e.g. about 18 mg, about 0.08 mmol), HOBT (e.g. about 25 mg, about 0.16 mmol) and HBTU (e.g. about 61 mg, about 0.16 mmol), and N-methyl morpholine (e.g. about 44 μ L, about 0.4 mmol) in DMF (e.g. about 1 mL) was stirred at room temperature for about 2 hrs. The crude mixture was purified by preparative HPLC to afford **L4** as colourless oil (e.g. about 22 mg, 45% yield; MS: 611.4 (MH⁺)).

Example 7 Synthesis of Linker 5

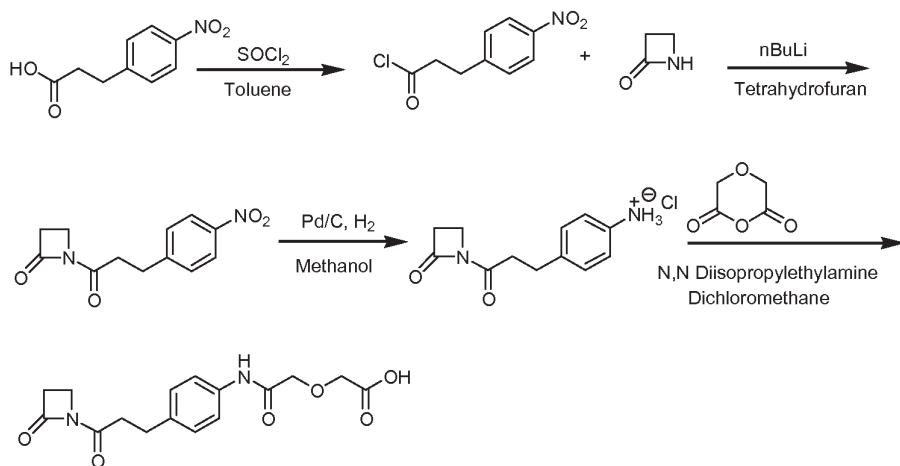


L5

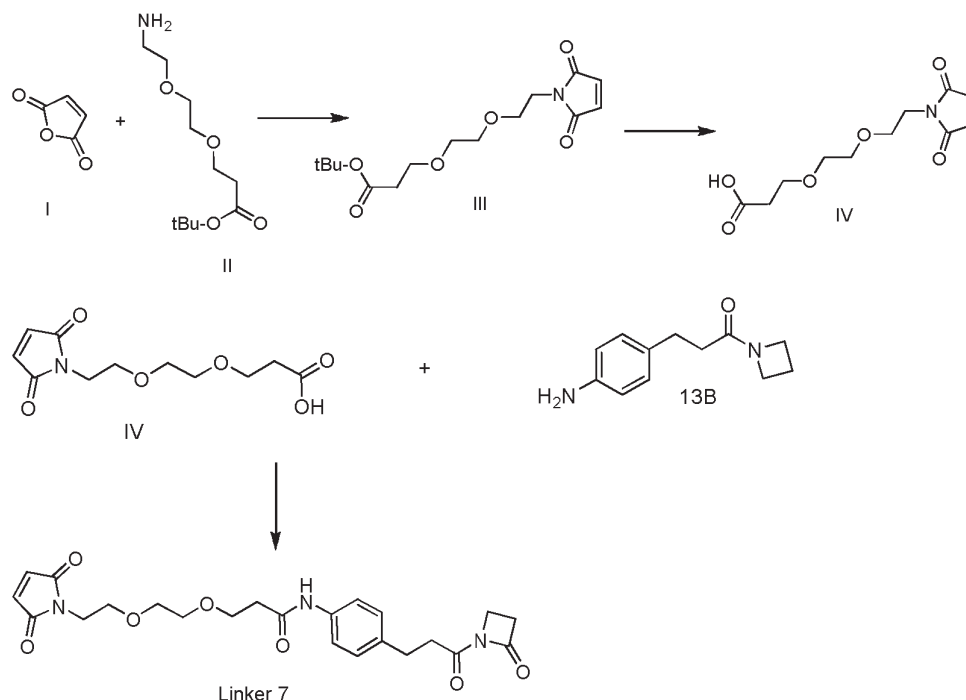
15 Diisopropyl carbodiimide (e.g. about 3.11 mL, about 19.86 mmol, about 2.95 eq) was added to a solution of Linker **6** (f e.g., about 6.63 g, about 20.69 mmol, about 3.07 eq) and N-hydroxysuccinimide (e.g. about 2.29 g, about 19.86 mmol, about 2.95 eq) in dry tetrahydrofuran (e.g. about 500 mL) at about 0°C. The mixture was stirred at about 0°C for about 1 hr and then stirred at room temperature

20 overnight. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was washed with petroleum ether (e.g. about 2 X about 200 mL) and the powder was dried under *vacuo* for about 2 hrs, and used in the subsequent steps.

Example 8 Synthesis of Linker 6



Example 9 Synthesis of Linker 7



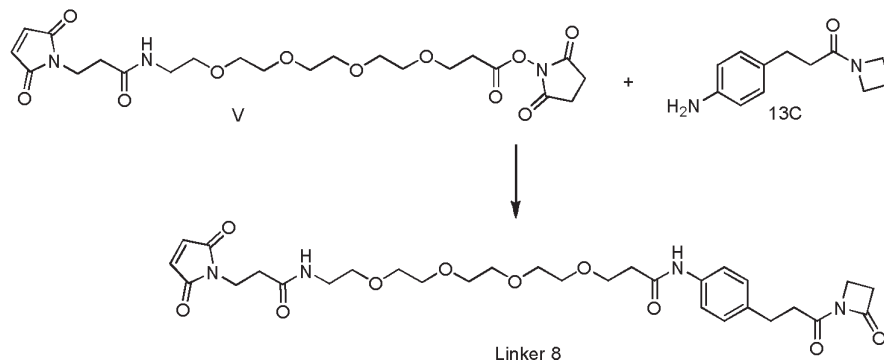
5

A solution of **I** (e.g. about 438 mg, about 4.47 mmol) and **II** (e.g. about 1.04 g, about 4.47 mmol) in diethyl formamide (e.g. about 25 mL) was stirred under an atmosphere of nitrogen for about 2.5 hrs. The reaction was cooled to about 0°C using an ice bath. 1-Hydroxypyrrolidine-2,5-dione (e.g. about 647 mg, about 5.62 mmol), and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (e.g. about 1.71 g, about 8.92 mmol) were added and stirred at about room temperature overnight. The organic layer was diluted with dichloromethane, washed with water, concentrated under reduced pressure and purified using flash chromatography (SiO₂, about 75% ethyl acetate in hexanes to about 5% methanol in dichloromethane to afford **III** (e.g. about 767 mg). A solution of **III** (e.g. about 573 mg,

15

about 1.83 mmol) in dichloromethane (e.g. about 15 mL) and trifluoroacetic acid (e.g. about 1.16 mL) was stirred for about 9.5 hrs at about room temperature. The material was concentrated under reduced pressure and dried on a vacuum pump overnight to afford **IV**. The crude **IV** was dissolved in dichloromethane (e.g. about 15 mL), and dimethyl formamide (about 2 drops) and stirred with oxalyl chloride (e.g. about 465 mg, about 3.66 mmol) for about 2 hrs. The solvent was removed under reduced pressure and the oil was dried under vacuum for 1 hr. The oil was dissolved in dichloromethane (e.g. about 15 mL) and stirred with **13B** (e.g. about 464 mg, about 1.83 mmol) and diisopropyl ethylamine (e.g. about 2.9 mL, about 16.5 mmol) under nitrogen for about 30 mins. The organic layer was washed with saturated sodium bicarbonate solution, saturated sodium chloride solution, concentrated under reduced pressure and purified using flash chromatography (SiO₂, about 85% ethyl acetate in hexanes to about 100% ethyl acetate) to afford Linker 7 (e.g. about 323 mg, about 39%).

Example 10 Synthesis of Linker 8



A solution of **V** (e.g. about 980 mg, about 1.91 mmol), **13C** (e.g. about 484 mg, about 1.91 mmol), diisopropylethylamine (e.g. about 2 mL, about 11.5 mmol) in dichloromethane was stirred for about 6 hrs at about room temperature. Another about 1 eq of **13C** (e.g. about 484 mg, about 1.91 mmol) and about 3 eq of diisopropylethylamine (e.g. about 1 mL, about 5.73 mmol) were added and stirred at about room temperature overnight. The reaction mixture was washed with saturated sodium bicarbonate solution, saturated sodium chloride solution, dried (sodium sulphate), filtered, concentrated under reduced pressure and purified using flash chromatography (about 100% ethyl acetate to about 5% methanol in ethyl acetate to about 10% methanol in ethyl acetate) to afford Linker 8 (e.g. about 285 mg, about 24%).

Example 11 Conjugation of protein and linker

FGF21 mutant proteins were reacted with the relevant linker at 1:10 molar ratio at room temperature for 2 hrs. All linker-attached FGF21 proteins were then purified using PD-10 column and buffer exchanged into 20 mM Tris-HCl, 20 mM

5 NaCl, pH 7.0.

Example 12 Conjugating protein-linker complex with antibody.

All linker-attached FGF21 proteins were fused with h38C2 IgG1 (SEQ ID NOS: 25 and 26) (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.0) at 6:1 molar ratio at room temperature for overnight. Protein-linker-antibody complexes were purified by SEC.

10 Conjugation efficiency was confirmed by LCMS analysis.

Example 13 Protein Production Assay

All FGF21 proteins were expressed in *E. coli*. Bacterially expressed FGF21 proteins were found in inclusion bodies. After lysing the cells and removal of the supernatant, the pellets were dissolved in 7 M urea, 50 mM Bis-Tris propane, pH 10.5 at 4°C. The solubilized inclusion bodies were diluted into 50 mM Bis-Tris propane, 10 mM oxidized glutathione, pH 9.0 and stirred for 2 hrs, followed by dialysis against 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 at 4°C overnight. The soluble fractions were purified by HiTrap Q column. Proteins were characterized by SDS-PAGE analysis. Expression levels of the lysine mutants were 10-50 mg/L.

20 **Example 14 Glut1 Taqman Assay**

Differentiated 3T3-L1 adipocytes were used to measure the Glut1 mRNA expression by qPCR method. Overnight serum starved day 10-14 differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with compounds for 6 hrs. Total RNA was extracted from these cells, and Glut1 and GAPDH mRNA expression was measured using a Quantitect Probe RT-PCR kit and running a quantitative real time PCR reaction in a Taqman machine (Applied Biosystems®). The bioactivity of the compounds was determined by a fold change in Glut1 mRNA levels normalized by the GAPDH mRNA levels from each sample. EC₅₀ values as measurements of the potency of the compounds were obtained from the dose response curves in the assay.

30 **Example 15 Glucose Uptake Assay**

Differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with compounds in the absence of serum for 24 hrs. Cells were then incubated with ¹⁴C-2-deoxyglucose for 1 hr and glucose uptake into the cells was quantitated in Wallac 1450 MicroBeta (Trilux) instrument. Glucose uptake was expressed in counts per min (CPM). EC₅₀ values as

measurements of the potency of the compounds were obtained from the dose response curves in the assay.

Example 16 Mouse Pharmacokinetics

The PK of FGF21 antibody conjugates were examined in mice after IV or SC administration. Antibody conjugates were injected into young adult male Swiss-Webster mice (20-25 g), and blood samples were obtained at time points from 5 mins to 120 hrs after dosing. Antibody conjugates concentrations in serum were determined using an ELISA which captured the FGF21 portion of the antibody conjugates through a monoclonal anti-hFGF21 antibody bound to a 96-well plate. FGF21 antibody conjugates bound to the plate were detected through an anti-hFc monoclonal antibody, and concentrations were determined using a standard curve of the PK dosing solution diluted into serum-containing assay buffer. SC bioavailability was calculated as the ratio of the area-under the curve (AUC) of the SC serum concentration profile divided by the AUC of the IV serum concentration profile.

Example 17 Mouse Efficacy

The efficacy of FGF21 antibodies conjugates was evaluated in two murine obese insulin resistant models – ob/ob mice and high-fat diet-induced obese mice. For both models, male mice (6-8 weeks of age for ob/ob, 12-14 weeks of age for DIO with high-fat diet initiated at 6 weeks of age) were housed 2-4/cage and FGF21 antibody conjugates were administered by SC injection. Body weight was measured daily in the morning. Glucose tolerance was assessed by oral glucose tolerance test. Briefly, mice were fasted for 4-5 hrs in the morning of the day of testing. A basal blood sample was obtained and blood glucose levels were determined using a portable glucometer. Following basal sample, glucose was administered by oral gavage, and blood samples were drawn from 15 to 120 mins thereafter. Glucose tolerance was calculated as the AUC from the basal to the 120 min time point.

Example 18 K56 Ab-L5-FGF21ΔH-K56 activity

FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R (SEQ ID NO:18) was generated and purified as described above. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R was found to be potent in the Glut1 Taqman assay ($EC_{50}=0.9\text{nM}$; $n=2$). Glucose uptake was shown to be 5.5 nM. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122R was combined with L5 at K56 and conjugated with h38C2 as described to form Ab-L5-FGF21ΔH-K56. Ab-L5-FGF21ΔH-K56 retained potency in Glut1 Taqman assay ($EC_{50}=1.9\text{nM}$; $n=1$), and showed an IV half-life of 17 hrs, and a SC half-life of 13 hrs. Bioavailability was 66%.

Example 19 K59 Ab-L5-FGF21ΔH-K59 activity

FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R (SEQ ID NO:19) was generated and purified as described. FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R was potent in the Glut1 Taqman assay (EC_{50} =0.6 nM; n=1). Glucose uptake was 0.9 nM. FGF21ΔH-K56R-K59-K69R-K122R was combined with L5 at K59 and conjugated with h38C2 to form Ab-L5-FGF21ΔH-K59. Ab-L5-FGF21ΔH-K59 retained *in vitro* potency in the Glut1 Taqman assay (EC_{50} =6.5 nM; n=2) and showed an IV half-life of 13 hrs.

Example 20 K69 Ab-L5-FGF21ΔH-K69 activity

FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R (SEQ ID NO:20) was generated and purified as described. FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R was found to be potent in both a Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =1.3 nM; n=1) and a glucose uptake assay (EC_{50} =5.2 nM). FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R was combined with L5 at K69, and conjugated with h38C2 to form Ab-L5-FGF21ΔH-K69.

Example 21 K122 Ab-L5-FGF21ΔH-K122 activity

FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 (SEQ ID NO:21) was generated and purified as described. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 was potent in both Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =2.6 nM; n=2) and glucose uptake assay (EC_{50} =1.7 nM). FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 was combined with L5 at K122, and conjugated with h38C2 to form Ab-L5-FGF21ΔH-K122. Ab-L5-FGF21ΔH-K122 retained *in vitro* potency (EC_{50} =1.6 nM in Glut1 Taqman assay; n=2) and showed an IV half-life of 16 hrs, and a SC half-life of 14 hrs. Bioavailability was 40%.

Example 22 K-null-P2 Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2 activity

FGF21ΔH-Knull-P2 (SEQ ID NO:22) was generated and purified as described. FGF21ΔH-Knull-P2 was potent in Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =1.2 nM; n=2). FGF21ΔH-Knull-P2 was combined at the N' terminus of P² with L5, and conjugated with h38C2 to form Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2 displayed reduced *in vitro* potency (EC_{50} =16.6 nM in Glut1 Taqman assay; n=1) and an IV half-life of 17 hrs.

Example 23 Knull-H1K Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K activity

FGF21ΔH-Knull-H1K (SEQ ID NO:23) was generated and purified as described. FGF21ΔH-Knull-H1K was potent in Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =6.4 nM; n=2). FGF21ΔH-Knull-H1K was combined with L5 at H1K and conjugated with h38C2 to form Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K. FGF21ΔH-Knull-H1K retained *in vitro*

potency (EC_{50} =4.3 nM in Glut1 Taqman assay; n=2), and showed an IV half-life of 16 hrs, a SC half-life of 11 hrs and SC bioavailability of 51%.

Example 24 K-null-S181K Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K activity

FGF21ΔH-Knull-S181K (SEQ ID NO:24) was generated and purified as described. FGF21ΔH-Knull-S181K was potent in Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =7.5 nM; n=2). FGF21ΔH-Knull-S181K was combined with L5 at S181K and conjugated with h38C2 to form Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K showed a loss of *in vitro* potency (EC_{50} >500 nM in Glut1 Taqman assay; n=2).

Example 25 Summary of results of activity of lysine mutants

All lysine mutant proteins were active in Glut1 Taqman assay. When conjugated, the majority of the conjugates (K56, K59, K122, Knull-H1K) retained activity in Taqman assay, with EC_{50} values similar to that of the native FGF21 protein. The Knull-P2 conjugate showed some reduction in initial potency, and Knull-S181K conjugate showed loss of activity in the Taqman assay.

Example 26 Identifying optimal tether sites on FGF21 using cysteine-maleimide conjugation

One of the challenges when introducing a cysteine substitution mutation as a linking residue is that the cysteine residue may find itself in contact with other residues, and/or form a salt bridge or hydrogen bond. Although it can be difficult to predict the atom-level distances using modelled structures, a number of residues were selected based on potential for being distally located from the FGFR1c and βKlotho binding sites: His1, Thr40, Asp79, Leu86, His125 and Ala129. All six residues are distinct to each other in terms of structural elements (turn and loop), accessible surface area (ASA), and shape of environment (convex and concave), and all were modelled on the opposite side of the protein to the FGFR1c interactions (Table 2). In particular, His1, Asp79, Leu86 and His125 were identified as being potentially attractive conjugation sites due to the high ASA values associated with these sites.

Residues	Structure	Shape	%ASA	ASA	βKlotho site
His1	disorder	N/A	N/A		
Thr40	β-strand	concave	34	49.8	less far
Asp79	β-turn	convex	71	109.8	far
Leu86	β-strand	convex	60	119.4	less far
His125	disorder	convex	85	169.4	far
Ala129	disorder	concave	68	78.8	far

Table 2 Comparison of candidate residues for cysteine substitution

Example 27 H1C FGF21 Δ H-H1C

FGF21 Δ H-H1C (SEQ ID NO:16) was generated and expressed. However, FGF21 Δ H-H1C mutants lacked the N' cysteine group, and therefore investigation of this mutant was discontinued.

5 Example 28 T40C FGF21 Δ H-T40C

Generation of FGF21 Δ H-T40C (SEQ ID NO:15) presented significant challenges. The cysteine mutation of threonine at position 40 caused multiple species of FGF21 Δ H-T40C in RP-HPLC after refolding. Further attempts were made to improve the refolding process by changing the concentration of protein and pH, with and without addition of glutathione. The refolding process was monitored by RP-HPLC. Addition of glutathione resulted in efficient refolding of T40C; however, it was found that glutathione was attached on FGF21, most likely through the introduced cysteine at position 40. The glutathione adduct showed the same biological activity as wild type FGF21 Δ H, indicating that the position 40 is not involved in the receptor activation by FGF21.

Example 29 D79C Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C activity

FGF21 Δ H-D79C (SEQ ID NO:12) was generated and purified as described. FGF21 Δ H-D79C was potent in Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =2.1nM; n=4). FGF21 Δ H-D79C was combined with L1 at D79C and conjugated with h38C2 to form Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C. Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C retained *in vitro* potency (EC_{50} =3.7nM in Glut1 Taqman assay; n=3), and showed an IV half-life of 17 and 19 hrs (n=2), a SC half-life of 20 and 20 hrs (n=2) and SC bioavailability of 55% and 70 (n=2).

Example 30 Stability assay of FGF21 Δ H-D79C

FGF21 Δ H-D79C mutant protein was produced in *E. coli* and purified as described above. FGF21 Δ H-D79C was expressed from 1 L of culture. A 150 mg inclusion body was obtained and 85 mg purified protein was obtained, representing a 60% yield. To test the stability of FGF21 Δ H-D79C as well as FGF21 Δ H (SEQ ID NO:2), freshly thawed samples were kept at 4°C over seven days, and examined for their integrity by RP-HPLC, SEC_HPLC, Ellman assay and SDS-PAGE on day 0, 3 and 7. It was found that FGF21 Δ H-D79C is stable at neutral pH 7.4: only slight amounts of FGF21 Δ H-D79C appeared oxidized and dimerized even after seven-day incubation at 4°C, while more than half of FGF21 Δ H-D79C was oxidized at lower pH 6.0 after three-day incubation at 4°C. PBS (pH7.4) and 20 mM Tris-HCl 50 mM NaCl (pH7.5) made no significant difference of stability of FGF21 Δ H-D79C.

It is not apparent why the free cysteine of FGF21 Δ H-D79C was more stable at pH 7.4 than at pH 6.0. The calculated isoelectric point (pI) of WT FGF21 was 5.43 (e.e., FGF21-H1-P146); the pI of FGF21 Δ H was 5.27; and the pI of FGF21 Δ H-D79C was 5.47. It is possible that the solubility of FGF21 Δ H-D79C may be reduced at pH6.0. The stability of FGF21 Δ H-D79C was examined upon multiple freeze/thaw cycles. The proteins were repeated to freeze (-80°C) and thaw (4°C) 9 times. Neither sample showed any difference between cycle 1 and cycles 9 in RP-HPLC, SEC and Ellman assay. In conclusion, FGF21 Δ H-D79C appeared to be significantly less stable at 4°C than at -80°C.

Example 31 L86C FGF21 Δ H-L86C

FGF21 Δ H-L86C (SEQ ID NO:14) was generated and purified as described. Although most hydrophobic residues are buried in protein cores, some residues are exposed to solvent which may cause insolubility of the protein. Leu86 is a hydrophobic residue, and appears solvent exposed in the modelled structure of FGF21. It was postulated that the mutation L86C may provide solubility benefits.

The L86C mutation resulted in inefficient refolding and low protein yield. Addition of glutathione resulted in efficient refolding of L86C; however, it was found that more than one glutathione was attached on one FGF21 molecule, most likely through the introduced C86 as well as native cysteine residues. The glutathione adduct showed approximately 10-fold reduction of biological activity, and therefore investigation of FGF21 Δ H-L86C was discontinued.

Example 32 H125C Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C activity

FGF21 Δ H-H125C (SEQ ID NO:7) was generated and purified as described. FGF21 Δ H-H125C was potent in Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =1.2 nM; n=3). FGF21 Δ H-H125C was combined with L1 and conjugated with h38C2 at H125C to form Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C. When conjugated, Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C retained *in vitro* potency (EC_{50} =3.2nM in Glut1 Taqman assay; n=4), and showed an IV half-life of 37 hrs, a SC half-life of 32 hrs and SC bioavailability of 67%.

Example 33 A129C Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C activity

FGF21 Δ H-A129C (SEQ ID NO:10) was generated and purified as described. FGF21 Δ H-A129C was potent in Glut 1 Taqman assay (EC_{50} =1.4 nM; n=6). FGF21 Δ H-A129C was combined with L1 at A129C and conjugated with h38C2 to form Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C retained *in vitro* potency (EC_{50} =2.7 nM in Glut1 Taqman assay; n=7), and showed an IV half-life of 33 hrs, a

SC half-life of 37 hrs and SC bioavailability of 69% (in mice). Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C showed an IV half-life in rat of 60 hrs, a SC half-life in rat of 39 hrs, and SC bioavailability in rat of 52%. In monkey, the IV half-life was 65 hrs, the SC half-life was 48 hrs, and the SC bioavailability was 68%.

5 **Example 34 Improvement of Endotoxin Purity**

FGF21 Δ H-H125C and FGF21 Δ H-A129C protein were produced by *E. coli* fermentation culture. To reduce endotoxin levels, an additional Q step was utilized after the first Q which reduced the endotoxin levels from 10 EU/ml $\rightarrow$ 0.1 EU/mL. The purification protocol was modified as follows. Approximately 10 g IB was obtained from 1L culture media, and solubilized with 40 mL of 7M Urea, 5 mM DTT, 50 mM BTP (Bis-tris Propane) pH10.5 (1 ~ 2 hrs). Reduction of FGF21 protein was monitored by RP-HPLC. The solubilized protein was refolded by dilution into 400 mL of 50 mM BTP, pH 8.0 (24 ~ 36 hrs). Oxidation of native disulphide bond of FGF21 was monitored by RP-HPLC. Once refolding was almost completed, the solution was dialyzed twice against 4L of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5. Unsolubilized proteins were precipitated out by centrifugation at 20,000 X g for 60 min, 4°C. The supernatant was loaded onto a Hitrap Q FF and the FGF21 protein was eluted with 0 ~ 200 mM NaCl gradient (20 CV, 20 mM Tris-HCl, 0.01 mM TCEP, pH 7.5). The collected fractions were loaded onto a Hitrap Ni-NTA FF with 0 ~ 100 mM imidazole gradient (10 CV, 0.01 mM TCEP, PBS, pH 7.4) to remove residual DNA efficiently. The desired fractions were dialyzed twice against 4L of 20 mM Tris-HCl, 0.01 mM TCEP, pH 7.5 and loaded onto a Hitrap Q HP column with 0 ~ 100 mM NaCl gradient (20 CV, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) for elution. Purified protein fractions were collected, sterilized with a 0.22 mm filter and stored at -80°.

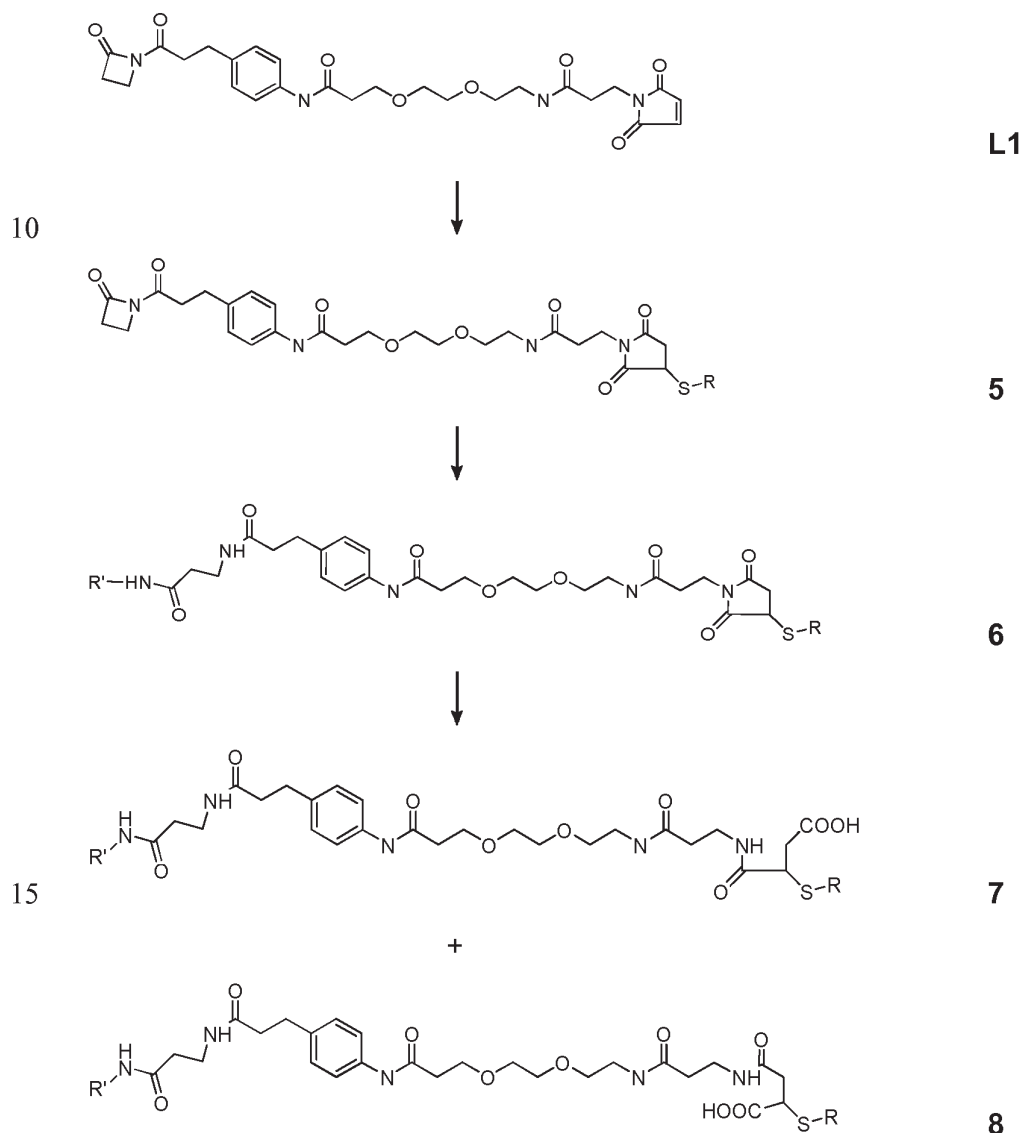
25 The typical yield from 1L culture media was about 350 to about 400 mg. The typical yield of purified protein was about 220 to about 280 mg. This purification technique yielded protein with a purity of > 95%, and a typical endotoxin level of about 1 EU/mg. Using a fermentor in place of shake flasks improved the yield about 4 to about 5 times.

30 **Example 35 Linker selection**

It is known that the maleimide ring of L1, below, may be susceptible to opening and subsequent product degradation over time (Woodnutt, G; IBC Conference "Beyond Antibodies/Protein Engineering Design", San Diego, 21-23rd September 2009).

Maleimide linker such as L1 can react with thiol to form a thiol adduct with maleimide part as shown in Scheme 1. This addition reaction of thiol to maleimide is referred as to a Michael reaction. Subsequently, a group containing amine (such as antibody h38C2) can react with AZD (β -lactam) as shown in Scheme 1 to yield **6**.

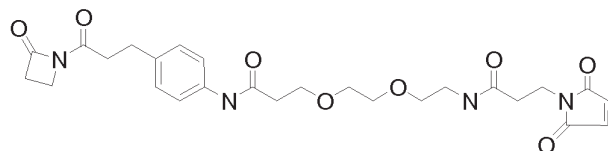
- 5 The resulting thiol-succinimide adduct is stable. However, the succinimide ring can undergo a slow hydrolytic cleavage over time resulting in **7** and / or **8**. Therefore it is desirable to have a maleimide ring with improved stability towards hydrolytic cleavage, while preserving its ability to undergo Michael reaction.



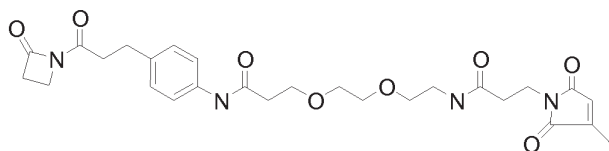
Scheme 1

Example 36 Maleimide Modification

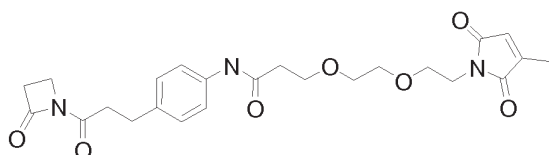
Accordingly, the stability of the maleimide ring in **L1** was examined, with the expectation that more stable linkers could be generated by modifying the maleimide ring. In order to slow the potential hydrolytic cleavage of the maleimide ring by water, three different approaches (**L2-L4**) were taken to modify the ring and improve the stability.



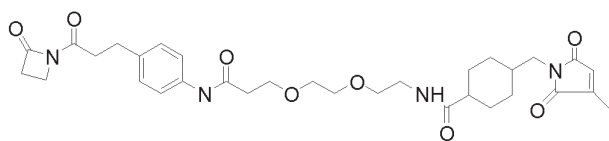
L1



L2



L3



L4

First, it was envisioned that a small alkyl group attached to the ring might slow the hydrolytic cleavage of the succinimide ring. Linker **2**, which has a methyl group on the succinimide ring, was prepared. In order for the ring to undergo hydrolytic cleavage, a water molecule adds to the carbonyl group and forms a tetrahedral intermediate as transition state. The presence of the methyl group would sterically and electronically limit the formation of the tetrahedral intermediate, and slow down the hydrolysis rate considerably.

The second modification was focused on the propionamide carbonyl group in close vicinity to the carbonyl group of the maleimide ring. Carbonyl groups in general attract water. Having a carbonyl group in close proximity to the maleimide ring helps attract water and facilitates the attack on the carbonyl group of the maleimide ring. By removing the propionamide carbonyl group, the hydrolytic ring opening reaction is slowed down. This modification was seen in **L3**.

The third modification was the introduction of a cyclohexylmethylene group in the place of propionamide group as seen in **L4**. The bulky hydrophobic nature of the cyclohexyl ring would interfere both electronically and sterically towards the

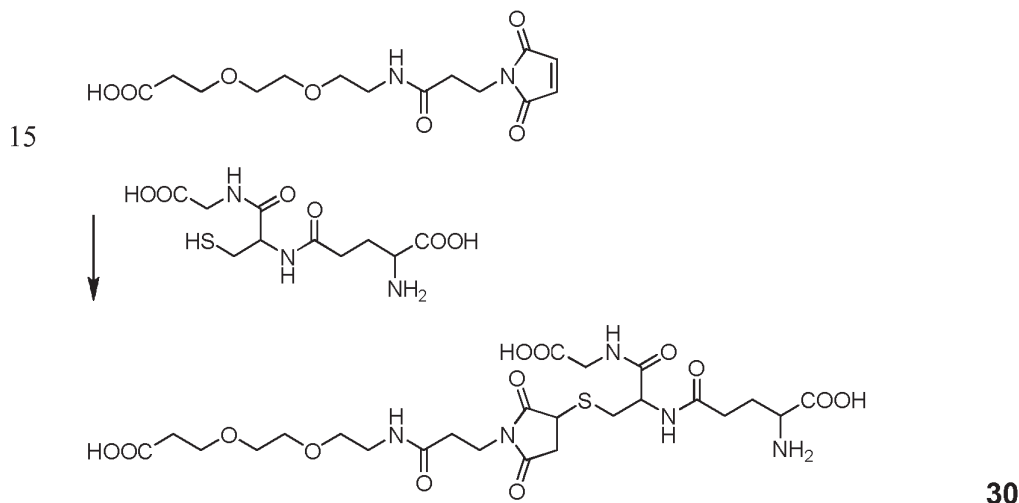
formation of a tetrahedral intermediate by the addition of water to the carbonyl group of the ring which is required for the ring opened hydrolytic cleavage. It was anticipated that this would slow down the hydrolytic cleavage.

Stability Studies

5 For the stability studies, the 1-(3-(4-aminophenyl)propanoyl)azetidin-2-one portion from linkers **L1-L4** was removed. Four test compounds were made (**30-33**) where the maleimide was conjugated with glutathione, a three amino acid peptide.

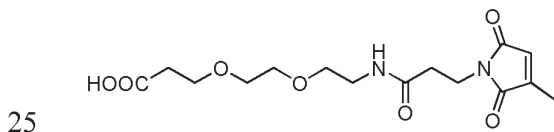
Example 37 Synthesis of compound 30

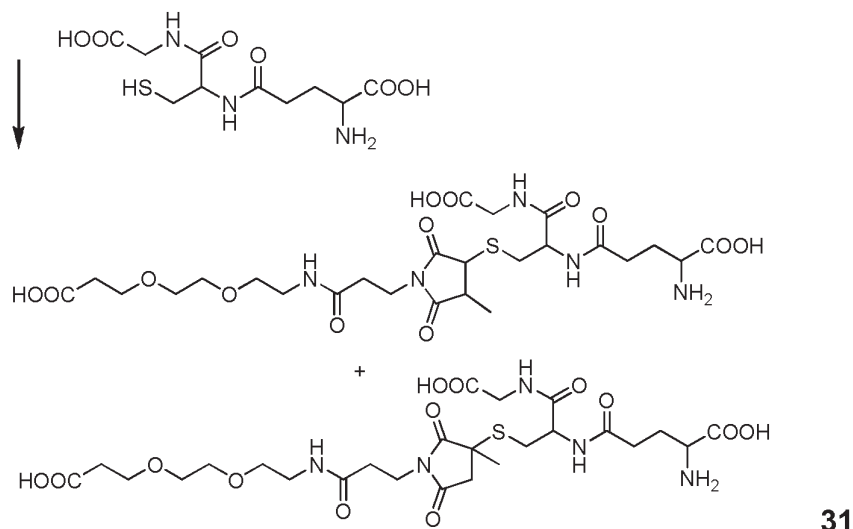
10 A solution of 3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)-ethoxy)ethoxy)propanoic acid (164 mg, 0.5 mmol) and reduced glutathione (154 mg, 0.5 mmol) in dimethylsulfoxide (5 mL) was stirred at room temperature for 17 hrs. Ethyl acetate (25 mL) was added to the reaction mixture and the solid was filtered. The solid was washed with additional 25 mL of ethyl acetate, dried to give 252 mg of compound **30**.



Example 38 Synthesis of compound 31

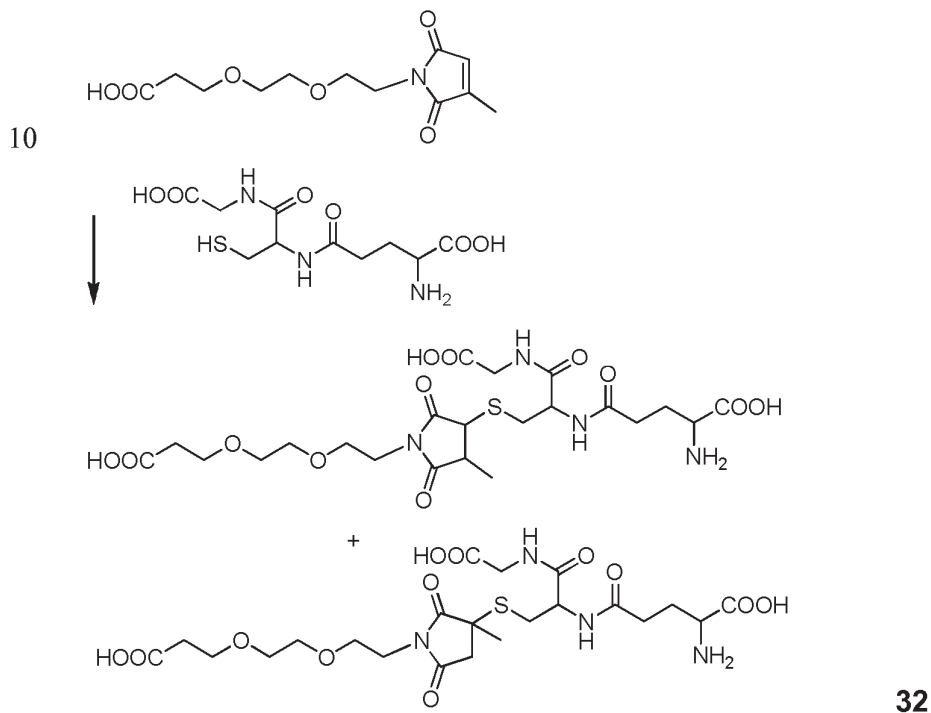
20 A solution of 3-(2-(2-(3-(3-methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethoxy)ethoxy)propanoic acid (42 mg, 0.12 mmol) and reduced glutathione (37 mg, 0.12 mmol) in dimethylsulfoxide (1.2 mL) was stirred at room temperature for 22 hrs. 50% Ethyl acetate in ether (10 mL) was added to the reaction mixture and the solid was filtered. The solid was washed with additional 25 mL of ethyl acetate, dried to give 67 mg of compound **31**.





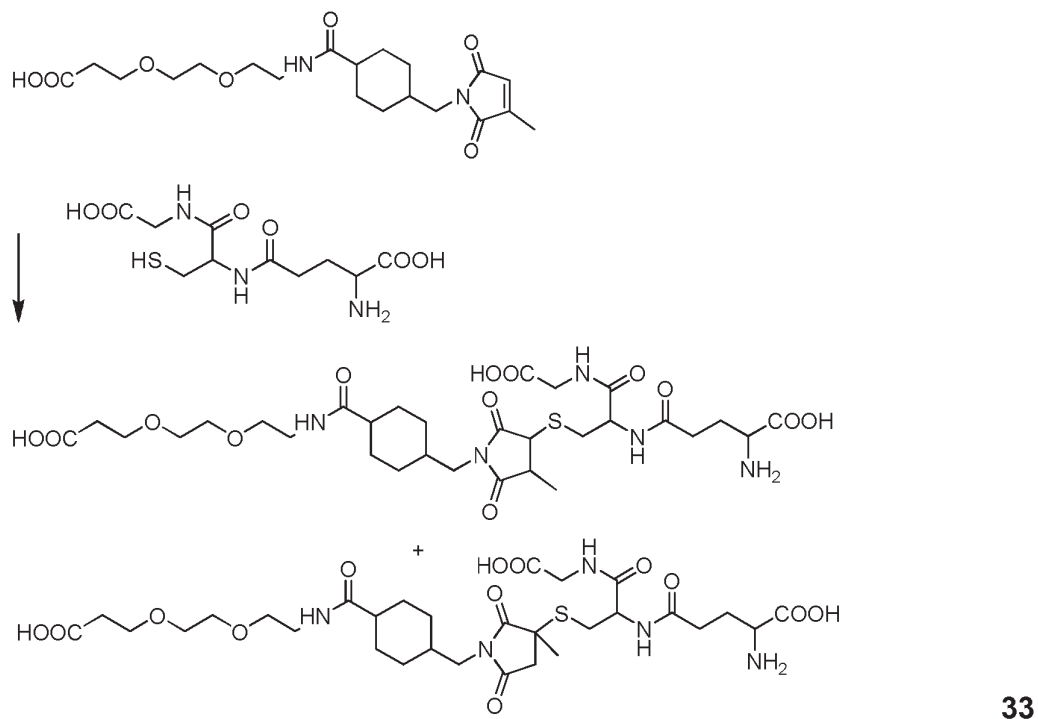
Example 39 Synthesis of compound 32

A solution of 3-(2-(2-(3-methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)propanoic acid (50 mg, 0.2 mmol) and reduced glutathione (61 mg, 0.2 mmol) in dimethylsulfoxide (2 mL) was stirred at room temperature for 25 hrs. 65% Ethyl acetate in ether (30 mL) was added to the reaction mixture and the solid was filtered. The solid was washed with additional 25 mL of ethyl acetate, dried to give 92 mg of compound **32**.

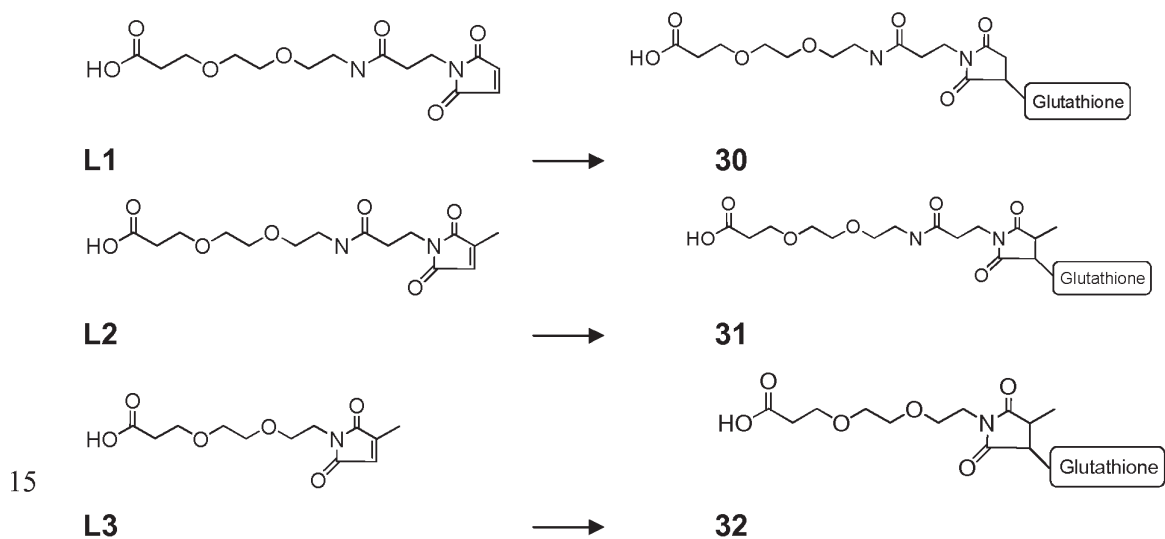


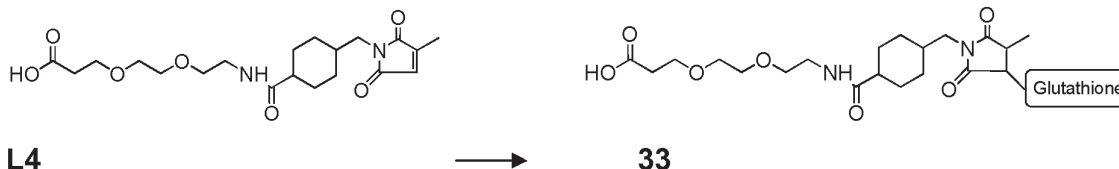
Example 40 Synthesis of compound 33

A solution of 3-(2-(2-(4-((3-methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)methyl)cyclohexanecarboxamido)ethoxy)ethoxy)propanoic acid (50 mg, 0.12 mmol) and reduced glutathione (37 mg, 0.12 mmol) in dimethylsulfoxide (1.2 mL) was stirred at room temperature for 22 hrs. 50% Ethyl acetate in ether (10 mL) was added to the reaction mixture and the solid was filtered. The solid was washed with additional 25 mL of ethyl acetate, dried to give 75 mg of compound **33**.



Example 41 Stability study of Compounds 30-33





Compounds **30**, **31**, **32**, and **33** were monitored on LC-MS for formation of the ring-opened products as well as glutathione cleavage. These new analogs were examined for their stability at pH = 6.5 buffer at 40 °C, at pH=7.5 buffer at 40 °C, and at pH=7.5 buffer at 4 °C, all over a two-week period (Tables 3A-C).

Compounds **30**, **31**, **32**, and **33** were dissolved in a buffer at room temperature. The samples were incubated at 40 °C and the buffer solution was analyzed at the set intervals. At defined intervals, 10 µL of the buffer solution was injected on Agilent high performance liquid chromatography and mass spectrometer for analysis. The eluents from the column were monitored using UV spectrometer at 210 and 254 nm and also using mass spectrometer. The hydrolysis by-products were monitored using mass spectrometer and the percentage hydrolysis was calculated based on the total ion current of a particular mass.

It was evident from the LC-MS data showing % hydrolysis in Tables 3A-3C that the modified maleimide rings of L2, L3 and L4 (31-33) were 5-10 times more stable at pH = 6.5 at 40 °C compared to maleimide ring in L1 (30), 4-15 times more stable at pH=7.5 buffer at 40 °C, and up to 20 times more stable at pH=7.5 buffer at 40 °C. The results of the glutathione conjugations (including the data in Tables 3A, 3B and 3C) were discussed at the IBC Conference "Beyond Antibodies/Protein Engineering Design", San Diego, 21-23rd September 2009.

	Cmpd #	0 hr %	1 hr %	5 hr %	24 hr %	48 hr %	72 hr %	96 hr %	120 hr %	168 hr %	192 hr %
L1	30	0.0	0.4	0.6	4.9	11.6	14.8	18.3	17.0	25.0	25.9
L2	31	0.1	0.1	0.3	0.8	1.8	2.6	3.0	3.1	5.0	5.1
L3	32	0.0	0.1	0.3	0.9	1.7	2.4	2.8	4.2	4.6	4.9
L4	33	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.6	0.6	0.3	1.1	1.1

Table 3A Stability Studies at 40 °C, pH = 6.5 (10 mM His, 130 mM Gly, 130 mM Suc buffer).

	Cm pd #	0 hr %	1 hr %	5 hr %	24 hr %	48 hr %	72 hr %	96 hr %	120 hr %	144 hr %	168 hr %	264 hr %	336 hr %
L1	30	0.1	0.3	2.0	10.0	15.0	29.0						
L2	31	0.1	0.2	0.6	3.2	4.6	7.1	8.2	9.4	12.	12.	13.	15.

										6	2	1	0
L3	32	0.1	0.1	0.1	1.0	1.1	2.2	2.8	3.3	3.3	3.9	4.4	5.0
L4	33	0.1	0.2	0.3	0.6	1.8	2.8	3.0	4.3	4.1	4.7	6.5	8.8

Table 3B Stability Studies at 40 °C, pH = 7.5 (100 mM His, 200 mM Gly, 200 mM Suc).

	Cm pd #	0 hr %	1 hr %	5 hr %	24 hr %	48 hr %	72 hr %	96 hr %	120 hr %	144 hr %	168 hr %	264 hr %	336 hr %
L1	30	0.1	0.1	0.1	0.7	2.0	2.2	4.4	5.5	6.9	7.5	8.7	12.2
L2	31	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.4	0.3	0.6	0.7
L3	32	0.1	0.1	0.0	0.2	0.3	0.3	0.4	0.6	0.6	0.7	1.1	1.3
L4	33	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.5	0.6

Table 3C Stability Studies at 4 °C, pH = 7.5 (100 mM His, 200 mM Gly, 200 mM Suc).

5 **Example 42 Stability of Linkers L1-L4 conjugated to FGF21**

The following experiment was performed to investigate the chemical stability over 2 weeks of the four linkers upon conjugation to FGF21: each linker was conjugated to FGF21, placed at +4°C storage conditions, and aliquots were removed and quenched by freezing at specific time points, and linker stability was monitored by LCMS analysis.

The four linkers were dissolved in DMSO from lyophilized stock material. FGF21 Δ H-A129C protein was partially reduced with 0.1mM TCEP for 30 min prior to addition of the linker stock at a 1:1 linker: protein ratio; FGF21 Δ H-A129C protein concentration in the conjugation reaction was 5 mg/ml. L1 was reacted with protein for 30 mins; L2, L3 and L4 were reacted for 2 hrs. The conjugation reaction was quenched by removal of excess linkers through size-exclusion resin. Conjugated FGF21 Δ H-A129C protein was placed at +4°C for stability storage. Aliquots were removed at t=0 (prior to stability storage) and at t=1, 3, 8, and 14 days. Analysis of linker stability was performed by LC-MS analysis to determine the relative amount of unconjugated protein, protein + linker conjugation, and single and double hydrolysis events of the conjugated protein + linker.

Linker hydrolysis is the critical analytical variable in this experiment. Hydrolysis was monitored by observing the subsequent addition of H₂O to the FGF21-linker complex. A single addition of H₂O, +(1) H₂O, likely indicates the hydrolysis of the active AZD group that is present on all 4 linkers. The addition of a second H₂O molecule, +(2) H₂O, is a strong indicator of hydrolysis (eg- chemical

instability) in the linker. L1 is particularly susceptible because of the presence of a maleimide functional group.

The experimental results in Table 4 below demonstrate that L1 undergoes the largest increase in +(2) H₂O. At t=0, each of L1-L4 had a measured value of +(2) H₂O between 6-8% of the total measured protein. During the 2 weeks these samples were monitored, the +(2) H₂O observed in L1 had increased to 18% while the value for each of the remaining linkers L2-L4 was constant at 6-8%. This data suggests that L1 is relatively unstable compared to L2-L4.

Linker	Time (hrs)	0 linker	1 linker	+(1) H ₂ O	+ (2) H ₂ O
L1	0	13	49	30	8
L1	24	14	41	34	11
L1	72	14	40	35	11
L1	168	10	33	40	18
L1	336	12	28	41	18
L2	0	22	45	27	6
L2	24	23	43	26	8
L2	72	24	37	32	8
L2	168	24	40	29	7
L2	336	26	38	28	8
L3	0	19	45	30	6
L3	24	18	47	27	8
L3	72	19	43	30	8
L3	168	19	43	29	8
L3	336	20	43	29	8
L4	0	20	46	28	6
L4	24	20	46	27	7
L4	72	21	42	30	7
L4	168	21	41	32	6
L4	336	22	41	31	6

Table 4 Hydrolysis analysis of L1-L4 conjugated with FGF21

10 **Example 43 Ab-FGF21 Δ H-A129C conjugated with L1-L4**

L2-L4 had previously been shown to be more stable than L1 with glutathione conjugations under various conditions (see Tables 3A-C) and FGF21 (Table 4). The modified maleimide linkers L2-L4 were fused to FGF21 Δ H-A129C (conjugation efficiencies shown in Table 5), and showed activity in the Glut1 Taqman assay
15 (Table 5): EC₅₀ values are normalized against the relative value for FGF21 Δ H).

Linker	[Compound]	FGF21-Linker conjugation	FGF21-Linker-Ab conjugation	Glut1 Taqman activity EC ₅₀ (nM) Relative to FGF21ΔH
L1	30	95%	95%	1.68
L2	31	67%	95%	1.00
L3	32	87%	89%	0.35
L4	33	90%	94%	2.71

Table 5 Conjugation efficiencies of L1-L4

However, despite the foregoing, Ab-L2-FGF21ΔH-A129C, Ab-L3-FGF21ΔH-A129C, Ab-L4-FGF21ΔH-A129C were each less stable *in vivo* than Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. This was evident as lower sustained levels in the circulation after IV dosing, and lower peak and sustained levels in the circulation after SC dosing (Figures 2A-C, Table 6). Surprisingly, these results ran counter to the results of the stability studies conducted with the linkers fused to a small peptide in buffer systems.

Cmpd	T1/2 (hr)		AUC (hr*ug/ml)		SC Bioavailability (%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21ΔH-A129C	33	33	491	511	~100
Ab-L2-FGF21ΔH-A129C	37	23	314	165	53
Ab-L3-FGF21ΔH-A129C	32	13	254	129	51
Ab-L4-FGF21ΔH-A129C	22	14	219	106	48

Table 6 Mouse PK parameters of FGF21 conjugates with L1, L2, L3, and L4

following IV and SC administration at 3 mg/kg

These results were borne out in an additional study in mouse serum. FGF21ΔH-A129C was conjugated to h38C2 using each of L1, L2, L3 and L4. Each sample was diluted in mouse serum to 0.3 mg/ml and incubated at 37°C before freezing, followed by subsequent analysis by 2DLC/MS. Compared against a reference standard, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C was detected at 149% after 5 mins, 66% after 34 hrs, 81% after 72 hrs, and was undetectable by 120 hrs. In contrast, Ab-L2-FGF21ΔH-A129C, Ab-L3-FGF21ΔH-A129C, Ab-L4-FGF21ΔH-A129C were undetectable in all samples.

Example 44 Rat study of Ab-FGF21ΔH-A129C conjugated with L1 & L2

Single dose pharmacokinetics (PK) of two versions of Ab-FGF21ΔH-A129C differing by the linker used to conjugate the FGF21 protein to the antibody scaffold were determined in male Sprague Dawley rats. Rats were dosed IV or SC (3 mg/kg) with either Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (maleimide linker) or Ab-L2-FGF21ΔH-A129C (methyl maleimide linker), and blood samples were drawn at intervals from 5 mins to 14 days post dose. Serum Ab-FGF21ΔH-A129C levels were determined by ELISA, in which the FGF21 conjugate was captured via a monoclonal antibody specific for

FGF21 and detected by anti-human Fc. The resulting PK data demonstrated that the Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C conjugate had superior PK characteristics ($T_{1/2}$: IV = 60 hrs, SC = 38 hrs; SC bioavailability = 52%) in comparison with the Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C conjugate ($T_{1/2}$: IV = 52 hrs, SC = 33 hrs; SC bioavailability = 36%), (Figure 3A and Table 7). These results were not anticipated given the results of stability studies conducted in buffer systems with these linkers fused to a small peptide.

Cmpd	T1/2 (hr)		AUC (hr*ug/ml)		SC Bioavailability (%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C	60	38	1382	717	52
Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C	52	33	419	152	36

Table 7 Rat PK parameters of FGF21 conjugates with L1 and L2 following IV and SC administration at 3 mg/kg (for Fig 3A)

Example 45 Effect of Ab-FGF21 Δ H-A129C with L1 and L2 on Glut1 RNA

3T3-L1 adipocytes were seeded at day 8 in 24-well tissue culture plates (Falcon®, Cat#353047), and incubated in DMEM complete medium (10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% P/S) at 37°C, 5% CO₂. The cells were starved (day 12) with serum-free DMEM medium with 0.2% BSA overnight and treated with Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C and Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C in serum-free DMEM containing 0.2% BSA at 37°C for 6 hrs. The medium was aspirated, and then RNA extracted from the cells using the RNeasy mini Kit according to the manufacturer's instructions. RNA was measured at A260nm using the Spectramax® Plus spectrophotometer.

Compound	Glut1 RNA expression EC50 (nM)
FGF21 Δ H	3.39
FGF21 Δ H-A129C	16.03
Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C	1.72
Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C	9.33

Table 8 Taqman quantitative real-time PCR

Stimulation of 3T3-L1 adipocytes by FGF21 Δ H, FGF21 Δ H-A129C, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C, and Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C resulted in dose-dependent *Glut1* induction. Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C appeared to be more potent than Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C (Table 8).

Example 46 Linker length study

Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C, Ab-L7-FGF21 Δ H-D79C, and Ab-L8-FGF21 Δ H-D79C were tested against each other to assess the tolerance of linker length. All showed similar PK (Figure 3B and Table 9) and comparable potency (data not shown) in cell-based assays.

Cmpd	IV T _{1/2} (hr)	IV AUC (hr*ug/ml)
Ab-L1-FGF21ΔH-D79C	19	176
Ab-L7-FGF21ΔH-D79C	27	183
Ab-L8-FGF21ΔH-D79C	15	248

Table 9. Mouse PK parameters of FGF21 conjugates with L1, L7, and L8 linkers following IV administration at 3 mg/kg (for Fig 3B)

Example 47 Summary of residue positions and linker selection

H1C, T40C, D79C, L86C, H125C and A129C were tested as potential conjugation sites using a thiol-maleimide conjugation strategy. Of these, H1C, T40C and L86C showed problems with expression and refolding. D79C, H125C and A129C were explored further as all showed acceptable levels of protein production and demonstrated that the unconjugated mutant protein remained potent. Ab-FGF21ΔH-D79C, Ab-FGF21ΔH-H125C, and Ab-FGF21ΔH-A129C showed similar bioactivity as FGF21ΔH, suggesting that conjugating the antibody at these locations does not interfere the receptor binding. D79C, H125C and A129C have similar stability and bioactivity as FGF21ΔH.

All lysine mutant antibody conjugates tested showed inferior mouse PK to the H125C and A129C antibody conjugates, with IV half-lives of 13-17 hrs (Table 10).

	Protein yield of fermentation (mg/L)	Glucose uptake EC ₅₀ (nM)	Glut1 Taqman unconjugated Protein EC ₅₀ (nM)	Glut1 Taqman Conjugate EC ₅₀ (nM)	IV T _{1/2} (hr)	SC T _{1/2} (hr)	% SC BioAv	GTT* (%AUC of Ctrl)
FGF21ΔH**		12 (12)	2.3 (7)	N/A	0.4	0.5	96	67
K56	10-50	5.5	0.9 (2)	1.9 (1)	17	13	66	100
K59	10-50	0.9	0.6 (1)	6.5 (2)	13	ND	N/A	100
K69	10-50	5.2	1.3 (1)	ND	ND	ND	ND	ND
K122	10-50	1.7	2.6 (2)	1.6 (2)	16	14	40	100
Knull-P2	10-50	ND	1.2 (2)	16.6 (1)	17	ND	N/A	100
Knull-H1K	10-50	ND	6.4 (2)	4.3 (2)	16	11	51	99
Knull-S181K	10-50	ND	7.5 (2)	>500 (2)	ND	ND	ND	ND
D79C		9.9	2.1 (4)	3.7 (3)	17, 19	20, 17	55, 70	54
L86C		62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H125C		0.65	1.2 (3)	3.2 (4)	37	32	67	48, 66
A129C		5.7	1.4 (6)	2.7 (7)	28, 33	37, 33	69, 100	64, 67, 72

Table 10 Summary of conjugation sites on FGF21. *3 days after a single SC dose of 3 mg/kg, except 10 mg/kg for D79C and 1 mg/kg Qd for FGF21dH. **protein; ND: not determined

Although Ala129 was not highly exposed to the solvent, and is less so than D79 or H125, FGF21ΔH-A129C was surprisingly one of the most stable mutants and

the best position tested for antibody conjugation. This was unexpected as the mutation is non-conservative. Although not wishing to be bound by theory, there are several possible reasons for the unique suitability of conjugating at A129C. First; Ala129, as well as His125, are both located in the loop region which is flexible in the modelled structure of FGF21. These regions are usually heparin binding sites for other heparin binding FGF members. Since FGF19, FGF21 and FGF23 do not interact with heparin, maintaining sequence fidelity of this region may not be critical for their biological function. The flexibility of the position may be beneficial for antibody-conjugation to avoid interference of receptor binding. Second; Ala129 is surrounded by positively charged residues, namely His125, Arg126, Arg131, and Arg135. This positively charged patch may avoid the SS-dimerization of FGF21 Δ H-A129C due to the strong charged repulsion. Third; these charged residues may favour the stabilization of the maleimide linker L1, which in their absence, may generate a carboxylate after ring-opening of maleimide. Thus, when conjugating FGF21 using a maleimide linkage strategy, linking at the specific residue position of A129 appears to be particularly advantageous.

Ab-L1- FGF21 Δ H-A129C and Ab-L1- FGF21 Δ H-H125C both show high IV half-lives and SC half-lives of at least 30 hrs in murine models as well as good bioavailability. Both conjugates demonstrate potency below 4nM in the Glut1 Taqman assay. In general, Ab-L1- FGF21 Δ H-A129C shows slightly improved half-life and potency compared to Ab-L1- FGF21 Δ H-H125C. Use of L1 in Ab-L1- FGF21 Δ H-A129C also showed surprising *in vivo* advantages over what *in vitro* tests suggested, and appeared overall the most advantageous linker compared with those tested.

The specific combination of the components of Ab-L1- FGF21 Δ H-A129C, (antibody, linker, linking residue position, linking residue, protein) appear to provide the optimum in half-life, bioavailability, potency, activity, ease of production, and resistance to hydrolysis compared with multiple alternatives.

Example 48 Efficacy of compounds

Glucose tolerance was tested for in ob/ob mice treated with compounds Ab-FGF21 Δ H-K56 and Ab-FGF21 Δ H-Knull-H1K. Both compounds compared poorly against Ab-FGF21 Δ H-H125C (Figure 4A and 4B) and Ab-FGF21 Δ H-A129C (Figure 5A and 5B). In contrast, Ab-FGF21 Δ H-D79C and Ab-FGF21 Δ H-H125C were shown to improve glucose tolerance and reduce body weight gain (Figures 4A, 4B, 6A, 6B, 6C, 6D, and Table 11).

Treatment	Mean Glucose AUC (% of vehicle control)
Vehicle	100
FGF21ΔH 1 mg/kg QD	61
Ab-FGF21ΔH-D79C, day 0 & 3	53
Ab-FGF21ΔH-D79C, day 3	53
Ab-FGF21ΔH-D79C, day 5	87
Ab-FGF21ΔH-D79C, day 6	67
Lean control (vehicle)	41

Table 11 Glucose AUC during the OGTT conducted on day 6 after SC injection of Ab-FGF21ΔH-D79C at 10 mg/kg at indicated time in ob/ob mice (see Figures 6C and 6D)

Ab-FGF21ΔH-A129C was found to improve glucose tolerance, and reduced body weight gain, due to increased energy expenditure evidenced by increased *Ucp1* expression in white adipose tissue (WAT), and reverses hepatic steatosis in ob/ob mice (Figures 6E, 6F, 6G, 6H and Table 12). For *Ucp1* expression, frozen visceral WAT samples collected from the *in vivo* efficacy studies were homogenized. Total RNA was extracted from the tissue homogenates, and Glut1 and GAPDH mRNA expression was measured using a Quantitect Probe RT-PCR kit and running a quantitative real time PCR reaction in a Taqman machine (Applied Biosystems). The effect of treatment was determined by a fold change in Glut1 mRNA levels normalized by the GAPDH mRNA levels from each sample. Ab-FGF21ΔH-A129C caused body weight loss due to increased energy expenditure as suggested by increased *Ucp1* expression in WAT, reduced serum triglycerides and fatty acid levels in DIO mice and decreased liver weight (Figures 7A, 7B, 7C, 7D, 7E, and Table 13). A reduction in liver weight was also observed in ob/ob mice (Figure 7F and Table 14). Further tests in ob/ob mice demonstrated a reduction in RNA levels of stearoyl-coenzyme A desaturase-1 (SCD1), monoacylglycerol O-acyltransferase (MOGAT2), and forkhead box A2 (FoxA2), (Figures 7G, 7H and 7i and Table 15).

Treatment	Glucose AUC during OGTT 3 mg/kg.	UCP1 mRNA expression in WAT 10 mg/kg.	Triglycerides content in liver 10 mg/kg.	Body weight change from day -1 10 mg/kg.
Vehicle	100	1.0	35.7	6.2
FGF21ΔH 1 mg/kg QD	67	2.6	37.0	4.7
Ab-FGF21ΔH-A129C, day 0	80	2.4	22.2	4.2
Ab-FGF21ΔH-A129C, day 1	68	2.6	22.1	3.8
Ab-FGF21ΔH-A129C, day 2	68	2.1	22.2	3.8
Ab-FGF21ΔH-A129C, day 3	57	2.5	27.7	4.0
Lean control (vehicle)	57	0.2	9.3	1.1

Table 12 Results after a single SC injection of Ab-FGF21 Δ H-A129C at day 6 in ob/ob mice; see Figures 6E, 6F, 6G, 6H.

Treatment	Glucose AUC during OGTT	Body weight change from day -1	UCP1 mRNA expression in WAT	Mean values of serum lipids	
				TG (mg/dL)	NEFA (mM)
	100	-0.2	1.00	133	0.61
FGF21 Δ H 1 mg/kg QD	75	-1.6	1.38	92	0.40
Ab-FGF21 Δ H-A129C, d 0&7	83	-2.4	4.02	69	0.36
Chow-fed control (vehicle)	78	+1.2	0.42	104	0.52

Table 13 Results on day 10 after a repeat SC injection of Ab-FGF21 Δ H-A129C at 10 mg/kg on day 0 & 7 in DIO mice (see Figures 7A, 7B, 7C, 7D, 7E)

Treatment	Liver Weight (g)
Vehicle	2.3
FGF21 Δ H 1 mg/kg QD	1.8
Ab-FGF21 Δ H-A129C, day 0	1.4
Ab-FGF21 Δ H-A129C, day 1	1.4
Ab-FGF21 Δ H-A129C, day 2	1.4
Ab-FGF21 Δ H-A129C, day 3	1.5
Lean control (vehicle)	0.8

5 **Table 14** Liver weight on day 6 after a single SC injection of Ab-FGF21 Δ H-A129C at 10 mg/kg at indicated time in ob/ob mice (for Fig 7F)

Treatment	<i>SCD1</i>	<i>MOGAT2</i>	<i>FoxA2</i>
Vehicle	1.01	1.05	1.00
FGF21 Δ H 1 mg/kg QD	0.95	0.37	1.23
Ab-FGF21 Δ H-A129C, day 0	0.83	0.38	1.14
Ab-FGF21 Δ H-A129C, day 3	0.61	0.31	1.81

Table 15 Mean fold changes of mRNA expression using qPCR from liver tissue samples collected on day 6 after a single SC injection of Ab-FGF21 Δ H-A129C at 10 mg/kg at indicated time in ob/ob mice (for Fig 7G, 7H, 7i).

10 **Example 49 Plasma drug levels of Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C in ob/ob model**

Dose related serum levels of Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C in ob/ob mice were examined at 3, 4, 5, and 6 days post-dose, following dosing at 10mg/kg and 3mg/kg. Serum levels of Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C were observed to be well maintained (Figure 7J and 7K). These results were consistent with the pharmacokinetics in healthy

15 animals.

Example 50 *In vivo* effect of Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C on insulin sensitivity

A study was undertaken to determine *in vivo* effect of Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C on whole body insulin sensitivity (measured as glucose infusion rate) and hepatic glucose production during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in

conscious, unrestrained ob/ob mice. Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (in 30 mM acetate buffer, pH 4.8) was administered SC twice a week for one week at a dose of 10 mg/kg. The dosing volume was 2 mL/kg per injection. Ab-FGF21ΔH-A129C was injected on day 2 and 5 of the study. Vehicle (30 mM acetate buffer pH4.8) was administered twice a week at a dosing volume of 2mL/kg per injection on day 2 and day 5 of the study. Mice were treated with ketprofen 2 mg/kg SC and ampicillin 100 mg/kg SC immediately before surgery. Animals (n=8 per group) were randomized according to their day 1 fasted plasma glucose and body weight.

Body weights were recorded on days 1, 4, 7, and 8 of the study. Surprisingly, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C did not demonstrate an effect on body weight in this study (data not shown). Fasted plasma glucose was determined on day 1 (4-hr fast) and day 8 (16-hr fast) with Accu-Chek hand-held glucometers (Roche). Ab-L1-FGF21ΔH-A129C had no effect on fasted plasma glucose levels in this study (data not shown).

On day 7 of the study, mice were fasted for 16 hrs before the clamp procedure on day 8. On day 8 catheters were exteriorized and animals connected to the infusion lines. 90 mins before the start of the clamp procedure (-90 min), a 6 μCi bolus of [3-3H] glucose was injected into the jugular vein followed by a 0.1 μCi/min constant infusion until the end of the clamp. Blood was collected at -10 min and 0 min for the determination of basal HGP. At time 0 min the variable glucose infusion (50% dextrose) as well as the constant infusion of insulin 20 mU/kg/min was started. Plasma glucose was measured every 10 min from the tail vein and glucose infusion rates were adjusted according to each animals glucose level until a steady state was reached. At time points 170 min and 180 min blood was collected to determine hepatic glucose production (HGP) under clamped conditions. During the clamp procedure, animals were unrestrained and conscious.

Hepatic Glucose Production (HGP) was calculated using the following formula:

$HGP = Ra - \text{Rate of cold glucose infusion}$, where

$$Ra = \frac{\text{Glucose Infusion Rate (dpm/min)}}{\text{Blood specific activity (dpm/mg)} \times \text{weight (kg)}} = \text{mg/kg/min}$$

The Rate of appearance (Ra) (which as steady state = the Rate of disappearance (Rd))

Ab-L1-FGF21ΔH-A129C did not affect body weight or fasted plasma glucose in ob/ob mice compared with vehicle-treated animals. All animals were clamped successfully and reached euglycemic plasma glucose levels of 100-110 mg/dl as

well as constant glucose infusion rates during the last 30 min of the clamp.

Euglycemia (100 mg/dL – 110mg/dL plasma glucose) was reached in the vehicle- and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C-treated groups. Plasma glucose levels were measured over the full period of the hyperinsulinemic euglycemic clamp (Figure 8A). There was
5 no statistical difference between the vehicle- and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C-treated animals during the last 30 min of the experiment (clamp period). Ab-L1-FGF21ΔH-A129C significantly increased the glucose infusion rate (GIR) compared with vehicle (Figure 8B). Ab-L1-FGF21ΔH-A129C did not alter basal hepatic glucose production (HGP) but significantly suppressed HGP under clamped (hyperinsulinemic)
10 conditions (Figure 8C).

In conclusion, in this study Ab-L1-FGF21ΔH-A129C significantly increased glucose infusion rates, a measure of whole body insulin sensitivity, and suppressed hepatic glucose production compared with vehicle treated animals without having an effect on body weight or fasted plasma glucose levels.

15 **Example 51 Effect of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in cynomolgus macaques**

The goal of this study was to evaluate the effects of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C on plasma glycemic and lipid indices, as well as on glucose tolerance and inflammatory biomarkers, when administered to obese insulin resistant (pre-diabetic) cynomolgus macaques via twice-weekly SC injections. The study was also designed
20 to determine the duration of pharmacodynamic (PD) effect of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in the monkeys compared to daily dosing with FGF21ΔH.

Twenty-two adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were included in the study. The monkeys (13 male, 11 female) were stratified into four treatment groups of 6 individuals, based on sex, body weight, and basal glycemic and lipid
25 indices measured in a baseline plasma sample collected 2 weeks prior to the start of dosing. Animals were maintained on a high fat diet. Animals were dosed for 4 weeks followed by a 4 week washout period. Animals were dosed as follows: twice weekly SC with Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in 25mM Tris, 125mM NaCl pH 7.0 at 1.5 mg/kg (group A; 4 male (m) 1 female (f)) and 0.15 mg/kg (group B; 3m, 3f), twice weekly
30 s.c. with vehicle (25mM Tris and 125 mM NaCl at a final pH of 7.0) (group C; 3m, 3f), and once daily (QD) with FGF21ΔH at 0.3 mg/kg (group D; 3m, 2f).

Blood samples were collected weekly during the dosing and washout periods, with the exception that no samples were collected at week 3 of washout. After an overnight fast (16-18 h), monkeys were sedated with ketamine 10-15 mg/kg by

intramuscular (IM) injection. Body weights were recorded and blood (5 mL) was collected via percutaneous femoral venipuncture into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) treated Vacutainer tubes pretreated with ~1.8 trypsin inhibitor units (TIU) Aprotinin (Sigma 0.6 TIU per mL whole blood). Tubes were immediately placed
 5 on ice. Plasma was prepared by centrifugation, with the resulting plasma aliquotted and frozen at -80°C.

Plasma drug level sampling was conducted on Days 1, 14, and 28 of the dosing period. Plasma Ab-L1-FGF21ΔH-A129C levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ab-L1-FGF21ΔH-A129C was
 10 captured using mouse anti-idiotypic h38C2 and detected with a mixture of biotinylated mouse anti-FGF21 monoclonal antibodies directed to the N- and C-termini of FGF21. The C-terminal detection antibody has specificity for the last 4-5 amino acids of FGF21, while the N-terminal detection antibody was raised against the first 11-12 amino acids of FGF21. The minimum required dilution for the dual-
 15 detection reagent assay was 1:20 in 3% BSA phosphate buffered saline. The calibration range was 0.03-10 µg/mL, and the quantification range was 0.03-4 µg/mL.

Data were treated in the same way for each pharmacodynamic endpoint. The baseline value for each individual monkey was subtracted from each timepoint to give a value corresponding to change from baseline. Changes from baseline values
 20 were averaged for each timepoint in each treatment group and standard error of the mean (SEM) calculated. Results are reported as mean change from baseline ±SEM for each treatment group over the timecourse of the study. For the 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg Ab-L1-FGF21ΔH-A129C treated animals, statistical significance at each timepoint was assessed vs. vehicle using the change from baseline values and a
 25 student's T- test (unpaired sample, unequal variance). As there was no vehicle control group for the FGF21ΔH treated animals, the raw data and not the change from baseline value was used to assess statistical significance. In this case a student's T-test (two sided, paired sample) was carried out vs. baseline.

Example 52 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C plasma drug levels

30 Plasma drug levels are shown in Table 16. Measurable drug levels were present 4 hrs after the first dose and at all subsequent timepoints tested

Day	Dose (mg/kg)	Mean (SD) AB-L1-FGF21ΔH-A129C Plasma Concentration by Time (h)			
		Predose	1	4	24
1	0.15	BLQ	NC	61.6(52.5)	60.1(25.0)

	1.5	BLQ	NC	221(186)	335(181)
14	0.15	31.7(20.8)	18.6(10.5)	27.1(10.3)	27.6(14.3)
	1.5	66.4(38.5)	249(188)	312(225)	300(228)
28	0.15	-	-	-	39.1(51.4)
	1.5	-	-	-	73.7(84.8)

Table 16 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C plasma drug levels. BLQ = Below limit of quantitation (8 ng/mL), NC = not calculated n<3, - = sample not available for test

Example 53 Body Weight

There was a significant decrease in body weight on treatment after 2 weeks in both AB-L1-FGF21ΔH-A129C dose groups and after 1 week in the group treated with FGF21 control protein (Figure 9A). In all groups weight loss remained depressed during the wash out period although significance was lost by 4 weeks of washout in both AB-L1-FGF21ΔH-A129C groups. FGF21ΔH treated animals exhibited higher weight loss than those treated with AB-L1-FGF21ΔH-A129C. Food intake was not directly measured in these animals but there were no observations of inappetence by the care staff in any of the animals in any treatment group.

Example 54 Fasted plasma glucose

Plasma glucose was measured via an enzymatic colorimetric method using the Ace Alera® Clinical Chemistry Analyzer and reagents (Alfa Wassermann®, Caldwell, NJ) according to manufacturer's instructions. There was no significant change in fasted plasma glucose (Figure 9B) across time in any of the treatment groups, indicating that prolonged treatment with AB-L1-FGF21ΔH-A129C does not cause hypoglycemia.

Example 55 Fasted plasma insulin

Plasma insulin concentrations were determined using an ELISA kit from Mercodia® (Uppsala, Sweden) according to manufacturer's instructions. There was no significant change in fasted plasma insulin (Figure 9C) levels across time in any of the treatment groups.

Example 56 Fasted plasma fructosamine

Plasma fructosamine was measured via an enzymatic colorimetric method using the Ace Alera Clinical Chemistry Analyzer using a kit from Roche Diagnostics® (Mannheim, Germany) according to manufacturer's instructions. Plasma fructosamine levels were significantly reduced after 4 and 3 weeks of treatment respectively in the 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treatment groups and after 3 weeks in the FGF21 control protein treated animals (Figure 9D).

This significance was sustained into the washout period particularly in the 1.5mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treatment group but was not consistent across the timepoints for FGF21ΔH treated animals. Significant reduction in plasma fructosamine levels over time indicates improved glycemic control.

5 **Example 57 Fasted plasma glucagon**

Plasma Glucagon was measured using a Human (cross-reacts with non human primate) endocrine Immunoassay kit from Millipore® on the BioPlex® Instrument (Luminex xMAP technology) according to manufacturer's instructions. Glucagon levels decreased in all 3 treatment groups with significance being reached at some timepoints throughout the study but the significance of decrease is not consistent across the treatment groups or across the AB-L1-FGF21ΔH-A129C dose groups (Figure 9E).

Example 58 Intravenous glucose tolerance test (IVGTT)

Intravenous glucose tolerance tests (IVGTTs) were conducted on each animal at three timepoints: baseline (i.e. two weeks prior to commencement of dosing), again after 4 weeks of dosing, and finally after 4 weeks of post-dosing washout. At those time points, monkeys were sedated and fasted blood samples were collected as described above. 50% dextrose (500 mg/kg; 1 mL/kg) was infused into a peripheral vein (cephalic or saphenous) over approximately 30 seconds, followed by a saline flush. Blood samples were subsequently collected into EDTA-treated vacutainers (2 mL) at 5, 10, 20, 30 and 60 mins post-dextrose.

Glucose and insulin were measured at each of the IVGTT timepoints. Areas under the glucose and insulin curves were calculated during the glucose tolerance test (0-60 min). ΔAUC's were calculated for glucose and insulin from the glucose and insulin excursion curves by trapezoidal rule using time 0 (t=0min) values as baseline. For the AB-L1-FGF21ΔH-A129C 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg treated groups statistical significance was assessed vs. vehicle by ANOVA with Dunnetts post test. Significance across the IVGTT timepoints vs. baseline was assessed for the FGF21ΔH group by repeated measure ANOVA with Dunnett's post test.

Mean calculated ΔAUCs ±SEM for glucose and insulin are shown in Figures 9F and 9G respectively. There were no significant changes in any of the calculated parameters for any of the treatment groups.

Example 59 Total plasma cholesterol (TPC)

TPC levels were measured using enzymatic methods on the Ace Alera analyzer. There was a significant decrease in TPC after 1 week of treatment in all treatment groups (Figure 9H). In the 0.15 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated animals TPC levels remained decreased through the entire dosing and washout phase whereas in the 1.5 mg/kg and FGF21ΔH treated groups levels rebounded towards baseline during the washout phase.

Example 60 Triglycerides (TG)

TG levels were measured using enzymatic methods on the Ace Alera analyzer. There was a significant decrease in TG over the dosing period in both the 1.5 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated group and the FGF21ΔH treated animals (Figure 9i). The reduction in TG levels persisted across the washout phase in the FGF21ΔH treated group whereas TG levels in the 1.5 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated group trended towards baseline in the washout phase.

Example 61 Non-esterified free fatty acids (FFA)

Non-esterified free fatty acids (FFA) were measured using enzymatic methods on a Roche Cobas® C311 clinical chemistry analyzer using protocols and reagents from Wako® (Wako Diagnostics, Richmond, VA) according to manufacturer's instructions. There was no significant change in FFA levels in the 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated groups (Figure 9J). FFA levels in the FGF21ΔH treated animals were significantly increased over the first 2 weeks of treatment and then returned to baseline levels by week 1 of the washout phase.

Example 62 High density lipoprotein cholesterol (HDL)

HDL levels were measured using enzymatic methods on the Ace Alera analyzer. There was no significant change in HDL cholesterol over the treatment period in any of the treatment groups.

Example 63 Low density lipoprotein cholesterol (LDL)

LDL levels were measured using enzymatic methods on the Ace Alera analyzer. There was a significant decrease in LDL cholesterol from 2 weeks and 1 week of treatment respectively through to week 2 of the washout period in the 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated groups (Figure 9K). A significant decrease in LDL cholesterol levels was only observed after 1 week of treatment in FGF21ΔH treated animals. No significance was seen at any other timepoint in this treatment group.

Example 64 Total ketone bodies (TOTK)

TOTK were measured using enzymatic methods on a Roche Cobas® C311 clinical chemistry analyzer using protocols and reagents from Wako®. There was no significant change in total ketone body levels in the 0.15 mg/kg and 1.5 mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated animals (Figure 9L). TOTK levels were significantly increased in the FGF21ΔH treated animals over the first 3 weeks of treatment with levels trending towards baseline over the washout period.

Example 65 Adiponectin

Adiponectin levels were determined using a Mercodia® ELISA kit. Plasma adiponectin levels are shown in Figure 9M. Three animals (one each in the vehicle, 1.5mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C and the FGF21ΔH treated group) were excluded from analysis as their adiponectin levels were below the limit of detection for the assay. No significant change in adiponectin levels were seen in any of the treatment groups although the levels trended upwards in the FGF21ΔH treated animals.

Example 66 C-Reactive Protein (CRP)

C-reactive protein (CRP) was measured using an ELISA kit from ALPCO Diagnostics® (Salem, NH) according to manufacturer's instructions. Plasma CRP levels were significantly decreased in the 0.15 and 1.5mg/kg AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated animals over the 4 week treatment period with the exception of week 2 (Figure 9N). Levels trended back to baseline during the washout phase. Plasma CRP levels also decreased in the FGF21ΔH treated animals but significance was only reached at the 1 week washout timepoint.

Example 67 Leptin

Leptin was measured by Luminex® technology (Millipore® catalogue number HMH-34K) with protocols and reagents according to manufacturer's instructions. Plasma leptin levels decreased in the FGF21ΔH treated animals (Figure 9o) but this decrease did not reach significance at any of the timepoints. There was no change in leptin levels in the AB-L1-FGF21ΔH-A129C treated groups

Example 68 Adipsin

Adipsin levels were measured using and R&D systems® (Minneapolis MN) human complement factor D Quantikine kit (catalogue number DFD00) according to manufacturer's instructions. Plasma adipsin levels increased significantly in all the treated animals (Figure 9Q) during the first 3 weeks of treatment. The levels trended back towards baseline during the washout phase.

Example 69 Conclusion from monkey studies

AB-L1-FGF21 Δ H-A129C was efficacious in reducing body weight, improving lipid indices (TPC, TG and LDL), and reducing an inflammatory biomarker (CRP) in mild to moderately insulin resistant cynomolgus macaques. There was no apparent effect of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C or FGF21 Δ H on fasted blood glucose levels and no development of hypoglycemia. There was no effect on insulin sensitivity as assessed by an IVGTT. While unexpected, this result, along with the lack of effect on plasma glucose levels, may be due to the baseline levels of glucose and insulin in these macaques being only slightly elevated compared to normal healthy macaques. This suggests that these animals display only mild insulin resistance. The small change in baseline levels combined with the natural variability from monkey to monkey and low animal number per group may make it difficult to observe statistically significant changes in glycemic indices. The reduction in fructosamine levels in the AB-L1-FGF21 Δ H-A129C treated animals towards the end of the treatment period does indicate improved glycemic control in these animals. Twice weekly dosing of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C (particularly the 1.5 mg/kg dose) produced comparable beneficial effects to daily dosing of the control FGF21 protein.

Example 70 First in Human Study of AB-L1-FGF21 Δ H-A129C

A randomized, placebo-controlled, parallel ascending single IV dose study of Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (h38C2-(SEQ ID NO:10-L1)₂) was undertaken in subjects with Type 2 diabetes mellitus. Subjects received either placebo or Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C as an IV bolus (0.5 mg and 1.5 mg) or IV infusion (5, 15, 50, 100, 200 mg) administration with 10 subjects evaluated at each active treatment dose group and 14 in the placebo group. To date, seven cohorts up to the 200 mg dose level have been evaluated without identification of the maximum tolerated dose (MTD) as single IV doses up to 200 mg were found to be generally safe and well tolerated. A preliminary summary of the observed safety/tolerability, pharmacokinetic and pharmacodynamic data is presented here.

Following a single dose administration, no difference between 7-pt mean plasma glucose profiles and fasting plasma glucose levels were observed compared with the placebo, although both test and placebo showed a decrease. No dose-related trends were observed in total cholesterol, LDL cholesterol, fasting insulin, fasting glucagon, or fasting beta-hydroxybutyrate. An increase in HDL cholesterol compared to placebo was observed at the top two dose levels studied (100 and 200 mg IV). A dose-dependent decrease in fasting triglycerides was observed.

Pharmacokinetics of intact C-terminus and intact N-terminus of FGF21 were estimated separately in healthy volunteers following single intravenous administration of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. Exposures to both appeared to increase proportionally with increasing dose. The terminal phases of the log concentration versus time curves were parallel with mean terminal half-lives of 7 to 9 hrs for C-terminus and 30-36 hrs for N-terminus, respectively.

There were no serious adverse events (SAEs) reported and a total of 60 adverse events (AEs) were reported in 33 subjects. Of these AEs, 54 were reported in 28 subjects while receiving Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. The majority of AEs were deemed to be mild in intensity except an episode of nausea rated as moderate starting at 32.5 hrs post the 15 mg dose of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C or placebo which lasted 165 hrs, did not require intervention and was considered related to study drug treatment. Also reported was an episode of diarrhea rated moderate starting at 2 hrs post the 50 mg dose of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C or placebo and lasted for 156 hrs which did not require intervention and was considered related to study drug treatment. Diarrhea was the most frequent AE reported (14 episodes in 12 subjects) and of these, nine (9) episodes were considered-treatment related. The other episodes of diarrhea were considered related to altered chlorination treatment of tap water served to subjects in one cohort during inpatient confinement at a participating clinical research unit. Gastrointestinal symptoms (abdominal distention, abdominal pain, diarrhea, dyspepsia, flatulence, hyperchlorhydria, nausea and vomiting) appear to increase in frequency with increasing dose with five (5) subjects reporting nine (9) GI AEs in Cohort 7 (200 mg dose group or placebo). No subjects were withdrawn from participation in the study as a result of an AE.

No dose-related trends were observed in IGF-1 values, laboratory tests, vital signs or 12-lead ECGs observed across the doses studied. In the 200 mg treatment group, mean values for systolic blood pressure (SBP) trended numerically higher than other treatment groups (including placebo) with a highest increase from baseline of 11.2 mmHg at 0.5 hr post dose on Day 1 and was sustained through Day 15 at 7.0 mmHg. The mean changes from baseline observed in the 200 mg treatment group were within one standard deviation of the group mean baseline. Furthermore, there was no correlation between Ab-L1-FGF21ΔH-A129C exposure and SBP increases in individual subjects in the 200 mg treatment group. In addition, the increased SBP persisted through Day 15, well after study drug washout. All of

these observations suggest that the mean increase observed is within and possibly related to treatment group variability.

Example 71 Dosage Regimen

The concentration-response relationship of triglyceride lowering following a single dose of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in type 2 diabetic patients was described using a slow pharmacology onset and offset PK/PD model. The PK/PD model derived IC₅₀ and slow pharmacology kinetics from FIH (First in Human) triglyceride data and the model derived maximal pharmacology from ob/ob mice OGTT data were used for the dose projections. A weekly dose of 10 mg h38C2-(SEQ ID NO:10-L1)₂ or twice a week dose of 5 mg Ab-L1-FGF21ΔH-A129C for 4 weeks is projected to achieve ~25% fasting plasma glucose lowering in 8% HbA1C diabetic patients.

Accordingly, the present invention provides for a dosage regimen, comprising treating a patient with a dose of about 5 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C). In some aspects, the about 5 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C) is administered twice per week. In some aspects, the about 5 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C) is administered for at least 4 weeks. In some aspect, the about 5 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C) is administered twice per week, for at least 4 weeks.

Accordingly, the present invention provides for a dosage regimen, comprising treating a patient with a dose of about 10 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C). In some aspects, the about 10 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C) is administered once-weekly. In some aspects, the about 10 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C) is administered for at least 4 weeks. In some aspect, the 10 mg of a compound of the invention (in particular Ab-L1-FGF21ΔH-A129C) is administered once-weekly for at least 4 weeks.

In some aspects, the patient suffers from type 2 diabetes. In some aspects, the patient is a diabetic patient with elevated hemoglobin A1C (HbA1C). In some aspects, the dosage regimen is for the lowering of triglyceride levels. In some aspects, the dosage regimen is for the raising of HDL. In some aspects, the dosage regimen is for the lowering of blood glucose. In some aspects, the dosage regimen is for the lowering of blood glucose by at least about 25%. In some aspects, the dosage regimen is for the treatment of type 2 diabetes.

Example 72 Stability of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C & Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

Various formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C & Ab (h38C2-(FGF21ΔH-H125C-L1)₂) and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (h38C2-(FGF21 ΔH-A129C-L1)₂) were prepared by UF-DF (diafiltration and ultrafiltration using 30000 molecular weight cut-off), and then sterile filtered. The formulations were subjected to a range of stress conditions (see Table 17). The samples were then analyzed using Appearance assay, UV (ultraviolet absorbance), SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis), Size Exclusion Chromatography (SEC), and iCE (imaged capillary electrophoresis). Some samples were analyzed by biophysical techniques such as differential scanning calorimetry (DSC), and analytical ultracentrifugation. Samples were analyzed at various time points (Table 17) to assess stability trend. To determine any beneficial effect of polysorbate 80, selected formulations prepared with or without polysorbate 80 were subjected to agitation stress (4 hrs at 300 rpm orbital shaking). Additionally, some formulations also used higher concentration to evaluate if the conjugates are soluble in aqueous buffered solvents at high concentration and to assess stability at high concentration.

	Formulation	Protein mg/mL	Appearance					
			Initial	4hrs 300rpm	4wks 5°C	4wks 25°C	2wks 40°C	2wks 50°C
A	"H125C-His6" (20mM histidine, pH 6)	7-10	C	PF	PF	PF	PF	PF
B	"H125C -NaAc4" (20mM sodium acetate, pH 4)	7-10	C	nc	PF	nc	C	nc
C	"H125C -NaP8" (20mM sodium phosphate, pH 8)	7-10	C	nc	PF	nc	C	nc
D	"H125C -His6-50" (20mM histidine, pH 6)	40-50	C	nc	PF	nc	C	nc
E	"H125C-His6-PS80" (20mM his, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 6)	7-10	C	C	nc	nc	nc	nc
F	"A129C-His6" (20mM histidine, pH 6)	7-10	C	PF	PF	PF	PF	PF
G	"A129C -NaAc4" (20mM sodium acetate, pH 4)	7-10	C	nc	C	nc	C	nc
H	"A129C -NaP8" (20mM sodium phosphate, pH 8)	7-10	C	nc	C	nc	C	nc
I	"A129C -His6-50" (20mM histidine, pH 6)	40-50	C	nc	PF	nc	C	nc
J	"A129C-His6-PS80" (20mM his, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 6)	7-10	C	C	nc	nc	nc	nc

Table 17 Formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C (A-E) and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (F-I). PF: particles formed; C: clear; nc: not conducted.

Appearance Assay

Particulate formation upon storage at various temperatures: Both candidates in 20mM histidine, pH 6 formulation (Formulations A and F) showed particulate formation following either 4 week storage at 5°C or 4 week at 25 °C, or 2 week at 40 °C, or 2 week at 50 °C. These data suggest that 20mM histidine, pH 6 formulation leads to instability of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. When

stressed at 40°C for 2 weeks, acetate pH 4, and phosphate pH8 showed no particulate formation, in contrast to histidine pH 6 formulation at the same protein concentration level. However, high protein concentration (40-50 mg/mL) appears to slow down particulate formation when compared to the same formulation (histidine, pH 6) at lower protein concentration (7-10 mg/mL). When appearance data of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C after storage at 5°C for 4weeks are compared, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C shows superior performance against particulate formulation in 2 formulations (acetate, pH4, and phosphate pH 8).

The presence of polysorbate 80 helps in preventing agitation stress induced particulate formation in both candidates as seen in Table 17 when comparing formulations with and without polysorbate 80. Agitation stress is commonly used for predicting stability against various process steps that involve air-water interface as well mechanical stress.

No significant change in UV was observed over time indicating that even if particulate formation was observed in some of the formulations listed in Table 17, the net concentration of protein in was not significantly affected over time.

High molecular weight species (HMWS) formation

SEC was used to measure HMWS formation for various formulations listed in Table 17 (results shown in Table 18). SEC is able to reliably separate HMWS, and is an important stability-indicating assay for both Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. HMWS in the SEC assay is defined as the species that elute prior to the conjugates carrying 2 units of FGF21 (i.e. h38C2-(FGF21ΔH-H125C-L1)₂ and h38C2-(FGF21 ΔH-A129C-L1)₂). Formulations in 20mM histidine, pH 6 for both candidates showed high initial as well as time-dependent formation of HMWS.

Interestingly, some of the formulations (acetate, pH4; phosphate, pH 8, and high concentration formulations in histidine pH 6) of both candidates at high temperatures (40°C) tend to show an initial dissociation of aggregates in the first week. Nonlinear aggregation trend of protein formulations over time is known in literature.

Formulations in 20mM sodium acetate, pH 4 showed less HMWS when compared to formulations in 20mM histidine, pH 6. Therefore, formulations in 20mM sodium acetate, pH 4 provide superior stability than in 20mM histidine, pH 6 for HMWS formation. SDS PAGE analysis was consistent with these results. Finally, when the two candidates are compared for propensity of HMWS formation at 5°C in acetate,

pH 4 formulation, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C appears to perform superior than Ab-L1-FGF21ΔH-H125C (Table 18).

Storage Temperature	5°C				25°C			40°C		
Time Point (week)	initial	2 wk	4 wk	8 wk	1 wk	2 wk	4 wk	1 wk	2 wk	4 wk
H125C-His6	25.1	25.9	27.1	21.8	22.8	23.3	22.0	14.5	20.2	25.1
H125C -NaAc4	11.7	8.5	9.6					4.6	4.5	6.3
H125C -NaP8	21.0	20.2	21.7					15.0	12.0	10.1
H125C -His6-50	33.2		36.4						33.9	20.9
A129C-His6	27.3	23.3	25.0	24.3	18.6	20.3	18.9	14.0	23.2	13.0
A129C -NaAc4	3.6	3.2	3.5					2.9	3.6	5.0
A129C -NaP8	17.8	17.0	17.8					11.9	14.9	30.8
A129C -His6-50	28.2		35.3						29.6	23.5

TABLE 18 Stability data of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

% HMWS (high molecular weight species) measured by SEC. SEC conditions

- 5 include: Waters Biosuite UHR 250 4μm, 4.6 x 300 mm SEC column, Mobile Phase: 200 mM Sodium Phosphate 100 mM Sodium Chloride buffer (pH 7.0), Column Temperature: Ambient, Flow Rate: 0.1 ml/min (Isocratic), Detection: UV absorbance at 214 nm, Run Time: 50 mins

Charge heterogeneity

- 10 Proteins possess charge heterogeneity caused by post-translational modifications such as deamidation and fragmentation. Imaged capillary isoelectric focusing (iCE) separates protein species based on their charge differences (pI value) in a pH gradient. iCE was used in monitor charge heterogeneity in various formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C, shown in
- 15 Table 19. Running conditions for iCE include: approximately 1 mg/mL protein with 2M urea, and Pharmalyte 3-10. Formulations in 20mM histidine, pH 6 as well as 20mM sodium phosphate, pH 8 for both candidates showed a higher trend of acidic species formation compared to those in 20mM sodium acetate, pH 4. Therefore, formulations in 20mM sodium acetate, pH 4 provide superior stability. Additionally,
- 20 Ab-L1-FGF21ΔH-A129C showed a trend of lesser acidic species formation in 20mM sodium acetate, pH 4 than Ab-L1-FGF21ΔH-H125C in the same formulation, therefore demonstrating superior stability for charge heterogeneity.

Storage Temperature	5°C			25°C			40°C	
Time Point (week)	initial	2 wk	4 wk	1 wk	2 wk	4 wk	1 wk	2 wk
H125C-His6	60.0	62.8	64.9	60.3	71.9	74.2	75.1	82.9

H125C -NaAc4	62.4	61.7	60.7				53.3	
H125C -NaP8	77.4	92.3	95.3				96.2	
H125C -His6-50	61.9		78.5					
A129C-His6	58.4	62.7	62.5	64.2	73.0	75.2	75.7	81.9
A129C -NaAc4	49.3	52.7	48.8				45.2	
A129C -NaP8	68.3	87.5	89.0				97.4	
A129C -His6-50	62.5		53.9					

TABLE 19 % Acidic species measured by iCE Charge Heterogeneity data of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Thermal stability of the two candidates was investigated using DSC by measuring midpoint of transition (T_m) of temperature-induced unfolding. The T_m value of the major unfolding transition for h38C2 was 73.5°C. The conjugates showed higher T_m of the major unfolding transition, suggesting higher thermal stability against unfolding (T_m of both Ab-L1-FGF21ΔH-H125C (h38C2-(FGF21ΔH-A129C-L1)₂) and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (h38C2-(FGF21ΔH-H125C-L1)₂) was 79°C).

Thermal stability of the two candidates was also investigated using intrinsic protein tryptophan fluorescence by measuring midpoint of transition (T_m -FL) of temperature-induced unfolding. This assay monitors changes in tertiary structure semi-quantitatively upon unfolding induced by high temperature. The T_m -FL values of the major unfolding transition were approximately 74.1°C, 77.7°C, and 79.7°C for h38C2, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C, and Ab-L1-FGF21ΔH-H125C, respectively. Consistent with the T_m values measured by DSC, the two candidates show similar T_m -FL that are slightly higher than T_m -FL of h38C2, suggesting higher thermodynamic stability of the conjugates than h38C2 alone.

Analytical Ultracentrifugation assay

This assay was used as an orthogonal measurement of qualitative amount of HMWS in selected formulations tested. It shows a level of HMWS in 20mM histidine, pH 6 formulations similar to those seen in SEC. It also shows lower level of HMWS in 20mM sodium acetate, pH 4 for Ab-L1-FGF21ΔH-A129C, qualitatively consistent with trend seen in SEC assay. Analytical ultracentrifugation data provides orthogonal verification that 20mM sodium acetate, pH 4 formulation provides superior stabilization compared to 20mM histidine, pH6 formulation (Table 20).

Formulation	%HMWS
Ab-L1-FGF21ΔH-H125C in 20mM histidine, pH 6	25.2

Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in 20mM histidine, pH 6	24.3
Ab-L1-FGF21ΔH-A129C in 20mM sodium acetate, pH 4	5.2

TABLE 20 HMWS data measured by analytical ultracentrifugation of Ab-L1-FGF21ΔH-H125C and Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

Comparing data of several stability indicators discussed in this example, the overall stability profile of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C appears to be superior than Ab-L1-FGF21ΔH-H125C. It is also evident that lowering pH of formulation (e.g. acetate, pH 4) provides better stability compared to higher pH (e.g. pH 6-8).

Example 73 pH-Buffer Screen of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

The stability of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (h38C2-(FGF21ΔH-A129C-L1)₂) in various aqueous buffers was investigated with the goal of finding an appropriate stabilizing medium. Instability of Linker-1, as well as any hydrolytic clipping of the protein components (i.e. h38C2 and FG21) results in the generation of low molecular weight species (LMWS). Additionally, high molecular weight species can be formed if the conjugates aggregate in the formulation tested. Formulations were prepared by buffer exchange into the desired formulation with a target protein concentration in the range of 5-8 mg/mL. Formulations were filtered using 0.2μm filter, packaged in glass vials and stored at desired temperature. At indicated time points, samples were assayed.

HMWS and LMWS measurement by SEC

Pronounced effect of buffer and pH was observed upon temperature stress (40°C) for 2 weeks. The data is presented in Table 21. At initial time point, a trend of increasing HMWS was seen at higher pH formulations. Histidine formulations were among the ones showing high %HMWS. Sodium acetate, sodium lactate, sodium malate, and sodium citrate formulations in the pH range 4.5 to 5 showed relatively less aggregate at initial point. Upon storage at 40°C for weeks, %HMWS actually decreased in formulations at pH 6.5 and 7. Sodium lactate, pH 4.5 formulation showed relatively superior performance for %HMWS.

The LMWS trend was different from that of HMWS. Except sodium citrate, pH 5 formulation, all formulations showed consistent values of %LMWS at initial time point. Upon storage at 40°C for 2 weeks, some of the low pH formulations showed pronounced increase in %LMWS presumably due to fragmentation. However, it is apparent that effects of buffer species also play a role in stabilizing against LMWS

formation. The trend of pH-dependent %LMWS suggests further refinement in formulation could achieve a further improvement in stability.

ID	Formulation	%HMWS at initial	%HMWS after 2 weeks at 40°C	%LMWS at initial	%LMWS after 2 weeks at 40°C
A	20mM Sodium Acetate, pH 4.5	8.9	13.7	26.8	38.1
B	20mM Sodium Acetate, pH 5	9.4	22.6	26.1	33.8
C	20mM Sodium Acetate, pH 5.5	12.1	29.2	26.1	33.2
D	20mM Histidine, pH 5.5	16.9	26.0	25.3	29.7
E	20mM Histidine, pH 6	23.0	28.2	24.6	29.7
F	20mM Histidine, pH 6.5	18.0	14.8	25.5	38.6
G	20mM Sodium Lactate, pH 4.5	8.9	11.3	26.7	55.2
H	13mM Sodium Malate, pH 4.5	9.2	20.8	27.6	52.7
I	13mM Sodium Malate, pH 5	9.9	34.3	27.6	28.3
J	10mM Sodium Citrate, pH 5	7.8	24.3	36.5	47.5
K	10mM Sodium Citrate, pH 6.5	21.5	15.9	26.0	37.8
L	13mM Sodium Succinate, pH 6	16.8	13.3	26.2	42.1
N	10mM Sodium Phosphate, pH 6.5	22.2	12.9	25.3	45.3
P	10mM Sodium Phosphate, 100mM NaCl, pH 6.5	19.3	15.4	25.7	40.0
Q	10mM Sodium Phosphate, pH 7	16.4	13.1	27.1	43.9
R	7mM Sodium acetate, 7 mM Histidine, 4mM Sodium malate, pH 5	9.9	22.6	27.0	33.7
S	5mM Sodium citrate, 5 mM Sodium Phosphate, pH 6.5	22.1	12.1	25.9	44.7

Table 21 SEC data of formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

Example 74 Stability of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C against agitation

5 Formulations were prepared by buffer exchange and excipient addition with a target protein concentration in the range of 9-11 mg/mL. The prepared formulations were filtered using 0.2um filter, packaged in glass vials. Agitation was applied using an orbital shaker at 300 rpm speed. At indicated time points, samples were assayed. Results in Table 22 demonstrate that the presence of polysorbate 80 helps prevent
10 agitation-induced instability.

Formulation	Appearance at initial	Appearance after 24 hr agitation	Change in %HMWS after 24 hr agitation
30mM Sodium Lactate, 90mg/mL trehalose dihydrate, pH 4.8	Clear	Milky liquid and precipitation	1.4
30mM Sodium Lactate, 90mg/mL trehalose dihydrate, 0.5mg/mL polysorbate 80, pH 4.8	Clear	Clear with few particulates	0.1

Table 22 Stability data of formulations against agitation stress

Example 75 Lyophilized formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

Although liquid formulations can be used with compounds of the invention, lyophilized formulations can provide greater longevity of stability. Example 72 demonstrated the surprising result that compounds of the invention were most stable in sodium acetate. However, sodium acetate sublimates, and accordingly is difficult to incorporate into a lyophilized buffer. There therefore exists a need to develop an alternative buffer for compounds of the invention that provides optimum long term stability in a lyophilized formulation.

Formulations were prepared by buffer exchange and excipient addition with a target protein concentration of approximately 10 mg/mL except formulations J and K that target approximately 20 mg/mL. The prepared formulations were filtered using 0.2um filter, and packaged in glass vials. To prepare lyophilized formulations, the vials were lyophilized, stoppered and capped. At indicated time points, samples were pulled and assayed by various analytical methods including SEC, and iCE. The liquid formulations were also evaluated for 2 weeks to evaluate stability.

The performance of the lyophilized formulations upon storage at elevated temperature was assessed. Table 23 shows SEC and iCE data at indicated time points. The lyophilized formulations performed superior even when compared to higher temperature stress. Among the lyophilized formulations, lactate and acetate formulations performed relatively better. However, acetate is known to undergo sublimation when lyophilized causing pH drift. Indeed the acetate formulations showed an increase of 0.3-0.5 pH unit upon lyophilization. Therefore, it is concluded that lyophilized lactate formulation (formulation C) is appropriate to achieve adequate stability, and provides sufficient protection from formation of particulates, HMWS, LMWS, and acidic species. When comparing with formulations presented in example 73, it is clear that formulation C (comprised of lactate, trehalose dihydrate, PS20, EDTA, L-Met) helps in prevention of linker instability and protein clipping (both of which give rise to LMWS formation), as well aggregation (formation of particulates and HMWS). Examples 72 and 73 show that formulations of h38C2-(FGF21ΔH-A129C-L1)₂ with only lactate, albeit superior to other buffers such as histidine, may not provide adequate stability for desired longer term use. The combination of lactate with various types of stabilizers such as a sugar or polyol serving as cryoprotectant and lyoprotectant (e.g. trehalose, sucrose, mannitol), and a surfactant for agitation stability (e.g. polysorbate 80, polysorbate 20, poloxamer), and a chelator (e.g. EDTA, DTPA), and an anti-oxidant (e.g. L-Methionine) provides synergistic enhancement of

stability. The combination formulations in Table 23 where lactate is replaced by one of malate, succinate or acetate, provide superior stability when compared to the corresponding buffer-only formulations. Therefore, the combinations clearly enhance stability of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C.

5 **Example 76 Lyophilized formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C**

Formulations were prepared by buffer exchange and excipient addition with a target protein concentration that varied between formulations. The prepared formulations were filtered using 0.2 μm filter, and packaged in glass vials. To prepare lyophilized formulations, the vials were lyophilized, stoppered and capped. At
10 indicated time points, samples assayed by various analytical methods including SEC, and iCE. Additionally, the liquid formulations were also evaluated for 2 weeks to evaluate stability trend of liquid formulations. Water content of the lyophilized formulations were tested after lyophilization, and were all below 0.5%.

The lyophilized formulations were stored under various temperature stress,
15 and Table 24 shows SEC, iCE, and reduced CGE (capillary gel electrophoresis) data at indicated time points. CGE produces semi-quantitative estimate of protein fragments. The lyophilized formulations showed better stability when compared to their liquid counterparts. The lyophilized formulations of lactic acid (sodium lactate) in the presence of stabilizing excipients (in the presence of a cryoprotectant/
20 lyoprotectant) showed good stability. Therefore, it is concluded that lyophilized lactic acid formulations are appropriate to test for longer term storage stability. Among the lactic acid formulations, a balance of pH of formulations is needed to prevent excessive fragmentation due to linker instability and protein clipping. For example, formulation F, pH 4.5, in liquid state, produces substantial fragmentation compared
25 to other formulations. Finally, when formulations B and L are compared, stabilizers (namely, EDTA and L-Methionine) are seen to minimize fragmentations, providing a substantial benefit, especially to the liquid formulations. Other combinations of metal chelators (e.g. EDTA, DTPA) and anti-oxidants (e.g. L-Methionine, pure ascorbic acid) are expected to be beneficial to achieve stability.

30 Selected formulations were also tested for relative bioactivity to explore if there are correlations to physical and chemical degradations seen in the data in Table 24. Bioactivity was measured by an Indirect FGF-R/β-Klotho HEK-293 Cell Binding ELISA, and expressed as relative % to that of a reference material. Bioactivity data are presented in Table 25. From the data, it appears that physical

and chemical degradations are correlated, and the formulations that show significant degradation assayed by analytical methods (Table 24) also show significant reduction in bioactivity. These data provides further confidence in stability and functional integrity provided by the components of formulation A.

Formulation ID	Bioactivity after 2 weeks at 5°C	Bioactivity after 2 weeks at 25°C	Bioactivity after 2 weeks at 40°C	Liquid/Lyophilized
A	105	-	-	Lyophilized
B	-	107	64	Liquid
D	-	97	61	Liquid
F	-	98	49	Liquid

5 **Table 25** Bioactivity (relative %) data of selected Lyophilized and Liquid formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C listed in Table 24

Accordingly, in some aspects the invention provides for a formulation comprising between about 0.1 and about 200 mg/ml of FGF21-conjugate and between about 1 and 150 mM lactic acid or sodium acetate, pH between about 4 and
 10 about 5.5; and at least one of the following:

- (i) between about 10 to about 150 mg/ml cryoprotectant;
- (ii) between about 0.001 and about 1.0 mg/ml chelator;
- (iii) between about 0.01 and about 10 mg/ml anti-oxidant;
- (iv) between about 0.02-2.0 mg/mL surfactant.

15 In some aspects, formulations of the invention comprise two or more of (i) to (iv). In some aspects formulations of the invention comprise three or more of (i) to (iv). In some aspects, formulations of the invention comprise (i), (ii), (iii), and (iv).

In some aspects the invention provides for a lyophilized formulation comprising:

- 20 (i) between about 0.1 and about 200 mg/ml of FGF21-conjugate
- (ii) between about 1 and 150 mM lactic acid pH between about 4 and about 5.5; and
- (iii) between about 10 to about 150 mg/ml cryoprotectant;
- (iv) between about 0.02-2.0 mg/mL surfactant.

25 In some aspects, the lyophilized formulation may further comprise between about 0.001 and about 1.0 mg/ml chelator. The chelator may be EDTA or DTPA, and may be present in an amount of between about 0.02 to about 0.5 mg/mL. The chelator may be present in an amount of about 0.05 mg/mL.

30 In some aspects, the lyophilized formulation may further comprise between about 0.01 and about 10 mg/ml anti-oxidant. In some aspects, the antioxidant may be L-

methionine. The antioxidant may be present in an amount of between about 0.02 and about 5 mg/mL. The antioxidant may be present in an amount of between about 0.05 and about 0.2 mg/mL. The antioxidant may be present in an amount of about 0.1 mg/mL.

5 In some aspects, the FGF21-conjugate is a compound of the invention as herein described. In some aspects, the FGF21-conjugate is Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C or Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. In some aspects, the FGF21 conjugate is the specific species h38C2-(SEQ ID NO:10-L1)₂. In some aspects, the FGF21-conjugate is present in an amount of between about 5mg/ml and about 200 mg/ml. In some aspects, the
10 FGF21-conjugate is present in an amount of between about 5mg/ml and about 100 mg/ml. the FGF21-conjugate is present in an amount of between about 5mg/ml and about 50 mg/ml. the FGF21-conjugate is present in an amount of about 10 mg/ml.

In some aspects, the lactic acid is present in an amount of between about 1 to about 100 mM. In some aspects, the lactic acid is present in an amount of between
15 about 10 mM and about 50mM. In some aspects, the lactic acid is present in an amount of about 30 mM. The pH may be between about 4.3 and about 5.3. The pH may be about 4.8 $\pm$ 0.5. The pH may be about 4.8.

In some aspects, the cryoprotectant is selected from the group consisting of trehalose dihydrate, sucrose, and mannitol. The cryoprotectant may be trehalose
20 dihydrate. The cryoprotectant may be present in an amount of between about 50 and about 120 mg/ml. The cryoprotectant may be present in an amount of about 90 mg/ml.

In some aspects, the surfactant may be selected from the group consisting of polysorbate 80, polysorbate 20 and poloxamer. The surfactant may be polysorbate
25 20. In some aspects, the surfactant is present in an amount of about 0.05 to about 1.0 mg/mL. In some aspects the surfactant is present in an amount of about 0.1 to about 0.5 mg/mL. In some aspects, the surfactant is present in an amount of about 0.2 mg/mL.

In some aspects, the invention comprises a formulation suitable for lyophilization
30 comprising the following:

- (i) about 10 mg/mL h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂;
- (ii) about 30 mM lactic acid, pH 4.8 $\pm$ 0.5;
- (iii) about 90 mg/mL trehalose dehydrate;
- (iv) about 0.05 mg/mL disodium EDTA dihydrate;

- (v) about 0.1 mg/mL L-methionine; and
- (vi) about 0.2 mg/mL polysorbate 20.

Unless otherwise indicated, where the term "Ab-L1-FGF21ΔH-A129C" is used in the context of the specific examples, this refers to the h38C2 antibody (SEQ ID NO:25 and 26), with each arm of the antibody covalently linked through K⁹⁹ of SEQ ID NO:26 to linker-1(L1), and each L1 molecule covalently conjugated to the thiol group of Cys¹²⁹ in SEQ ID NO:10 (according to the numbering of SEQ ID NO:1). The compound may also be described as Ab-(FGF21ΔH-A129C-L1)₂, h38C2-(FGF21ΔH-A129C-L1)₂, and h38C2-(SEQ ID NO:10-L1)₂. It will be apparent that minor modifications to the sequence of the antibody, specific linker and FGF21 molecule may be possible.

The invention thus has been disclosed broadly and illustrated in reference to representative embodiments described above. Those skilled in the art will recognize that various modifications can be made to the present invention without departing from the spirit and scope thereof. All publications, patent applications, and issued patents, are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication, patent application or issued patent were specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety. Definitions that are contained in text incorporated by reference are excluded to the extent that they contradict definitions in this disclosure.

It is appreciated that certain features of the invention, which are, for clarity, described in the context of separate embodiments, may also be provided in combination in a single embodiment. Conversely, various features of the invention which are, for brevity, described in the context of a single embodiment, may also be provided separately or in any suitable sub-combination.

It is specifically contemplated that any limitation discussed with respect to one embodiment of the invention may apply to any other embodiment of the invention. Furthermore, any composition of the invention may be used in any method of the invention, and any method of the invention may be used to produce or to utilize any composition of the invention. In particular, any aspect of the invention described in the claims, alone or in combination with one or more additional claims and/or aspects of the description, is to be understood as being combinable with other aspects of the invention set out elsewhere in the claims and/or description.

The use of the term "or" in the claims is used to mean "and/or" unless explicitly indicated to refer to alternatives only or the alternative are mutually exclusive, although the disclosure supports a definition that refers to only alternatives and "and/or."

5 As used herein the specification, "a" or "an" may mean one or more, unless clearly indicated otherwise. As used herein in the claim (s), when used in conjunction with the word "comprising, "the words "a" or "an" may mean one or more than one. As used herein "another" may mean at least a second or more.

10 The words "comprises/comprising" and the words "having/including" when used herein with reference to the present invention are used to specify the presence of stated features, integers, steps or components but does not preclude the presence or addition of one or more other features, integers, steps, components or groups thereof.

ID	Buffer	pH	Sugar	Surfactant	EDTA mg/mL	L-Met mg/mL	%HMWS at initial (liquid)	%HMWS after 2 weeks at 25°C (Liquid)	%HMWS after 9 weeks at 25°C (Lyophilized)	%HMWS after 4 weeks at 40°C (Lyophilized)	%Acidic species at initial (Liquid)	%Acidic species after 4 weeks at 40°C (Lyophilized)
A	30 mM Acetate 20 mM	4.5	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	5.2	7.2	3.7	4.7	31.1	34.3
B	Succinate	4.5	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	5.9	25.2	4.0	4.9	31.8	40.2
C	30 mM Lactate	4.8	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	5.2	7.8	3.7	4.7	31.8	32.0
D	30 mM Malate	4.8	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	7.6	16.8	4.4	5.6	32.3	34.7
E	30 mM Malate 20 mM	4.8	45 mg/mL trehalose dihydrate	0.25mg/mL PS20	0.025	0.05	7.8	15.7	4.9	7.4	32.1	34.0
F	Succinate	4.8	45 mg/mL trehalose dihydrate	0.25mg/mL PS20	0.025	0.05	6.6	23.5	4.3	5.7	31.3	38.2
G	30 mM Malate 50 mM NaCl	4.8	60 mg/mL trehalose dihydrate	0.25mg/mL PS20	0.05	0.1	9.7	16.7	5.0	6.9	31.9	33.1
H	30 mM Malate	4.8	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.4 mg/mL Poloxamer188	0.05	0.1	7.9	17.8	4.7	5.8	31.5	34.4
I	30 mM Malate 50 mM KCl	4.8	60 mg/mL trehalose dihydrate, 20 mg/ml mannitol	0.25mg/mL PS20	0.025	0.05	9.5	15.6	5.1	6.7	32.9	34.5
J 20 mg/mL	30 mM Acetate	4.8	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	6.7	13.1	4.5	4.8	32.4	32.8
K 20 mg/mL	20 mM Succinate	4.8	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	8.1	16.7	5.0	5.8	32.0	35.9
L	30 mM Acetate	5	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	6.4	7.8	4.5	4.8	32.2	31.9
M	20 mM Succinate	5	90 mg/mL trehalose dihydrate	0.5 mg/mL PS20	0.05	0.1	7.1	19.2	4.6	4.9	31.4	36.2

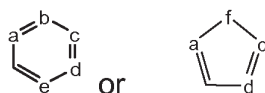
Table 23 Lyophilized and Liquid formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

ID	protein conc mg/mL	Buffer	pH	Excipients	Liq/ Lyo	%HMWS at initial	%HMWS after 2 weeks at 40°C	%HMWS after 8 weeks at 25°C	%HMWS after 4 weeks at 40°C	%Acidic species at initial	%Acidic species after 4 wks at 40°C	%Frag at initial	%Frag after 2 weeks at 40°C
A	10	30 mM Lactic Acid	4.8	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.05 mg/mL EDTA, 0.1 mg/mL L-Methionine, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	5.5	5.4	5.5	5.2	38.1	40.4	2.1	2.0
B	10	30 mM Lactic Acid	4.8	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.05 mg/mL EDTA, 0.1 mg/mL L-Methionine, 0.5 mg/mL PS20	Liq	5.5	14.1	8.7	-	38.2	-	1.7	1.4
C	10	30 mM Lactic Acid	5.1	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.05 mg/mL EDTA, 0.1 mg/mL L-Methionine, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	5.8	5.6	5.9	5.1	38.5	40.4	1.7	2.2
D	10	30 mM Lactic Acid	5.1	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.05 mg/mL EDTA, 0.1 mg/mL L-Methionine, 0.5 mg/mL PS20	Liq	5.8	16	9.3	-	39.1	-	1.7	1.3
E	10	30 mM Lactic Acid	4.5	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.05 mg/mL EDTA, 0.1 mg/mL L-Methionine, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	5.5	5.4	5.3	5.1	38.9	40.3	2.0	0.8d
F	10	30 mM Lactic Acid	4.5	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.05 mg/mL EDTA, 0.1 mg/mL L-Methionine, 0.5 mg/mL PS20	Liq	5.5	13.5	8.7	-	39.1	-	1.7	12.4
G	10	15 mM Lactic Acid	4.8	45 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	5.4	5.5	5.3	6.4	38.6	40	1.7	2.2
H	20	30 mM Lactic Acid	4.8	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	5.8	5.5	5.6	5.4	38.5	39.5	2.0	2.0
J	40	30 mM Lactic Acid	4.8	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	7.3	6.4	5.7	6.2	40.4	39.3	1.7	2.2
K	10	30 mM Lactic Acid	4.8	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.5 mg/mL PS20	Lyo	5.4	5.2	5.2	5.1	40.2	40.3	2.0	2.1
L	10	30 mM Lactic Acid	4.8	90 mg/mL Trehalose dihydrate, 0.5 mg/mL PS20	Liq	5.4	13.5	nc	-	39.7	-	1.7	10.9

Table 24 Lyophilized and Liquid formulations of Ab-L1-FGF21ΔH-A129C (Liq=Liquid, Lyo= lyophilized)

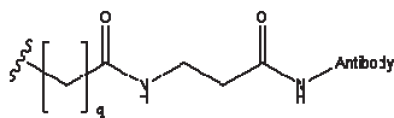
Claims

1. A composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody or antigen binding portion thereof via a linker.
2. A composition as claimed in claim 1, wherein the linker is covalently attached to the FGF21 molecule through the side chain of a linking residue at amino acid position 79, 125 or 129 according to the numbering of SEQ ID NO:1.
3. A composition as claimed in claim 2, wherein residue 129 is cysteine and the linker is covalently attached to the thiol group of cysteine 129.
4. A composition as claimed in any preceding claim, wherein the linker comprises the formula X-Y-Z; wherein X is a biologically compatible connecting chain including any atom selected from the group consisting of C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, and may comprise a polymer or block co-polymer, and is covalently linked to the linking residue where the linker is linear, Y is an optionally present recognition group comprising at least a ring structure; and Z is an attachment moiety comprising a covalent link to an amino acid side chain in the combining site of the antibody.
5. A composition as claimed in claim 4, wherein Y has the optionally substituted structure:



wherein a, b, c, d, and e are independently carbon or nitrogen; f is carbon, nitrogen, oxygen, or sulfur;

6. A composition as claimed in claim 5, wherein Y is phenyl.
7. A composition as claimed in any one of claims 4-6, wherein Z has the formula



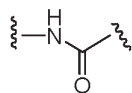
when covalently attached to the antibody, and q = 1 or 2.

8. A composition as claimed in claim 7, wherein q=2.
9. A composition as claimed in any one of claims 4-8, wherein X is a group comprising three components; Xp-Xs-Xy, wherein Xp is a group specifically adapted to be combinable with the side chain of the linking residue of the

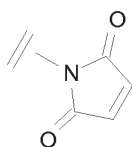
FGF21 protein, Xs is a spacer region of the X group, and Xy is a group adapted to bind to the Y group.

10. A composition as claimed in claim 9, wherein Xy is selected from an amide bond, an enamine bond, or a guanidinium bond.

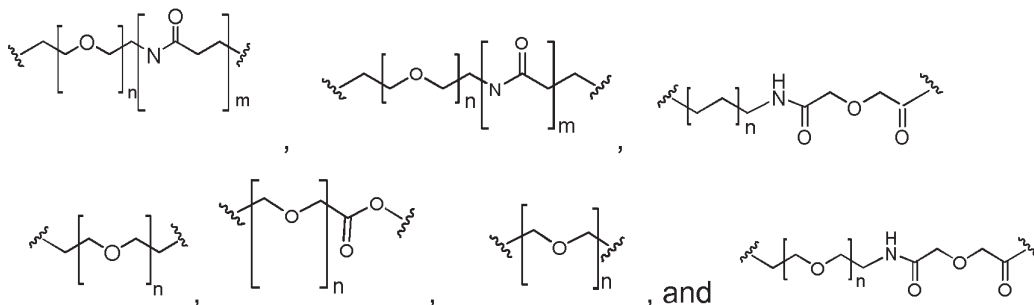
5 11. A composition as claimed in claim 10, wherein Xy has the formula:



12. A composition as claimed in any one of claims 4-11, wherein Xp comprises the formula:

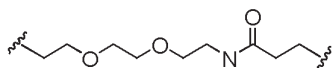


10 13. A composition as claimed in any one of claims 4-12, wherein Xs is selected from the group consisting of

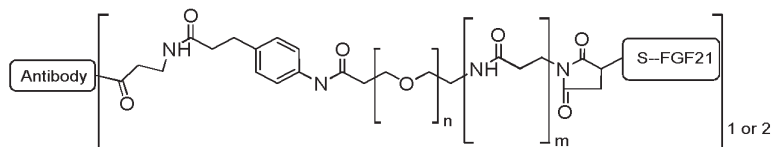


where n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10, and m is present or absent.

15 14. A composition as claimed in claim 13, wherein Xs comprises the formula:

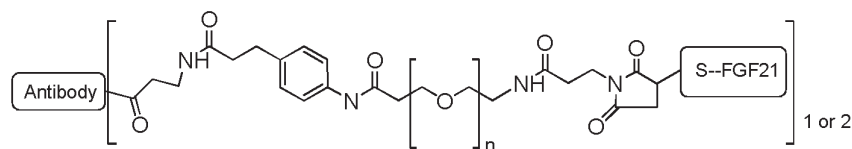


15. A composition as claimed in claim 14, comprising the formula:



wherein the antibody is linked at the combining site of the antibody, S-FGF21 is the covalent linkage to a thiol-bearing side chain of the linking residue, n=1, or 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10; and m is present or absent.

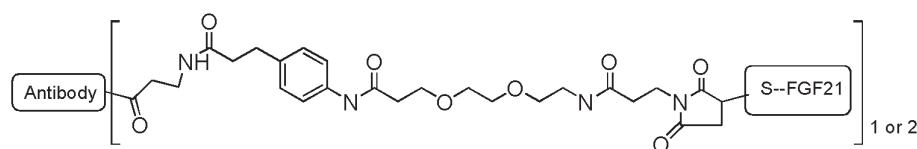
16. A composition as claimed in claim 13 or 14, comprising the formula:



wherein the antibody is linked at the combining site of the antibody, S-FGF21 is a covalent linkage to a thiol-bearing side chain of the linking residue, and $n=1$, or 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10.

17. A composition as claimed in claim 15 or 16, wherein $n=1, 2, 3$, or 4.

18. A composition as claimed in claim 17, comprising the formula:



wherein the antibody is linked at the combining site of the antibody, and S-FGF21 is linked at a thiol bearing side chain of the linking residue.

19. A composition as claimed in any preceding claim, wherein the linker is covalently conjugated to the ϵ -amino group of lysine93 of the heavy chain of the antibody according to Kabat numbering.

20. A compound as claimed in any preceding claim, wherein the antibody is a full-length antibody, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, diabody, minibody comprising V_H and V_L domains from h38c2 or m38C2, or full length antibody comprising the V_H and V_L domains from h38c2 or m38C2 and a constant domain selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, and may be h38C2 IgG1.

21. A composition as claimed in any preceding claim, wherein the antibody is an aldolase antibody.

22. A composition as claimed in claim 21, wherein the aldolase antibody comprises a V_L region comprising SEQ ID NO:27.

23. A composition as claimed in claim 22, wherein the aldolase antibody comprises a V_H region comprising SEQ ID NO:28.

24. A composition as claimed in claim 23, wherein the aldolase antibody comprises a light chain comprising SEQ ID NO:25.

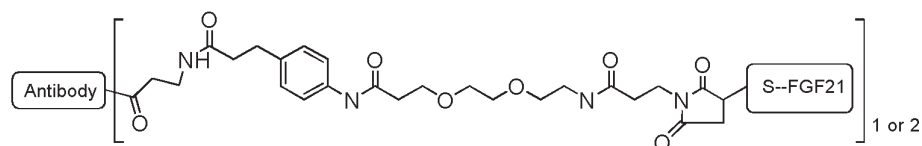
25. A composition as claimed in claim 24, wherein the aldolase antibody comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:26.

26. A composition as claimed in any preceding claim, wherein the FGF21 molecule comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, and SEQ ID NO:16.

27. A composition as claimed in any preceding claim, wherein the FGF21 molecule comprises the sequence SEQ ID NO:3.

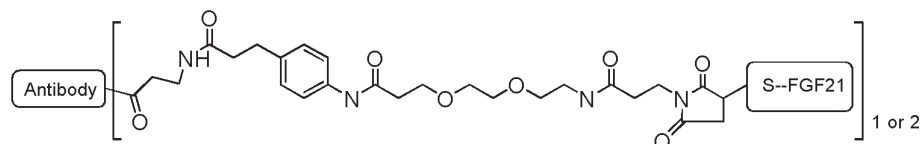
28. A composition as claimed in any preceding claim, wherein the FGF21 molecule comprises the sequence SEQ ID NO:10.

29. A composition as claimed in claim 28, comprising the formula



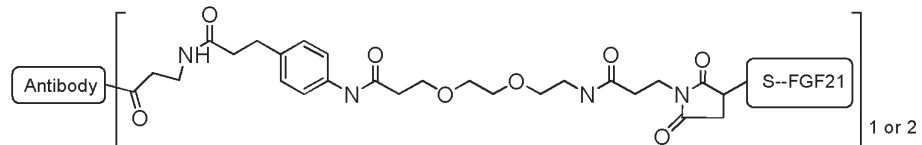
wherein the antibody is linked at the combining site and comprises SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26, and S-FGF21 is the thiol-bearing side chain of Cys129 of SEQ ID NO:10.

30. A composition as claimed in any one of claims 1-27, comprising the formula



wherein the antibody is linked at the combining site and comprises SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26, and S-FGF21 is the thiol-bearing side chain of Cys125 of SEQ ID NO:7.

31. A composition as claimed in any one of claims 1-27, comprising the formula



wherein the antibody is linked at the combining site and comprises SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26, and S-FGF21 is the thiol-bearing side chain of Cys79 of SEQ ID NO:12.

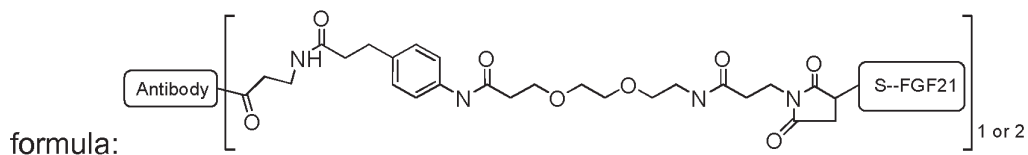
32. A composition comprising a FGF21 molecule covalently connected to a half-life-increasing moiety at a linking residue located at residue number 79, 125 or 129 according to the numbering of SEQ ID NO:1.

33. A composition selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, and SEQ ID NO:13.

34. A composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21 forming a conjugated protein-antibody complex, such that the conjugated protein-antibody complex has at least one of the following characteristics:

(a) a plasma $T_{1/2}$ following SC injection of at least about 30 hrs in murine models,

(b) a potency of less than about 4 nM in a Glut1 Taqman assay, and characterized in that the conjugated protein-antibody complex has the



wherein the antibody is linked at the combining site and comprises SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26, and S-FGF21 is the thiol-bearing side chain of either Cys 125 of SEQ ID NO:7 or Cys129 of SEQ ID NO:10.

35. A composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody via a linker, wherein the linker is covalently attached to the side chain of a linking residue within FGF21 forming a conjugated protein-antibody complex, such that the conjugated protein-antibody complex has at least one of the following characteristics:

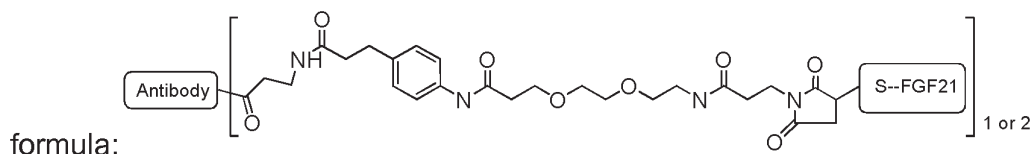
(a) a plasma $T_{1/2}$ following SC injection of at least about 33 hrs in murine models,

(b) a plasma $T_{1/2}$ following SC injection of at least about 35 hrs in rat models,

(c) a plasma $T_{1/2}$ following SC injection of at least about 45 hrs in primate models,

(d) a potency of less than about 3 nM in a Glut1 Taqman assay, and

characterized in that the conjugated protein-antibody complex has the



wherein the antibody is linked at the combining site and comprises SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26, and S-FGF21 is the thiol-bearing side chain of Cys129 of SEQ ID NO:10.

36. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a compound as claimed in any preceding claim in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

37. A method of treating diabetes, diabetes related conditions, obesity, dislipidemia, hypertension, hepatosteaotosis, or cardiovascular disease; or controlling or reducing weight levels; or controlling glycemic control; or increasing insulin secretion, HDL levels, or levels of non-esterified free fatty acids or adipsin; or reducing levels of blood glucose, glucagon, triglyceride, fructosamine, low density cholesterol, or C-reactive protein; comprising administering a therapeutically effective amount of a compound as claimed in any one of claims 1-35 or a pharmaceutical composition as claimed in claim 36 to a subject.

38. Use of a composition as claimed in any one of claims 1-35 or a pharmaceutical composition as claimed in claim 36 in the preparation of a medicament for treating diabetes related conditions, obesity, dislipidemia, hypertension, hepatosteaotosis, or cardiovascular disease; or controlling or reducing weight levels; or controlling glycemic control; or increasing insulin secretion, HDL levels, or non-esterified free fatty acid levels; or reducing levels of blood glucose, glucagon, triglyceride, fructosamine, low density cholesterol, or C-reactive protein.

Figure 1
VL

	Fr1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
12345678901234567890123	1	3	4	5	7	9	0
45678901abcde234	2	567890123456789	0123456	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	
m38c2 DVVMTQTPLSLPVRLGDAQASISC	RSSQSLHTYGSPYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGGTDFTLIRISRVAEADLGVPFC	SQGTSLPYT	FGGGTKLEIK	
*** * * * * *** *			*	* * * * *		*	
h38c2 ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RSSQSLHTYGSPYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPSRFSGSGGTDFTLITISLQPEDFAVPFC	SQGTSLPYT	FGGGTKVEIK	
**	*	*****	*	** ** *	*	* * * * *	
DPK-9 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----YLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGGTDFTLITISLQPEDFATYYC	QQSYSTP		
JK4						LT	FGGGTKVEIK
VH							
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
123456789012345678901234567890	1	3	4	5	7	9	1
1ab2345	67890123456789	012abc3456789012345	67890123456789012345	67890123456789012abc345678901234	56789012	34567890123	
m38c2 EVKLIVSGGGIVQPGGTMKLSCEISGLTFR	N--YWMS	WVRQSPKGLEWVA	EIRLRSDNYATHYAESVKG	KFTISRDDSKSRLLYLQMNLSLRDTEGTIYYCKY	YFY-SFSY	WGQGTILVTVSA	
*	*** ** *	*	*	* * *	*	*	*
h38c2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	N--YWMS	WVRQSPKGLEWVS	EIRLRSDNYATHYAESVKG	RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRADTEGTIYYCKT	YFY-SFSY	WGQGTILVTVSS	
*	*	*	*	* * * * *	*	* * *	
DP-47 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S---YAMS	WVRQAPKGLEWVS	AISG---SGGSTYYADSVKG	RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRADTEAVYYCAK			
JH4						YFDY	WGQGTILVTVSS

2/24

Figure 2A

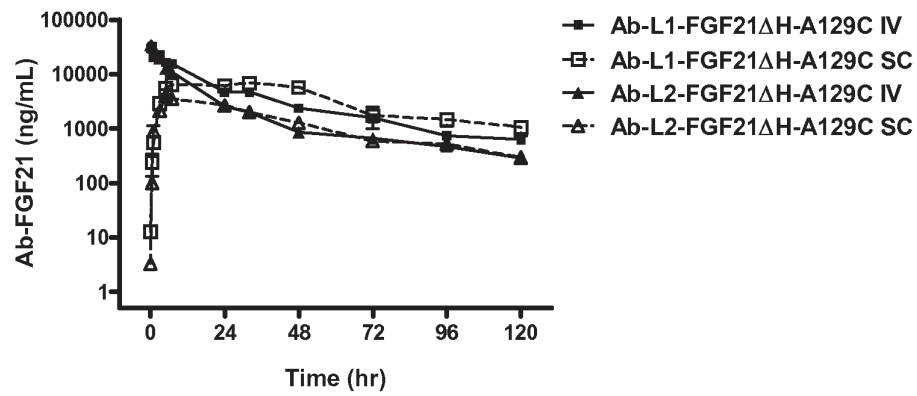


Figure 2B

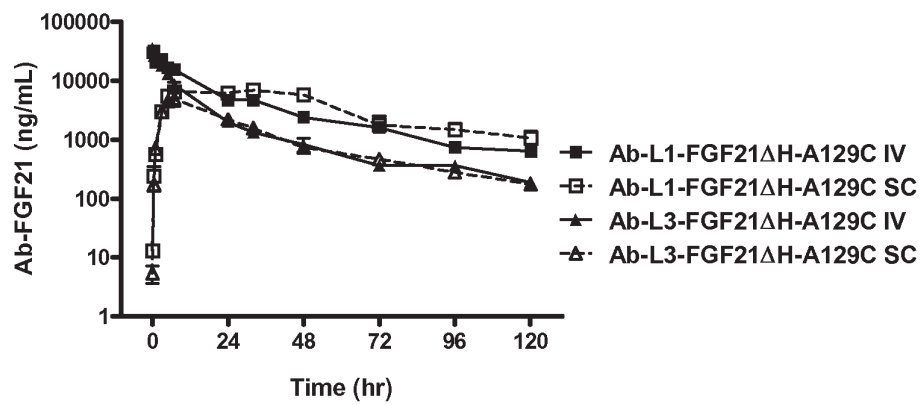
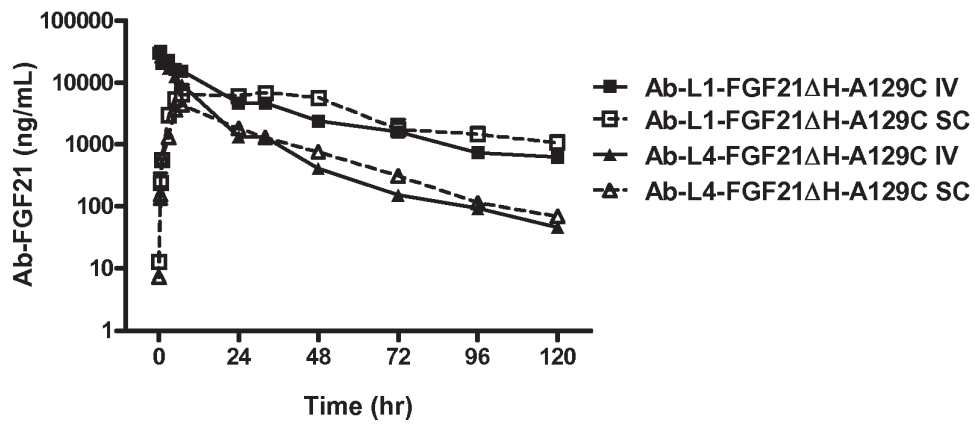


Figure 2C



3/24

Figure 3A

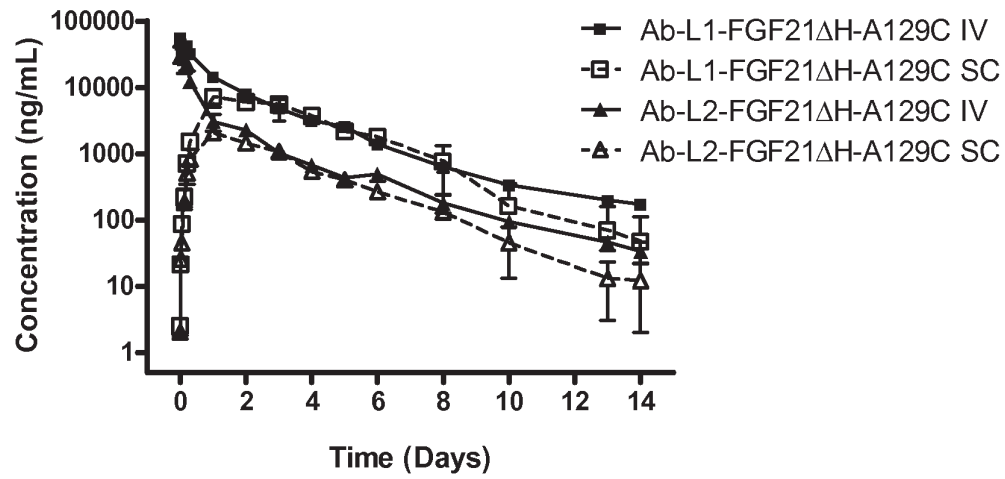
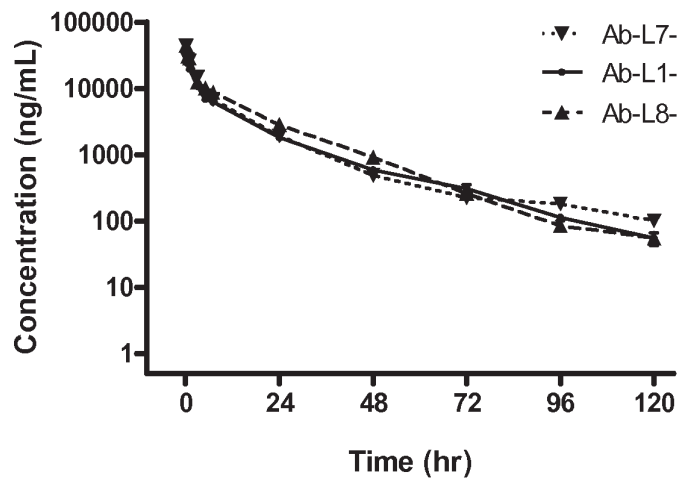


Figure 3B

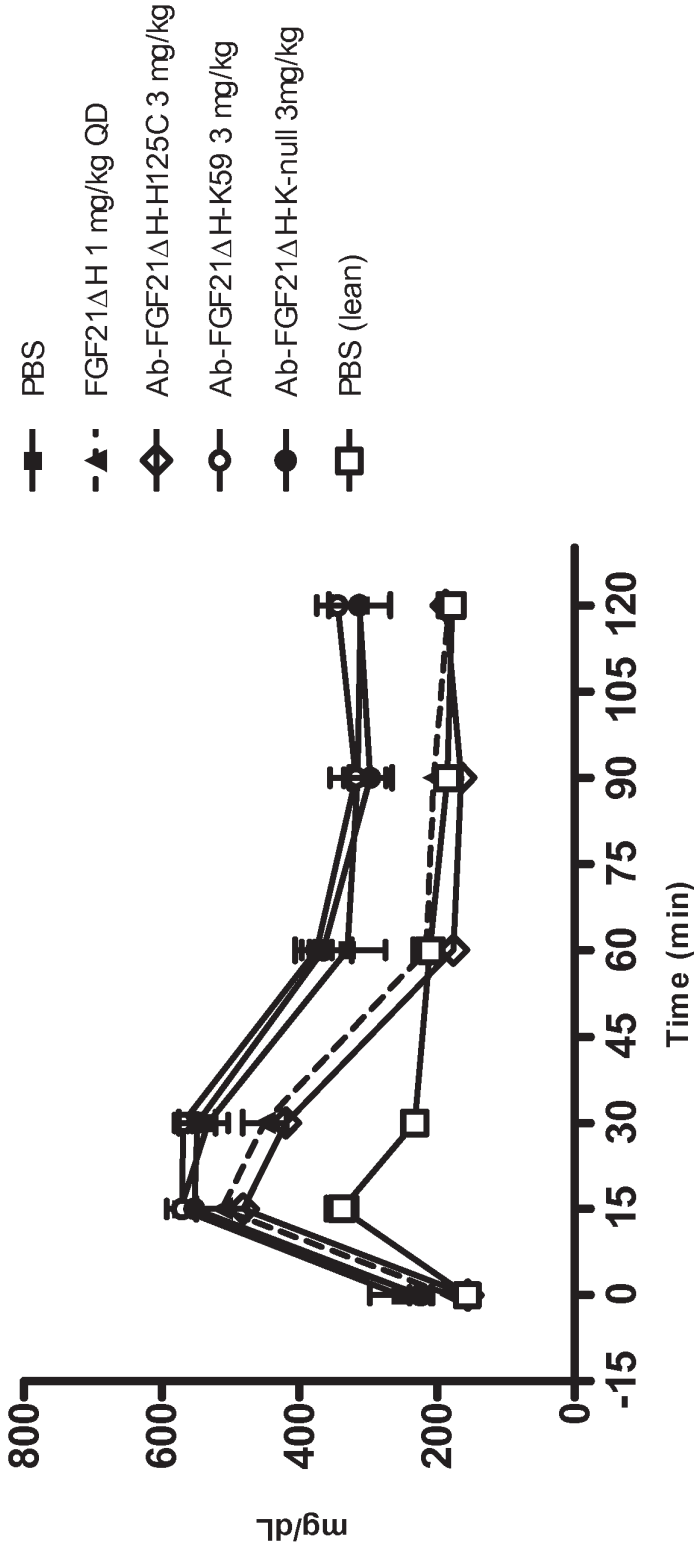


4/24

Figure 4A



Figure 4B



6/24

Figure 5A

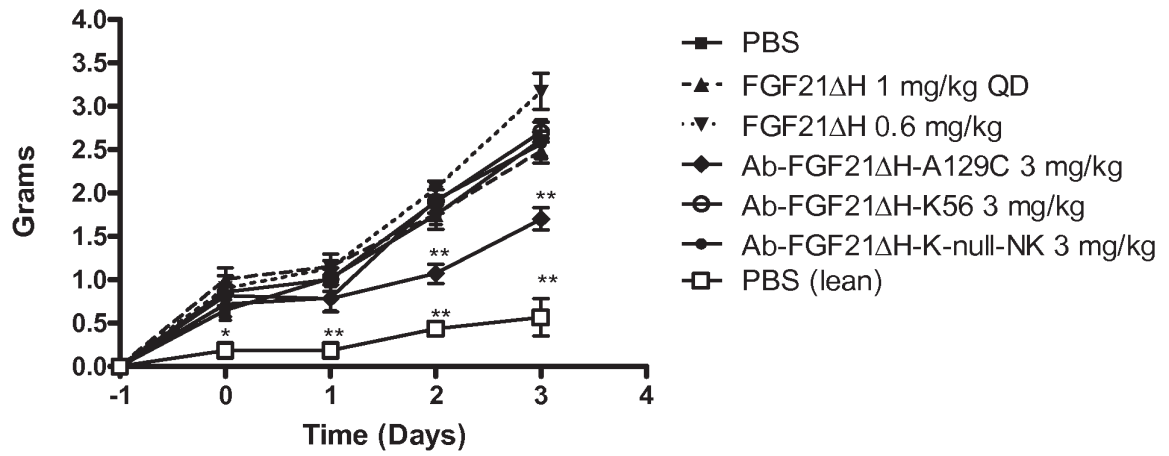


Figure 5B

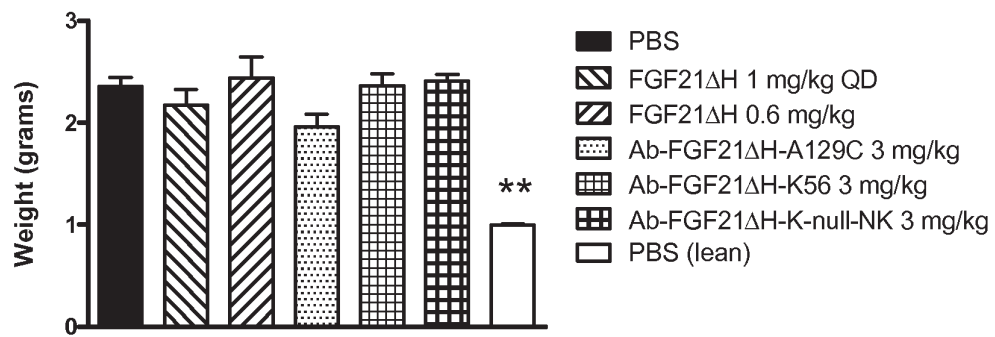


Figure 6A

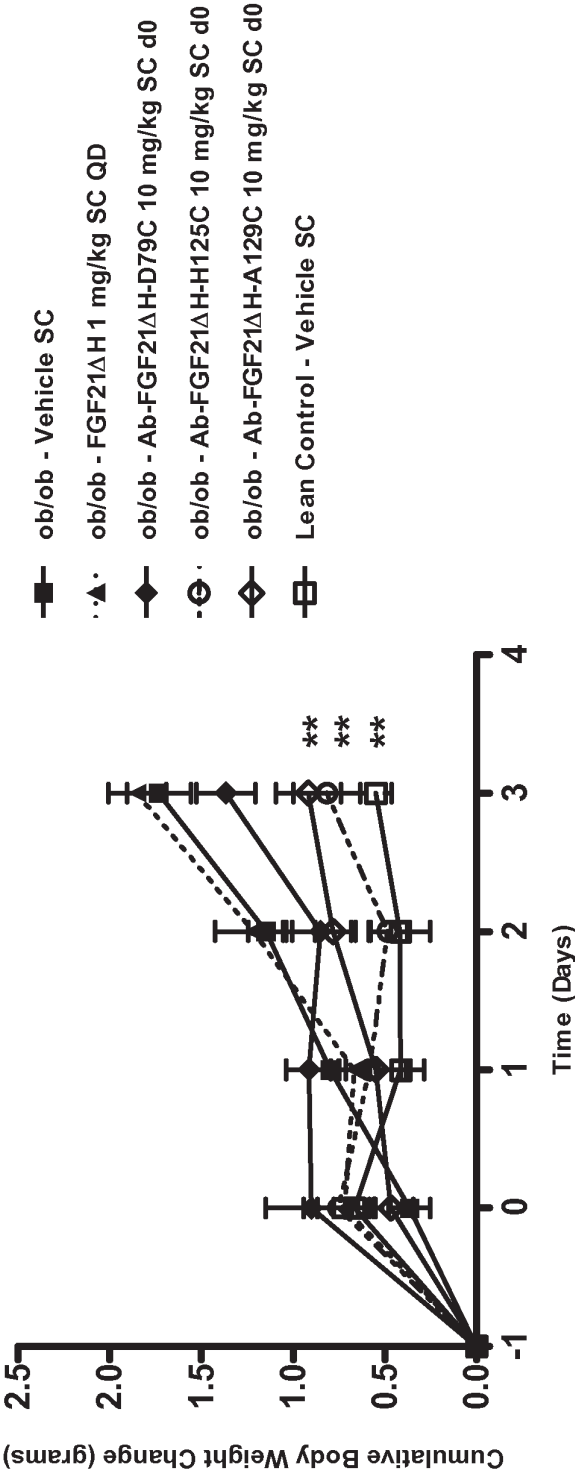


Figure 6B

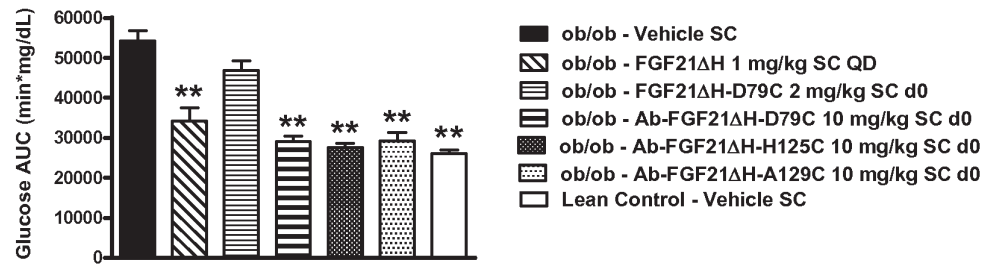


Figure 6C

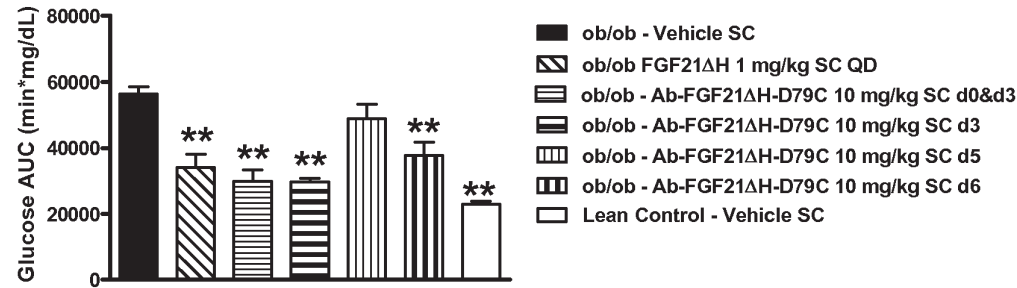
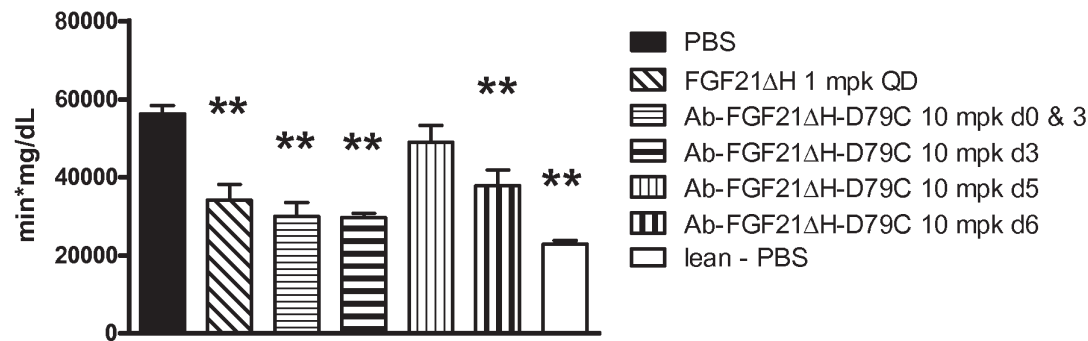


Figure 6D



9/24

Figure 6E

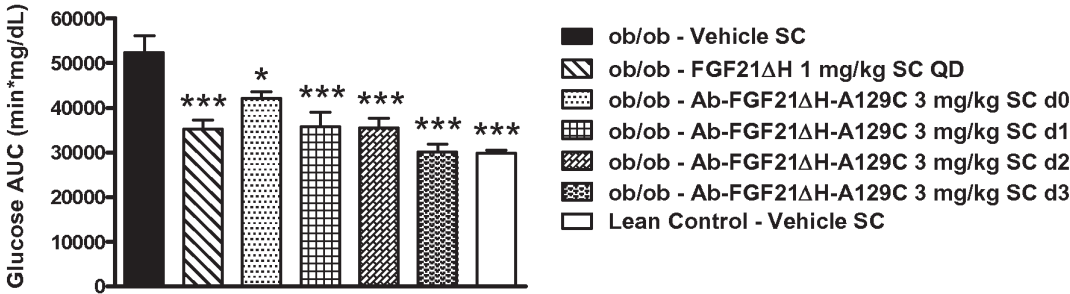


Figure 6F

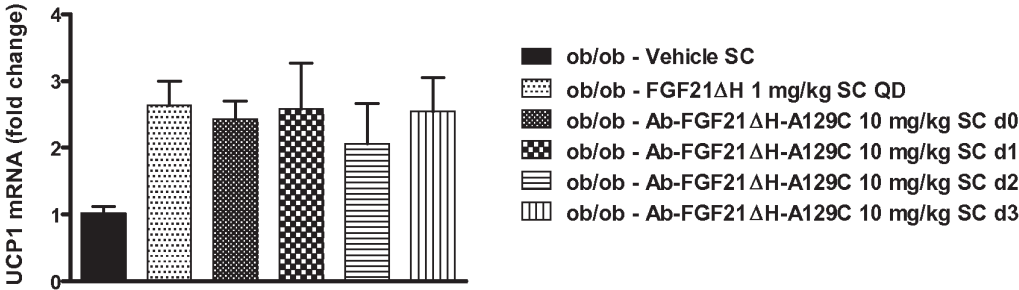


Figure 6G

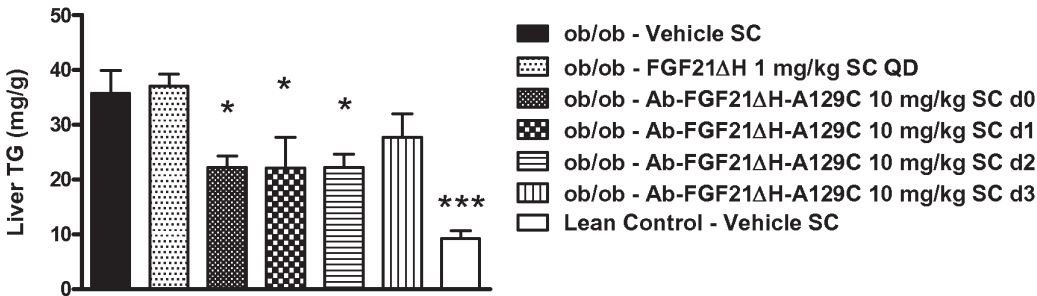
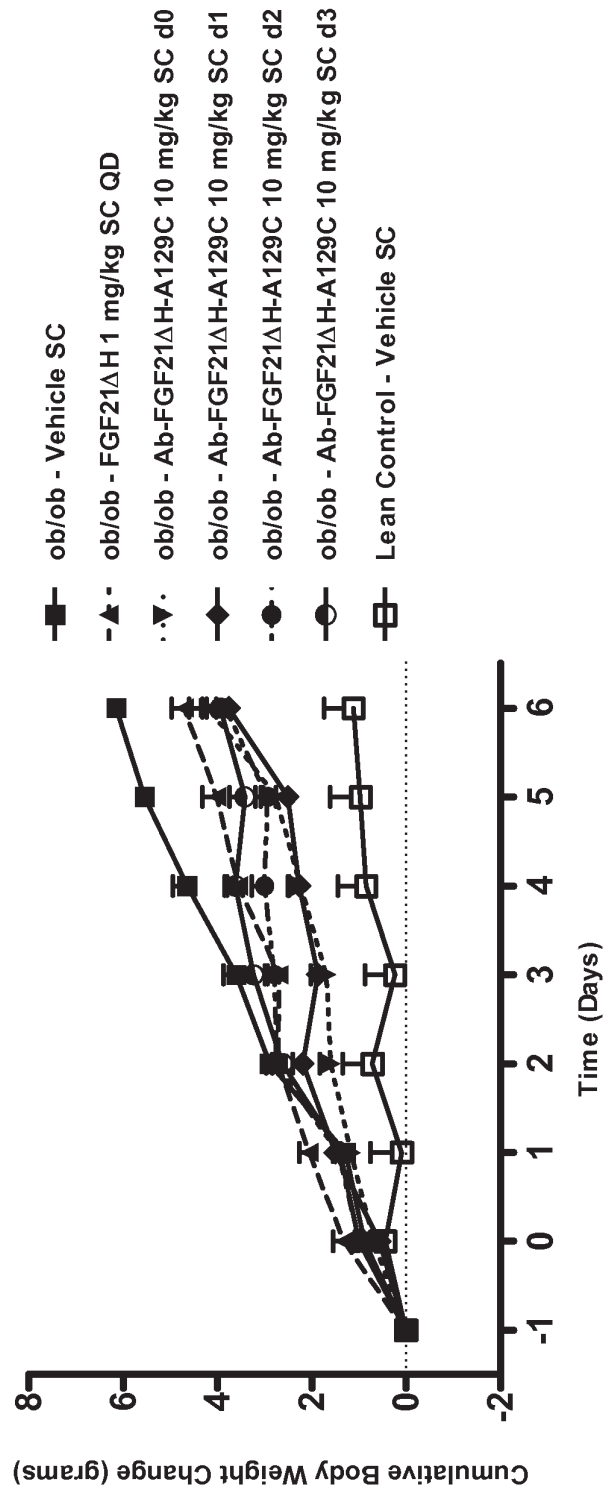


Figure 6H



11/24

Figure 7A

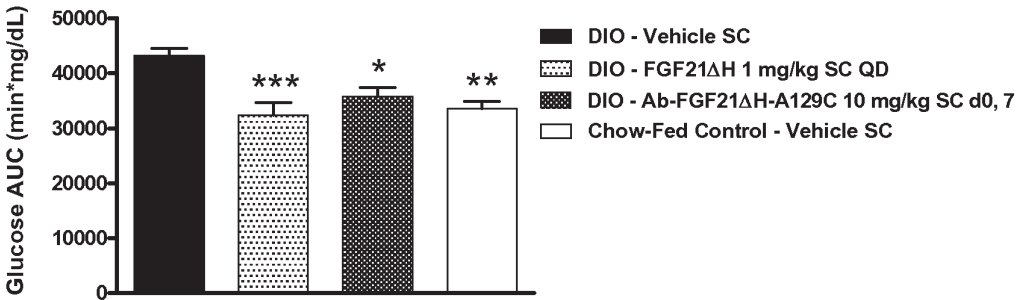
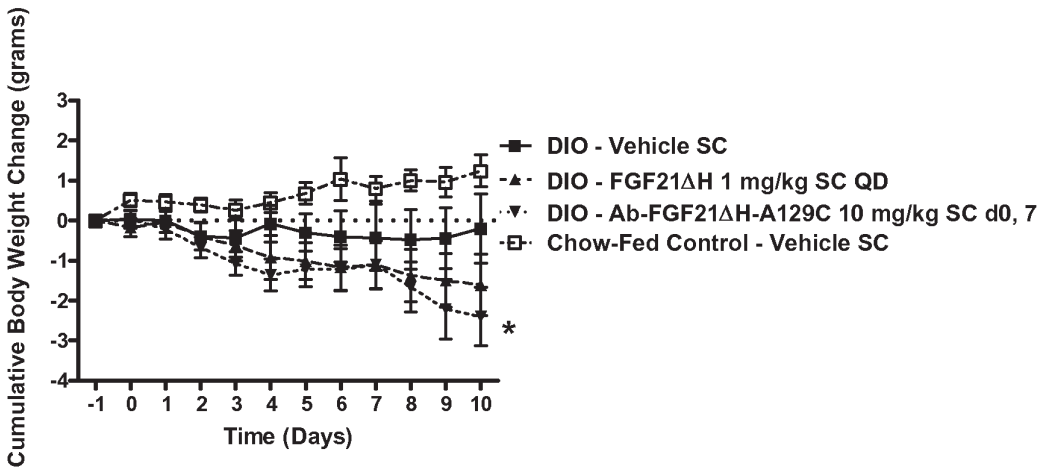


Figure 7B



12/24

Figure 7C

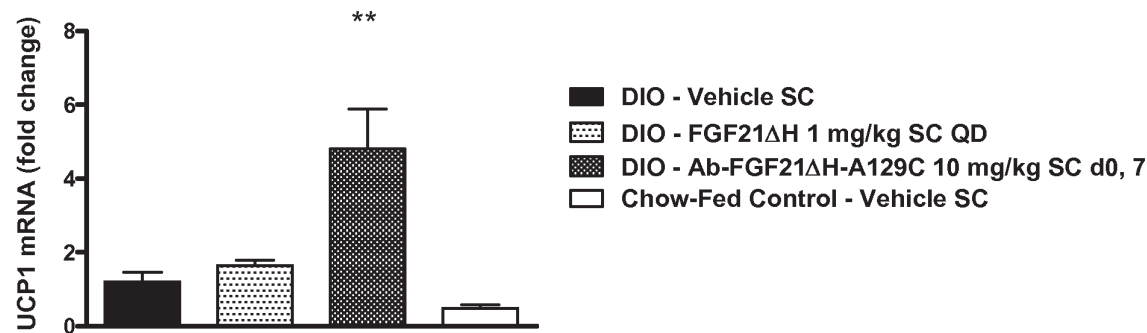


Figure 7D

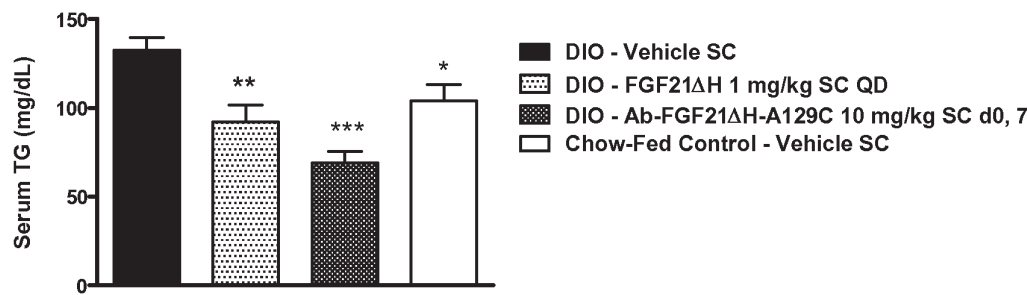


Figure 7E



Figure 7F

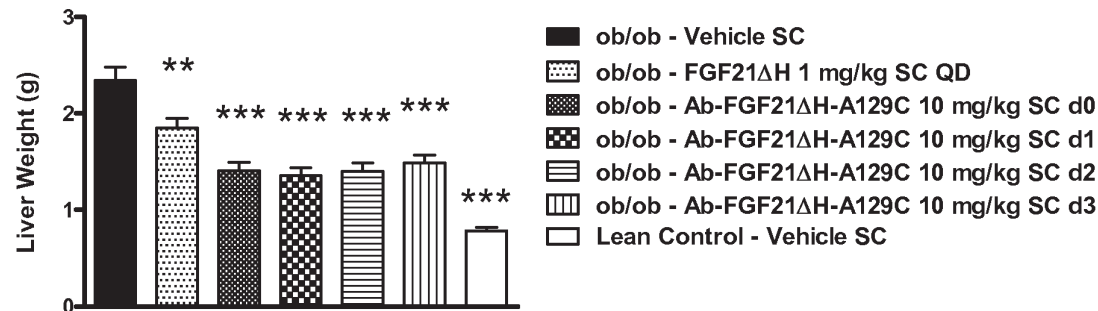


Figure 7G

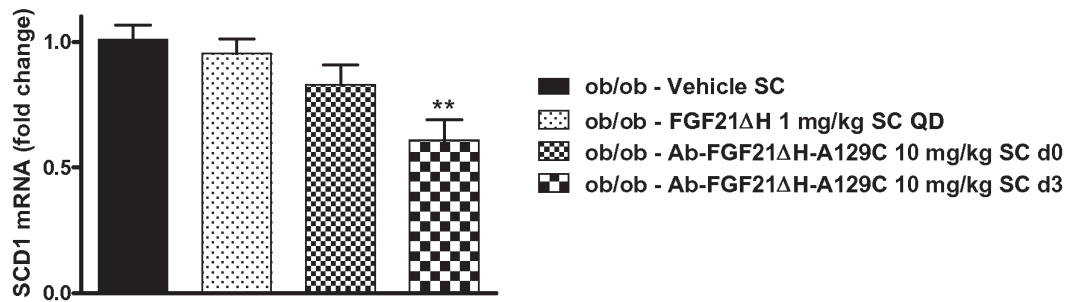


Figure 7H

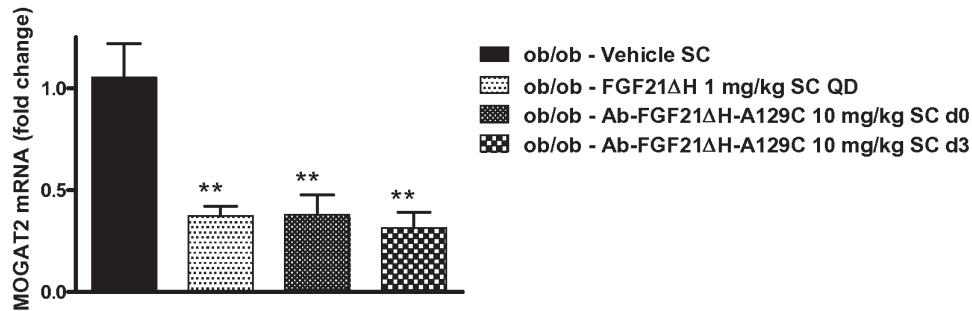


Figure 7i

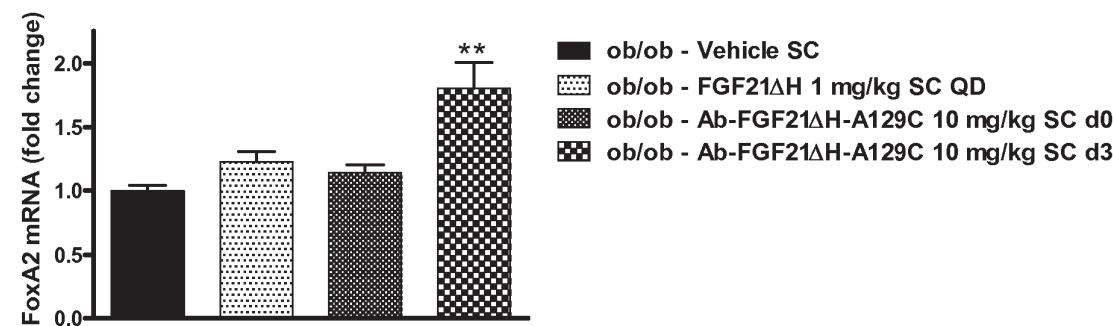


Figure 7J

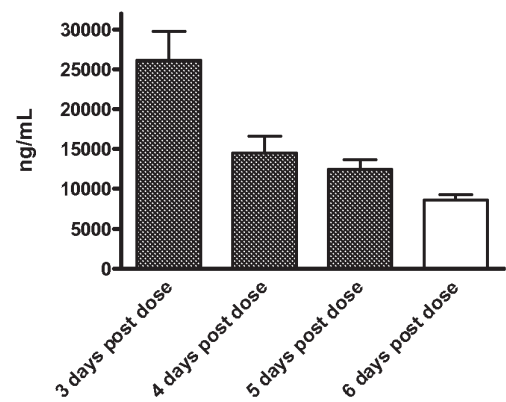


Figure 7K

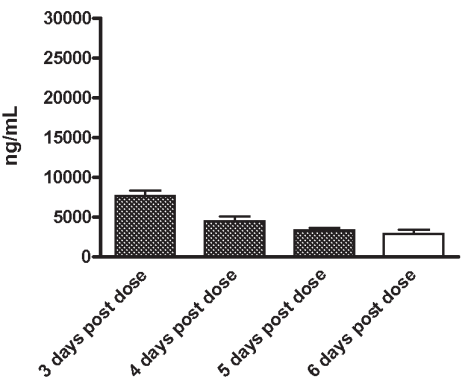


Figure 8A

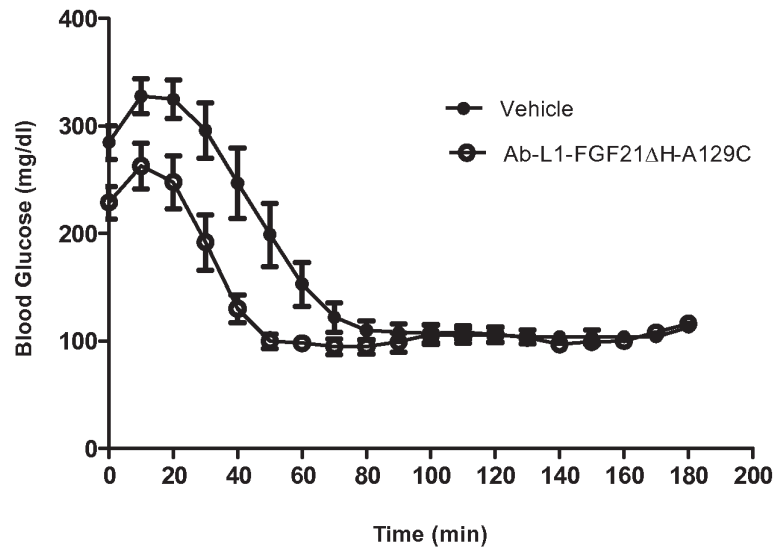


Figure 8B

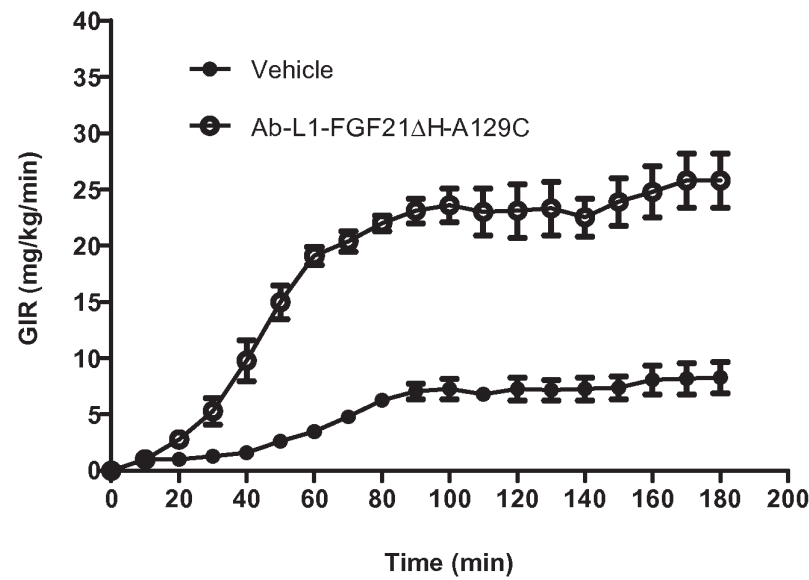


Figure 8C

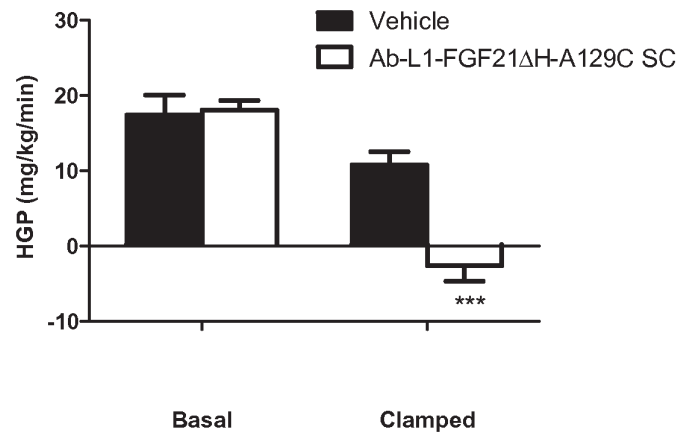
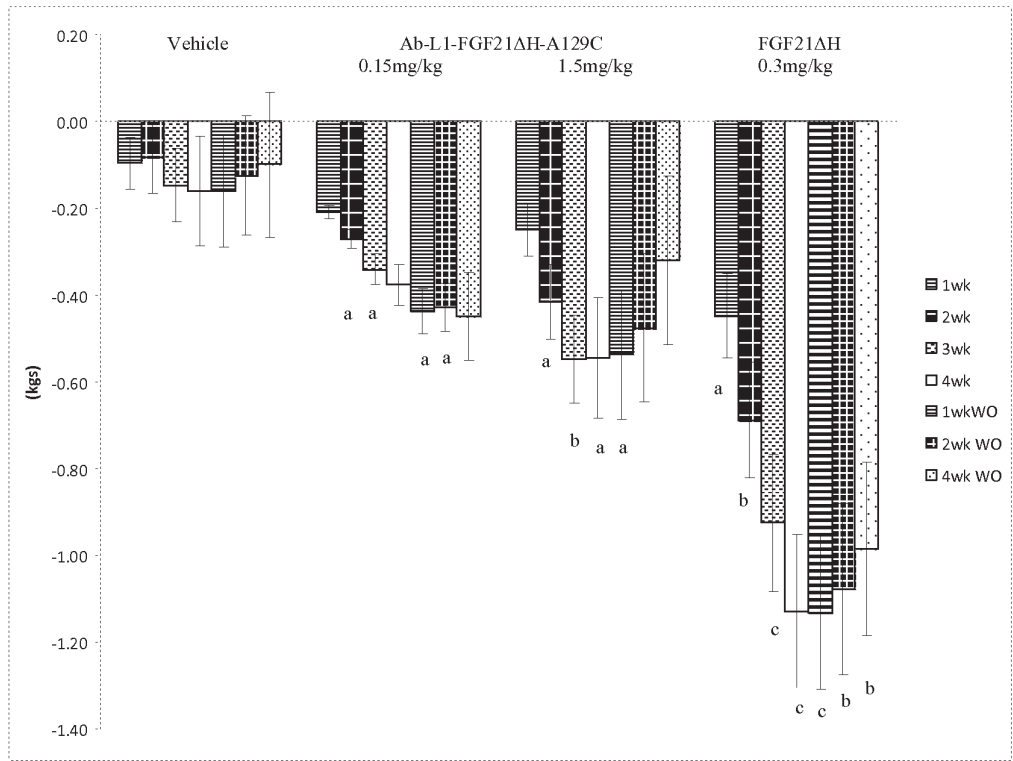


Figure 9A



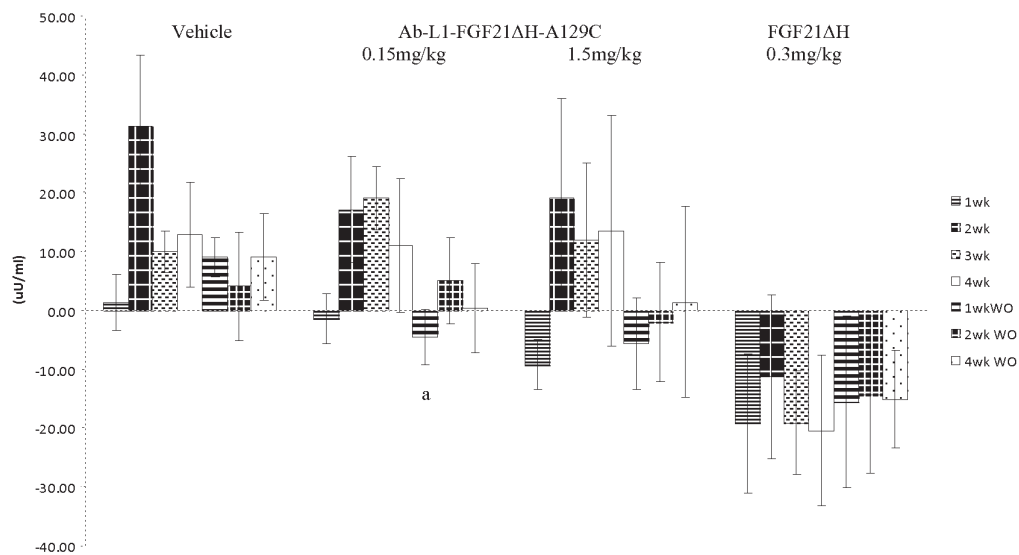


Figure 9D

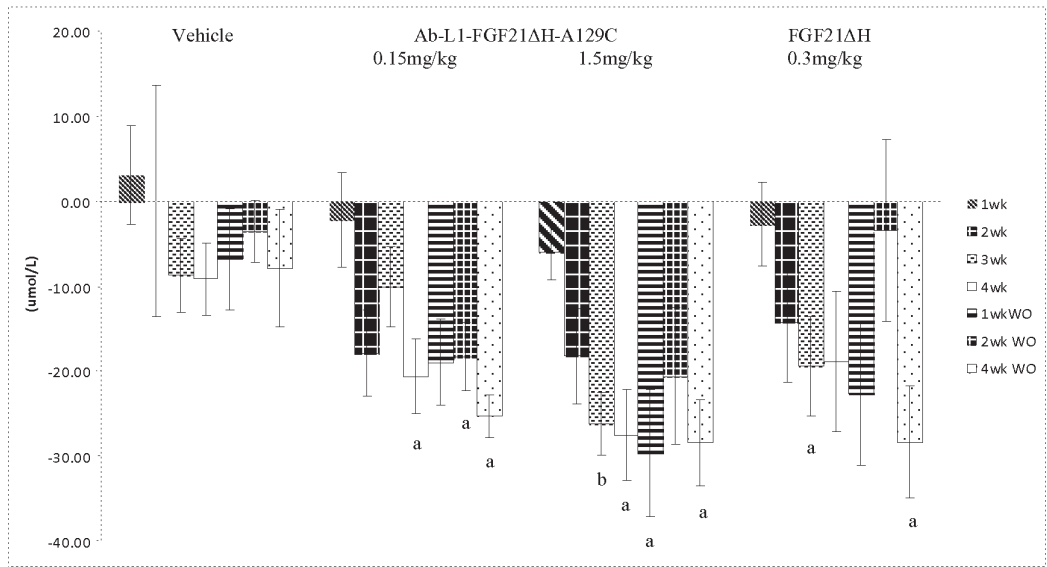


Figure 9E

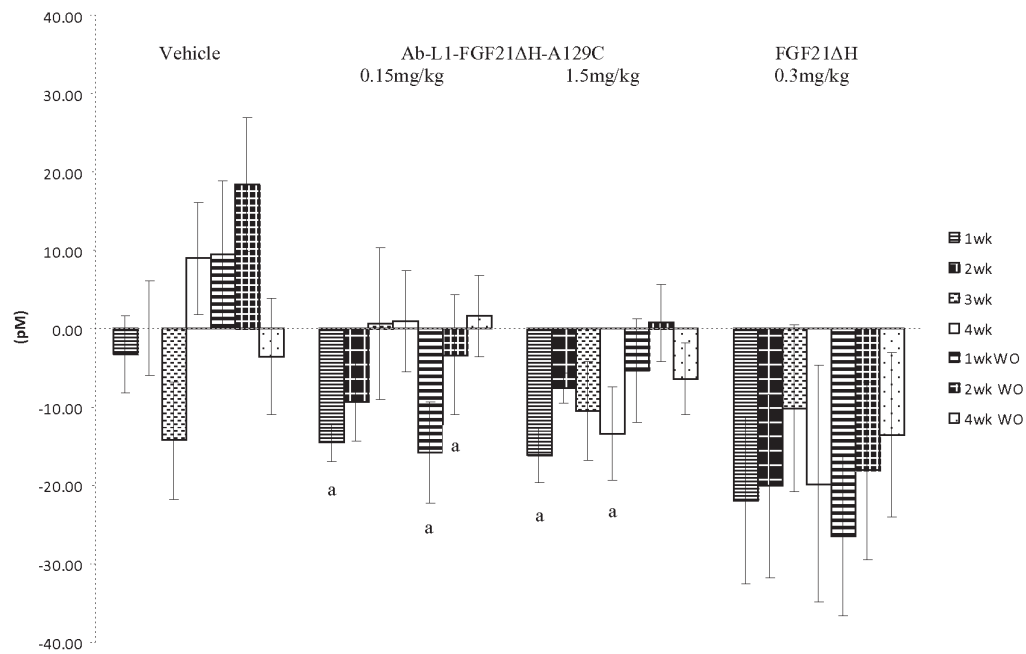


Figure 9F

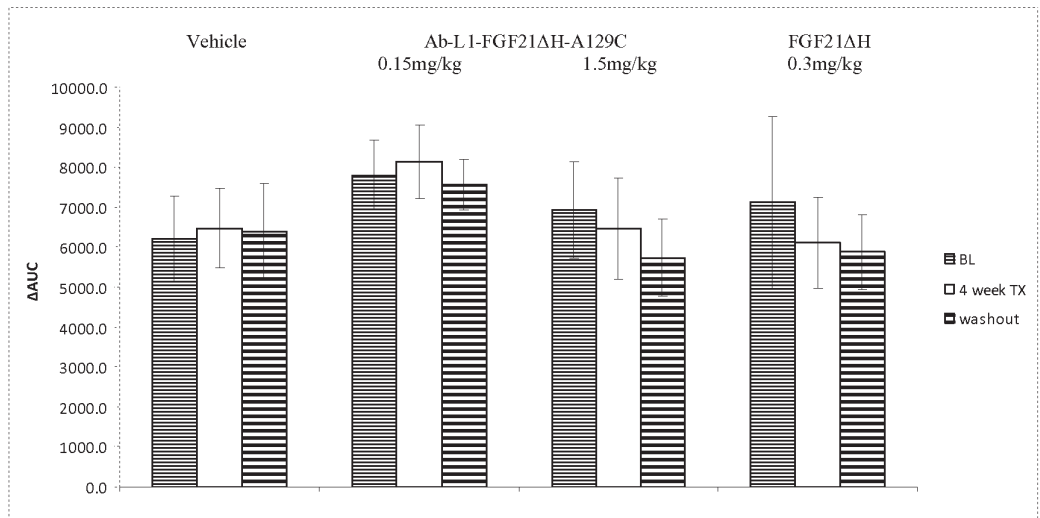
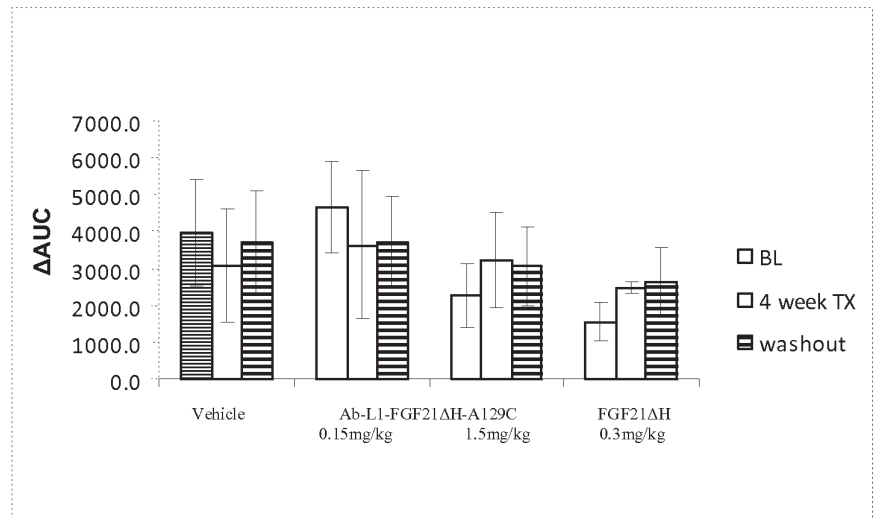


Figure 9G



20/24

Figure 9H

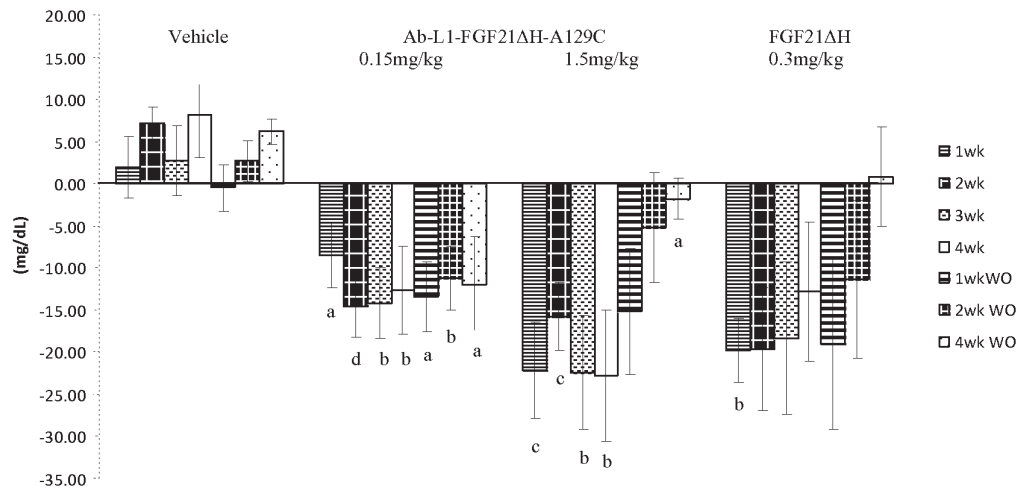


Figure 9i

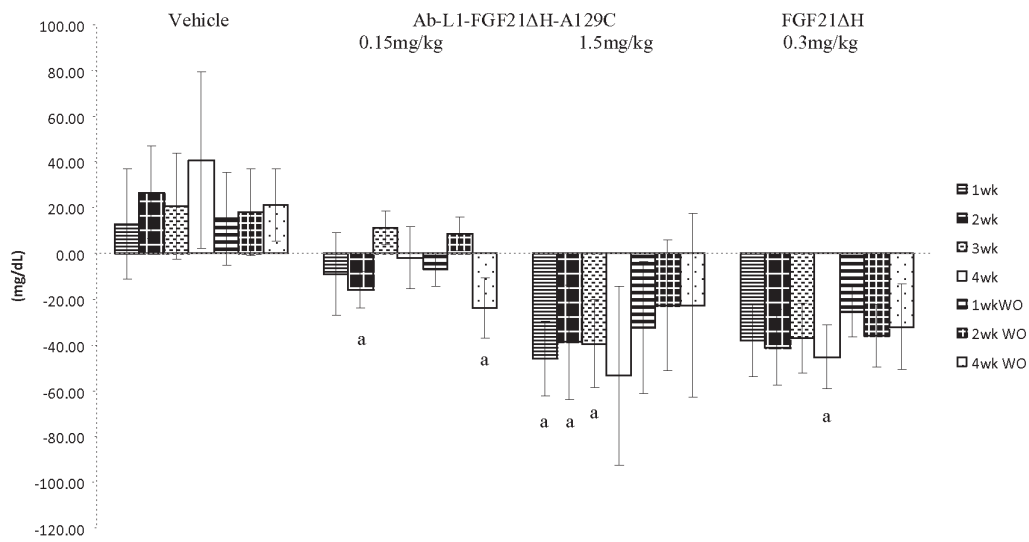


Figure 9J

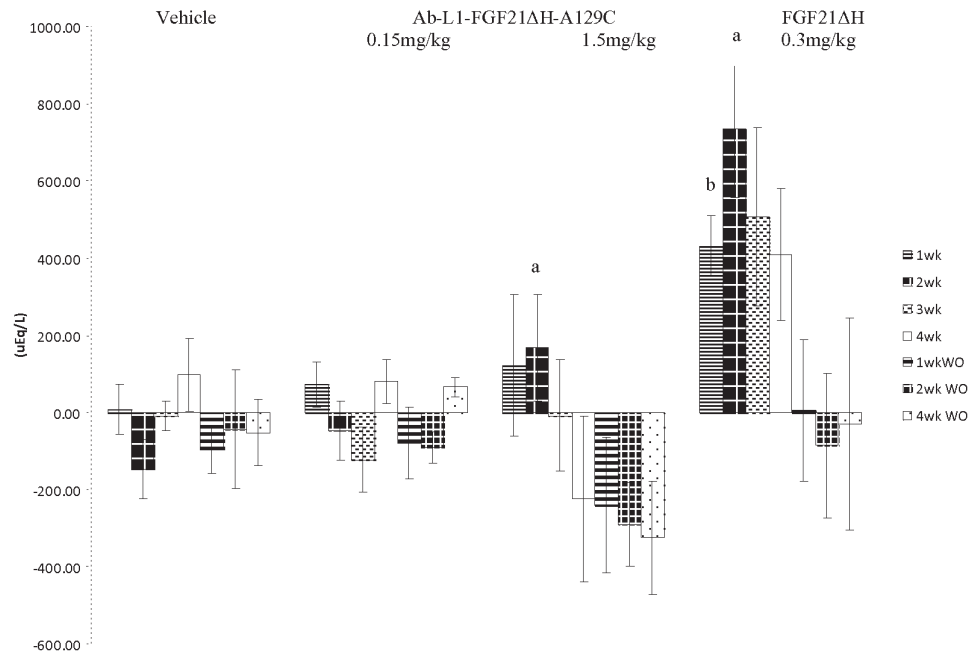


Figure 9K

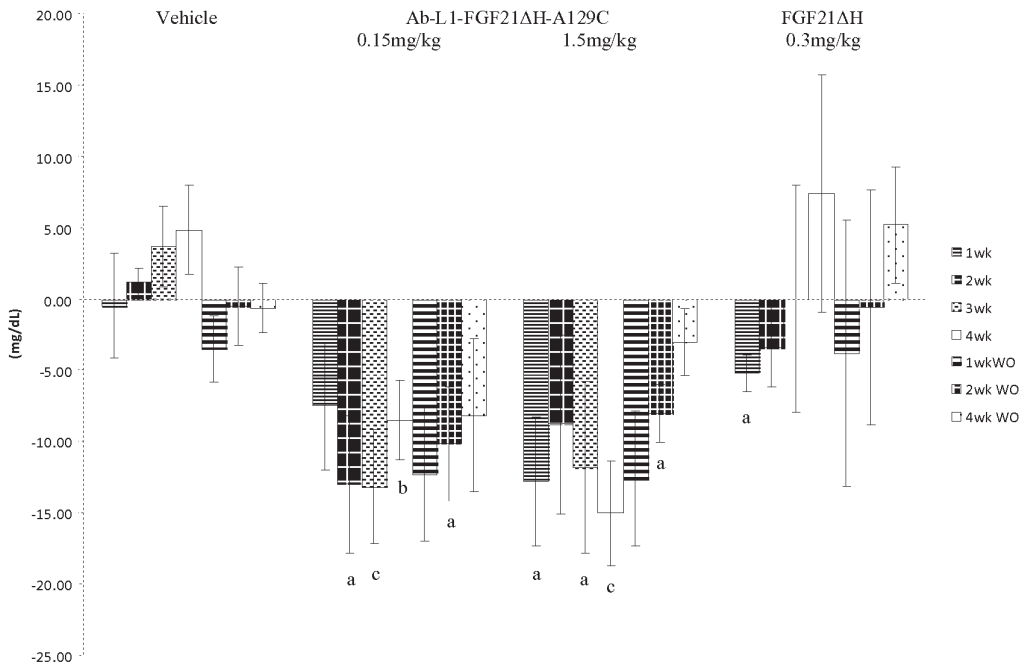


Figure 9L

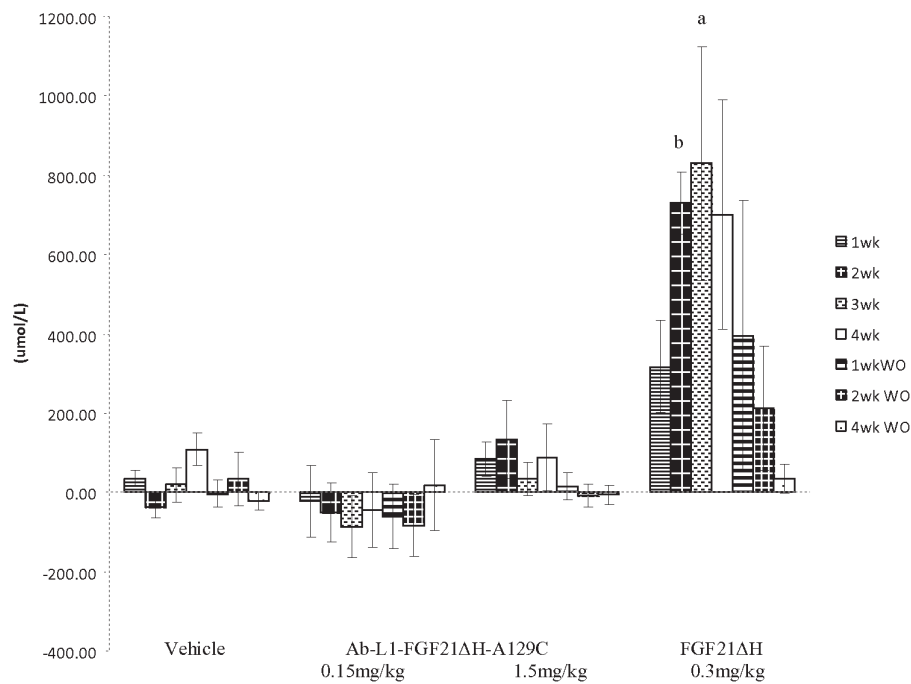


Figure 9M

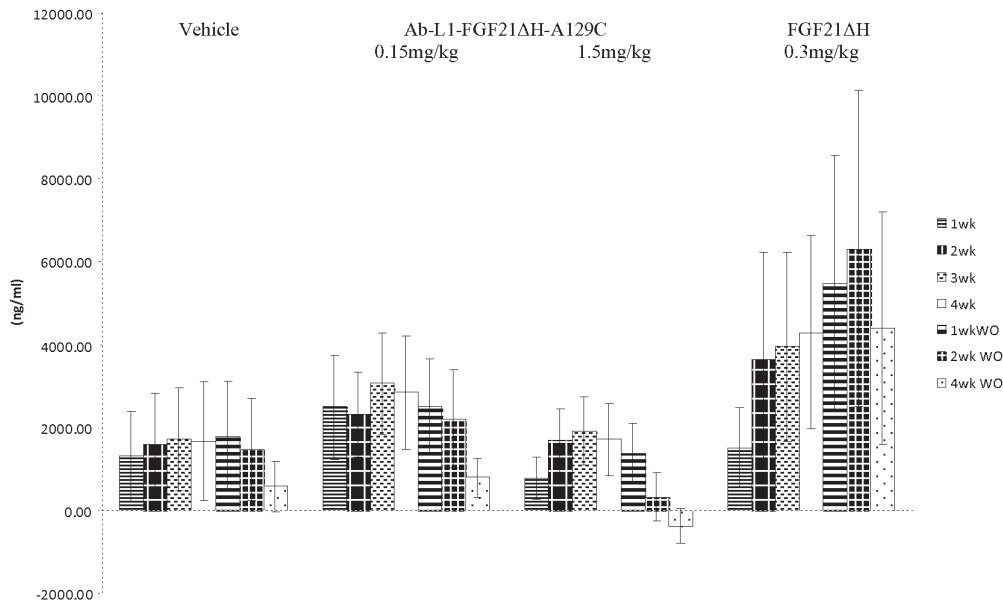


Figure 9N

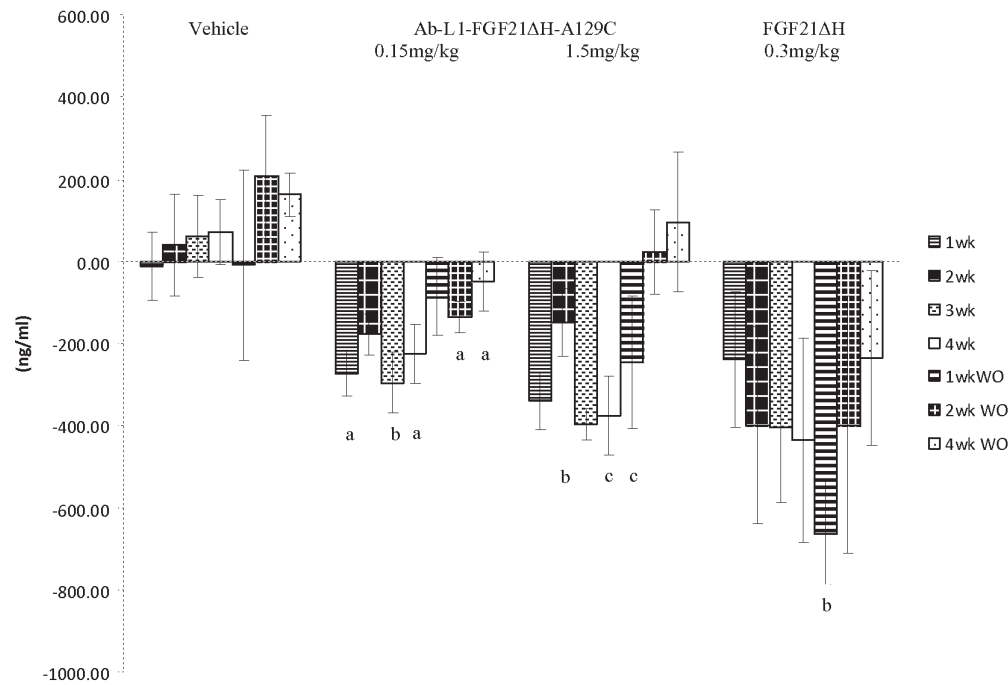
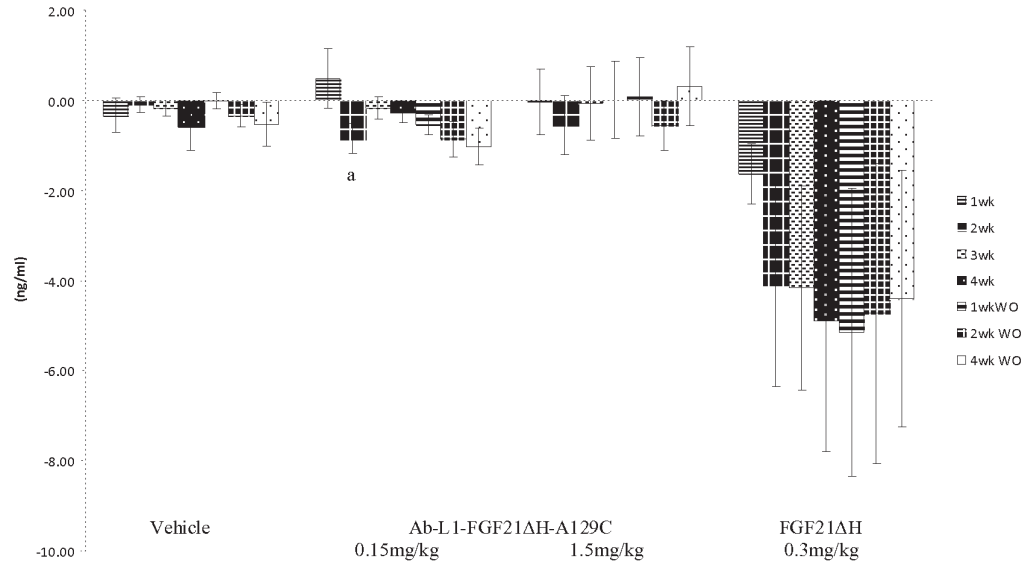
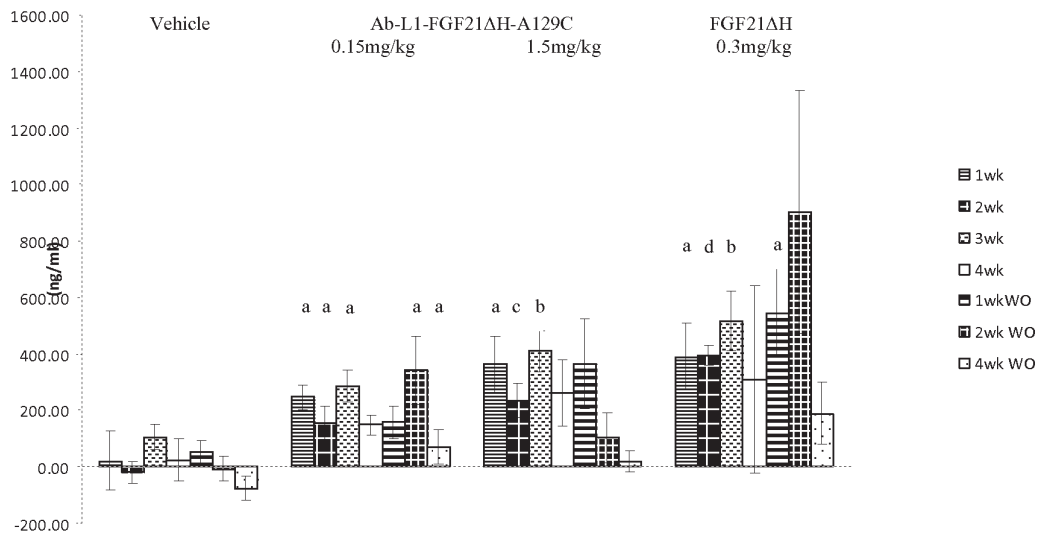


Figure 9o



24/24

Figure 9P



COMPUESTOS ANTIDIABÉTICOS

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que promueven la secreción de insulina y disminuyen los niveles de glucosa en sangre, y a
5 procedimientos para fabricar y usar estos compuestos.

ANTECEDENTES

La diabetes de tipo II es la forma de diabetes más frecuente. Esta enfermedad se produce por resistencia a la insulina y fallo de células β pancreáticas, lo cual tiene como resultado una secreción disminuida de insulina
10 estimulada por glucosa. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 21, un miembro de la familia de FGF, se ha identificado como un regulador metabólico, y se expresa preferentemente en el tejido hepático y adiposo y ejerce sus actividades biológicas a través del receptor de la superficie celular compuesto por FGFR1c y β -Klotho en células diana tales como las de los
15 tejidos hepático y adiposo (documentos WO0136640 y WO0118172). Se cree que el complejo de receptor desencadena la señalización citoplásmica y regula positivamente la expresión de GLUT1 a través de la ruta Ras/MAP quinasa. Su capacidad para proporcionar un control prolongado de glucosa y lípidos y para mejorar la sensibilidad a la insulina y la función de las células β , sin causar
20 ningún efecto adverso apreciable en entornos preclínicos, ha hecho del FGF21 un agente terapéutico atractivo para la diabetes de tipo 2 y trastornos metabólicos asociados.

Se han realizado varios esfuerzos dirigidos al desarrollo de terapias basadas en FGF21. Los documentos WO2006065582, WO2006028714,
25 WO2006028595 y WO2005061712 se refieren a muteínas de FGF21, que

comprenden sustituciones de aminoácidos individuales. El documento WO2006078463 está dirigido a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares usando FGF21. El documento WO2005072769 se refiere a procedimientos para el tratamiento de diabetes usando combinaciones de FGF21 y tiazolidinadiona. El documento WO03059270 se refiere a procedimientos para reducir la mortalidad de pacientes críticamente enfermos, que comprenden administrar FGF21. El documento WO03011213 se refiere a un procedimiento para el tratamiento de diabetes y obesidad, que comprende administrar FGF21.

10 Sin embargo, muchas de estas terapias propuestas presentan el problema de que el FGF21 tiene una semivida *in vivo* de entre 1,5 y 2 h en seres humanos. Para superar este inconveniente se han realizado diversos intentos. Los documentos WO2005091944, WO2006050247 y WO2008121563 desvelan moléculas de FGF21 unidas a PEG mediante restos de lisina o de
15 cisteína, grupos glucosilo y restos de aminoácidos no naturales, respectivamente. El documento WO2005113606 describe moléculas de FGF21 fusionadas de forma recombinante mediante su extremo C a moléculas de albúmina e inmunoglobulina usando engarces de poliglicina.

Sin embargo, el desarrollo de conjugados de proteína para producir
20 productos farmacéuticos útiles, rentables, presenta varios cambios significativos y a veces conflictivos: debe encontrarse un equilibrio entre la eficacia *in vivo*, la semivida *in vivo*, la estabilidad durante el almacenamiento *in vitro* y la facilidad y eficacia de fabricación, incluyendo la eficacia y especificidad de conjugación. En general, es obligatorio que el proceso de
25 conjugación no elimine o reduzca significativamente la acción biológica

deseada de la proteína en cuestión. Las interacciones proteína-proteína necesarias para el funcionamiento pueden requerir que múltiples regiones de la proteína actúen simultáneamente, y la alteración de cualquiera de ellas por la presencia cercana de un conjugado puede interferir con el sitio o sitios activos, o producir suficientes modificaciones en la estructura terciaria como para reducir la función del sitio activo. A menos que la conjugación se realice a través del extremo N' o C', pueden necesitarse mutaciones internas para facilitar la unión. Estas mutaciones pueden tener efectos impredecibles sobre la estructura y función de la proteína. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de productos terapéuticos alternativos basados en FGF21.

La referencia a cualquier técnica en esta memoria descriptiva no es y no debe considerarse una admisión de ninguna forma o sugerencia de que la técnica mencionada forme parte del conocimiento general común.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo mediante un engarce, en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión dentro de FGF21.

El resto de unión puede ser cisteína o lisina. El resto de unión puede estar localizado en una posición seleccionada del grupo que consiste en los restos de aminoácidos número 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 y 129, de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1. El resto de unión puede localizarse en una posición seleccionada del grupo que consiste en los restos de aminoácidos número 56, 59, 86 y 122 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1. El resto de unión puede localizarse en una posición seleccionada del grupo que

consiste en los restos 79, 125 y 129 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1.

- En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende una molécula de FGF21 conectada covalentemente a al menos un radical que aumenta la semivida en un resto de unión localizado en el resto número 56, 59, 69, 79, 86, 122, 125 y/o 129 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1. En algunos aspectos, la molécula de FGF21 está conectada covalentemente a un resto que aumenta la semivida. En algún aspecto, el resto de unión selecciona del grupo que consiste en los restos número 79, 125 y 129.
- La expresión “resto que aumenta la semivida” se refiere a cualquier molécula que cuando está conectada a la molécula de FGF21, aumenta la semivida circulante de la molécula de FGF21 y/o inhibe o reduce la eliminación renal de la molécula de FGF21. Los ejemplos de restos que aumentan la semivida incluyen polímeros que contienen PEG, mPEG, fosforilcolina, dominios Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos, anticuerpos catalíticos (analizados más adelante), proteínas (tales como albúmina) y otras macromoléculas conocidas en la técnica.

La cadena lateral de resto de unión puede comprender un grupo tiol. El resto de unión puede ser cisteína.

- La molécula de FGF21 puede comprender la SEC ID N°: 3: La molécula de FGF21 puede comprender la SEC ID N°: 4. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 13.

- El resto de unión puede localizarse en la posición 125 de acuerdo con la

numeración de la SEC ID N°: 1. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de la FGF21 es la SEC ID N°: 7.

5 El resto de unión puede localizarse en la posición 129 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10. En algunas realizaciones, la secuencia de FGF21 es la SEC ID N°: 10.

10 El resto de unión puede localizarse en la posición 79 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 13. En algunas realizaciones, la secuencia de FGF21 es la SEC ID N°: 13.

15 En algunas realizaciones, el resto de unión puede estar localizado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 1, 2, 56, 59, 69 y 122, de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto de unión puede localizarse en una posición seleccionada del grupo que consiste en 1, 2, 56, 59 y 122, de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°:

20 1. El resto de unión puede ser lisina. La molécula de FGF21 puede comprender la SEC ID N°: 17. La molécula de FGF21 puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 23.

En el documento US2009098130, cuyo contenido se incorpora por
25 referencia en el presente documento, se desvelan algunos engarces

adecuados. En particular, en la presente memoria se incluyen aspectos del documento US2009098130 relacionados con las fórmulas generales que describen engarces, estructuras de engarce específicas, síntesis de engarces y combinaciones de diferentes elementos de grupos X, Y y Z como se describe

5 específica y generalmente en el presente documento. El engarce puede ser lineal o ramificado, y opcionalmente incluye uno o más grupos carbocíclicos o heterocíclicos. La longitud del engarce puede considerarse en términos del número de átomos lineales, contándose los restos cíclicos tales como anillos aromáticos y similares tomando la vía más corta alrededor del anillo. En

10 algunas realizaciones, el engarce tiene un tramo lineal de entre 5-15 átomos, en otras realizaciones 15-30 átomos, en otras realizaciones adicionales 30-50 átomos, en otras realizaciones adicionales 50-100 átomos y aún en otras realizaciones 100-200 átomos. Otras consideraciones del engarce incluyen el efecto sobre propiedades físicas o farmacocinéticas del compuesto resultante,

15 tales como solubilidad, lipofilia, hidrofilia, hidrofobia, estabilidad (más o menos estable así como degradación planificada), rigidez, flexibilidad, inmunogenicidad y modulación de la unión de anticuerpos, la capacidad de incorporarse en una micela o liposoma, y similares.

En algunos aspectos de la invención, el compuesto comprende un

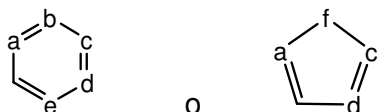
20 engarce unido covalentemente a la cadena lateral del resto de unión. El engarce puede comprender la fórmula: X-Y-Z; en la que X es una cadena de conexión biológicamente compatible que incluye cualquier átomo seleccionado del grupo que consiste en C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, y puede comprender un polímero o copolímero de bloque, y está unida covalentemente al resto de

25 unión en el que el engarce es lineal, Y es un grupo de reconocimiento

opcionalmente presente que comprende al menos una estructura en anillo; y Z es un resto de unión que comprende un enlace covalente con una cadena lateral de aminoácido en un sitio de combinación de un anticuerpo.

Cuando está presente, Y puede tener la estructura opcionalmente

5 sustituida:



en la que a, b, c, d y e son independientemente carbono o nitrógeno; f es carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre; Y está unido a X y Z independientemente en dos posiciones cualesquiera del anillo de valencia suficiente; y no más de
 10 cuatro de a, b, c, d, e, o f son simultáneamente nitrógeno y, preferentemente, a, b, c, d y e en la estructura del anillo son, cada uno, carbonos. En algunos aspectos, Y puede ser fenilo. Aunque sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que el grupo Y puede ayudar a colocar el grupo reactivo en un sitio de combinación de anticuerpo de manera que el grupo Z pueda reaccionar
 15 con una cadena lateral de aminoácido reactiva.

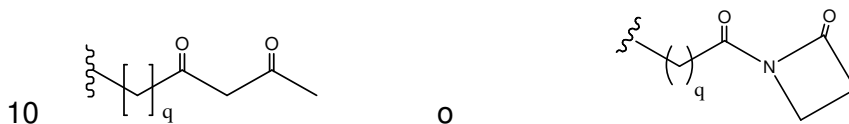
El engarce puede diseñarse de manera que contenga un grupo reactivo capaz de formar de manera covalente o no covalente un enlace con una macromolécula, tal como un anticuerpo, proteína o fragmentos de los mismos. El grupo reactivo se selecciona para su uso con un resto reactivo en un sitio de
 20 combinación particular. Por ejemplo, un resto químico para modificación por un anticuerpo de aldolasa puede ser una cetona, dicetona, beta lactama, halocetona de éster activo, lactona, anhídrido, maleimida, alfa-haloacetamida, ciclohexil dicetona, epóxido, aldehído, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, dicetona enmascarada o

protegida (por ejemplo, cetal), lactama, halocetona, aldehído y similares. En realizaciones de la presente invención que unen un péptido de la invención con un engarce, Z es el grupo reactivo.

En algunas realizaciones, Z, antes de la conjugación con la cadena lateral de un resto en el sitio de combinación de un anticuerpo, incluye uno o más grupos C=O dispuestos para formar una azitidinona, dicetona, una acil beta-lactama, un éster activo, una halocetona, un grupo ciclohexil dicetona, un aldehído, una maleimida, un alqueno activado, un alquino activado o, en general, una molécula que comprende un grupo saliente susceptible al desplazamiento nucleófilo o electrófilo. Otros grupos pueden incluir una lactona, un anhídrido, una alfa-haloacetamida, una imina, una hidrazida o un epóxido. Los grupos reactivos electrófilos de engarce ejemplares que pueden unirse covalentemente a un grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, una cadena lateral de lisina o cisteína) en un sitio de combinación de anticuerpo incluyen acil beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con engarce, halocetona, ciclohexil dicetona, aldehído, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, una dicetona enmascarada o protegida (un cetal, por ejemplo), lactama, sulfonato y similares, grupos enmascarados C=O tales como iminas, cetales, acetales y cualquier otro grupo electrófilo conocido. En algunas realizaciones, el grupo reactivo incluye uno o más grupos C=O dispuestos para formar una acil beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con engarce, halocetona, ciclohexil dicetona o aldehído. Z puede ser un alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heterociclilo sustituido o heterociclilalquilo sustituido, en el que al

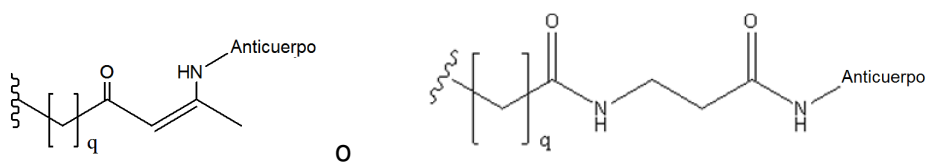
menos un sustituyente es un resto 1,3-dicetona, una acil beta-lactama, un éster activo, una alfa-halocetona, un aldehído, un maleimida, una lactona, un anhídrido, una alfa-haloacetamida, una amina, una hidrazina o un epóxido. El grupo Z puede estar unido covalentemente a un armazón macromolecular que puede proporcionar una mayor semivida a los péptidos de la invención. El grupo Z, si está presente, puede unirse covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo.

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



en la que $q=0-5$. q puede ser 1 o 2. q puede ser 1. En otros aspectos, q puede ser 2.

En algunos aspectos, después de la conjugación con el sitio de combinación del anticuerpo, Z tiene la estructura:



en la que $q=0-5$ y el Anticuerpo-N es un enlace covalente con una cadena lateral en un sitio de combinación de un anticuerpo, q puede ser 1 o 2. q puede ser 1. En otros aspectos, q puede ser 2.

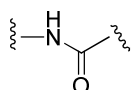
20 X puede ser un grupo que comprende tres componentes; $X_p-X_s-X_y$, en el que X_p es un grupo adaptado específicamente para ser combinable con la cadena lateral del resto de unión de la proteína FGF21, X_s es una región

espaciadora del grupo X, y Xy es un grupo adaptado para unirse al grupo Y. En algunos aspectos, Xy se selecciona de un enlace amida, un enlace enamida o un enlace guanidinio. Xy puede seleccionarse para proporcionar una molécula de hidrógeno adyacente (a una distancia menor o igual a dos átomos) al grupo

5 Y. Aunque sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que el átomo de H puede ayudar al reconocimiento del grupo Y de un bolsillo hidrófobo a través de la interacción del enlace de H, particularmente con respecto al bolsillo hidrófobo de la hendidura de unión de un anticuerpo catalítico, tal como h38C2. Por lo tanto, el enlace amida, por ejemplo, puede orientarse de tal manera que

10 el grupo NH esté unido directamente al grupo Y, proporcionando el H del grupo NH para la unión al hidrógeno. Como alternativa, el grupo C=O de una amida puede estar unido al grupo Y, con el H del grupo NH hasta 2 átomos adyacente al grupo Y, pero aún disponible para la formación de enlaces de H. En algunas realizaciones, Xy está ausente. En algunas realizaciones, el grupo Xy tiene la

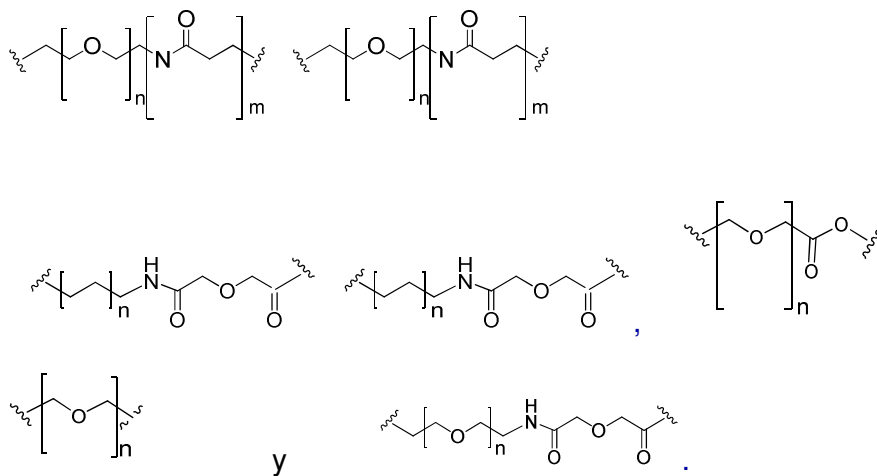
15 fórmula:



En algunos aspectos, Xs se selecciona de manera que Xs no proporcione ningún grupo demasiado reactivo. Xs puede seleccionarse para proporcionar una longitud total de los grupos X de entre 2-15 átomos. Xs puede

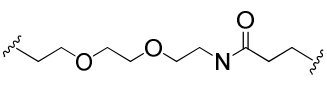
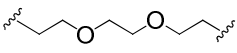
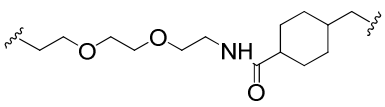
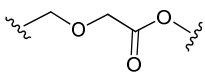
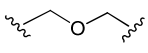
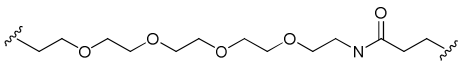
20 seleccionarse de manera que la longitud total del grupo X esté entre 2 y 10 átomos. Xs puede seleccionarse de manera que la longitud total del grupo X sea de 4-8 átomos. Xs puede seleccionarse de manera que la longitud total del grupo X sea de 5 átomos. Xs puede seleccionarse de manera que la longitud total del grupo X sea de 6 átomos. En algunos aspectos, Xs puede comprender

una de las siguientes fórmulas:



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

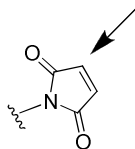
En algunos aspectos, Xs comprende una de las siguientes fórmulas:

- 10  (ejemplificado en L1 y L2)
-  (ejemplificado en L3 y L7)
-  (ejemplificado en L4)
-  (ejemplificado en L5)
-  (ejemplificado en L6)
-  (ejemplificado en L8)

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



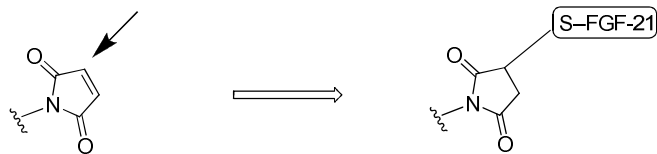
Quando el resto de unión es C, homólogos de C u otros restos que contengan grupos tiol, Xp puede comprender un grupo maleimida (o similar) que permita una estrategia de reacción de adición de tiol-maleimida para unir covalentemente el grupo Xp al resto de unión. En algunos aspectos, Xp también puede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



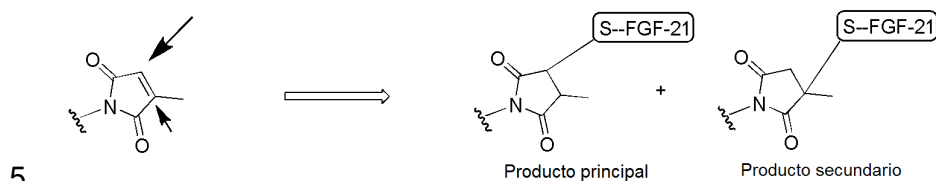
20

en la que flecha indica el punto de unión del resto de unión de FGF21 y la línea paralela representa la unión al grupo Y del engarce. Cuando el resto de unión

de FGF21 es un resto de cisteína, u otra cadena lateral portadora de tiol, el mecanismo de conjugación puede ser el siguiente:

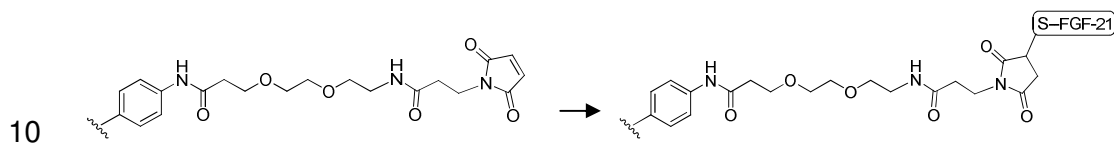


En algunos aspectos, el grupo Xp comprende una maleimida sustituida:

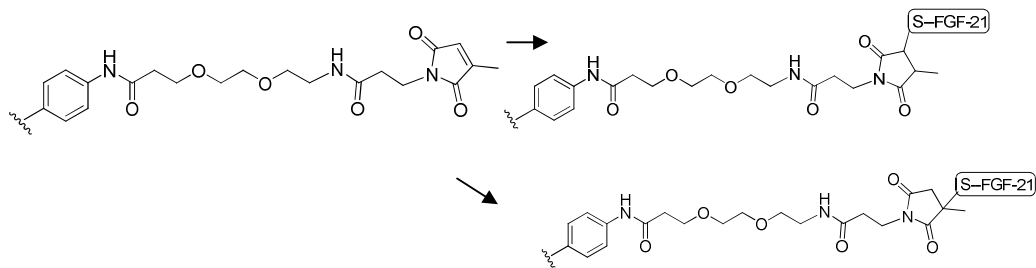


En algunos aspectos, los componentes XY del engarce antes de la conjugación y después de la conjugación pueden seleccionarse entre los siguientes:

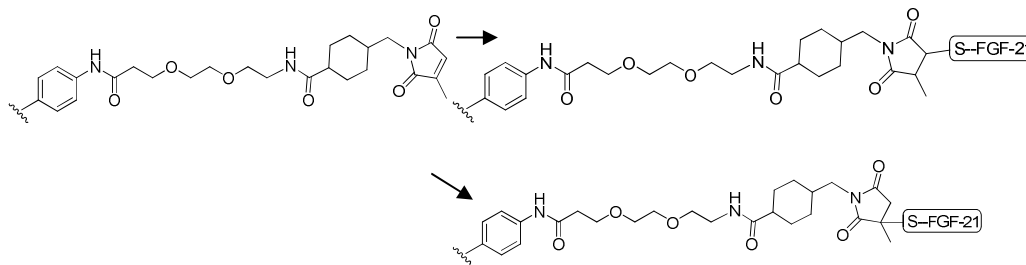
XY-1



XY-2

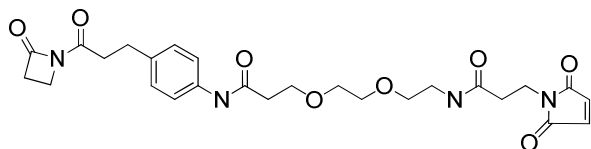


XY-4



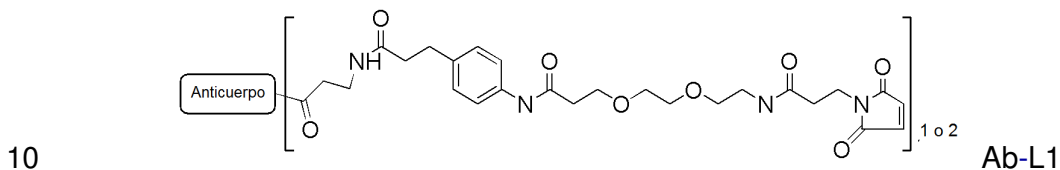
Los componentes XY-1, XY-2, XY-3 y XY-4 son particularmente útiles en realizaciones que se conjugan con una cadena lateral portadora de un grupo
5 tiol en la molécula de FGF21.

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

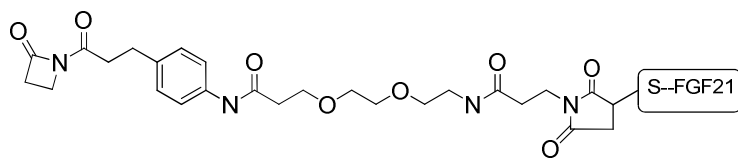


L1

Cuando L1 se conjuga con el anticuerpo, el complejo anticuerpo-L-1 puede comprender la fórmula:

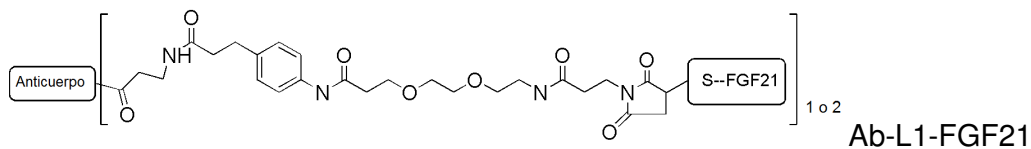


Cuando L1 se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L1-FGF21 puede comprender la fórmula:

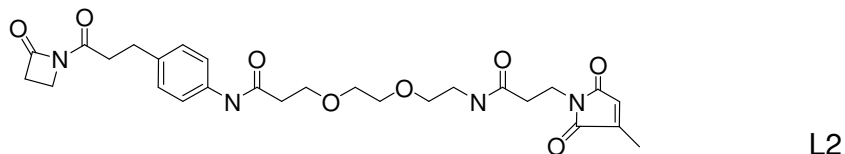


L1-FGF21

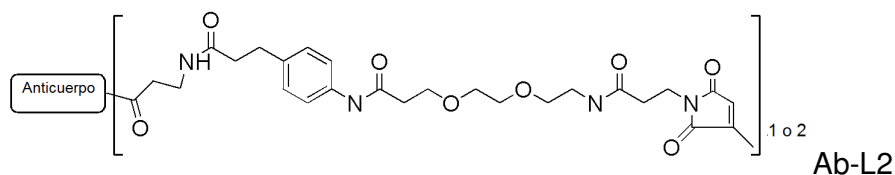
Cuando L1 se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el
15 complejo anticuerpo-L1-FGF21 puede comprender la fórmula:



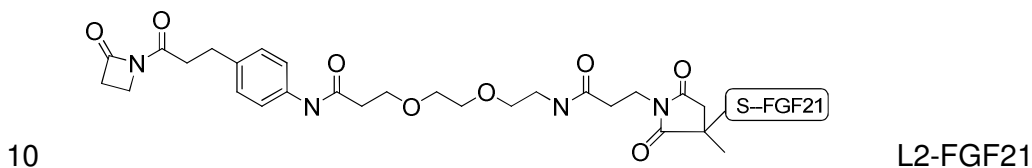
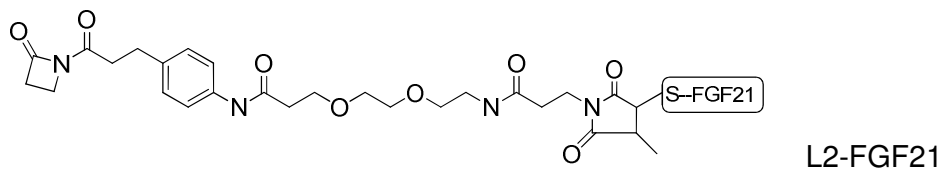
En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-2 (L2):



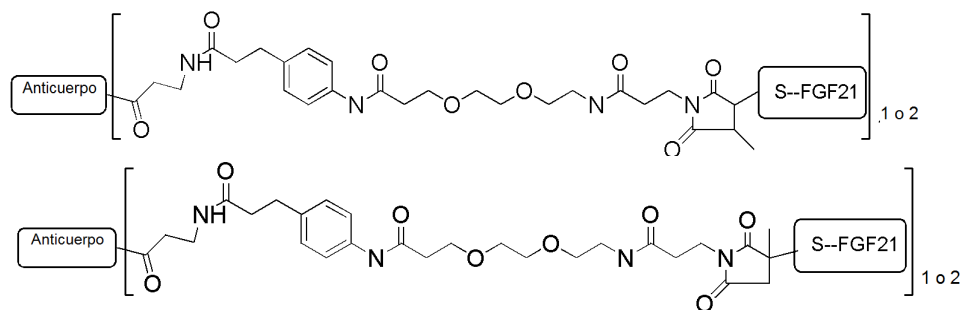
5 Cuando L2 se conjuga con el anticuerpo, el complejo anticuerpo-L2 puede comprender la fórmula:



Cuando L2 se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L2-FGF21 puede comprender una de las siguientes fórmulas:

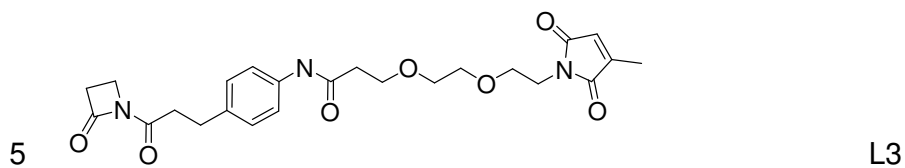


Cuando L2 se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo anticuerpo-L2-FGF21 puede comprender una de las siguientes fórmulas:

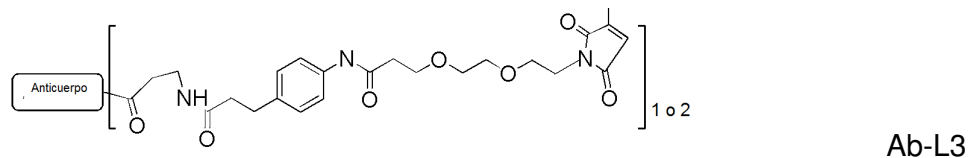


Ab-L2-FGF21

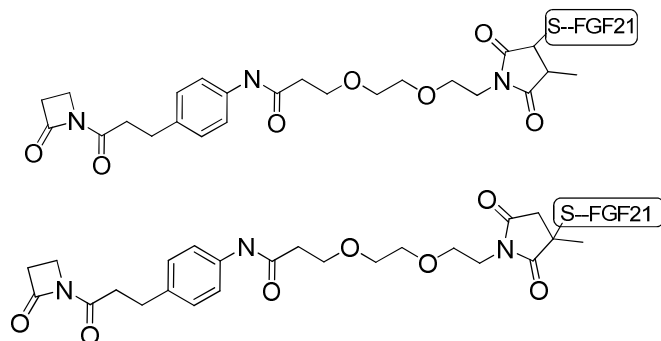
En algunas realizaciones, el engarce puede ser el Engarce-3 (L3):



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

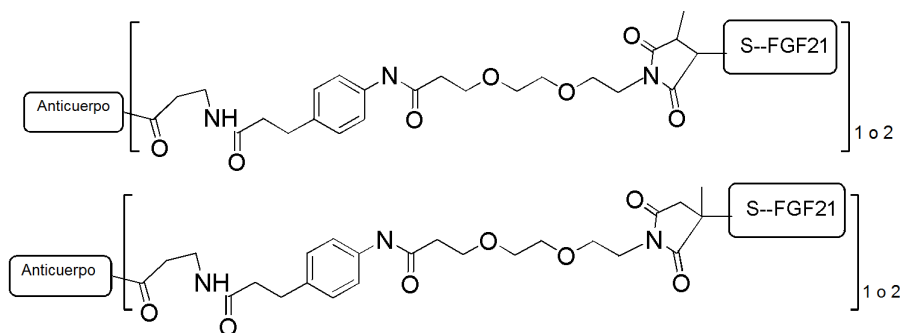


10 Cuando L3 se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L3-FGF21 puede comprender una de las siguientes fórmulas:



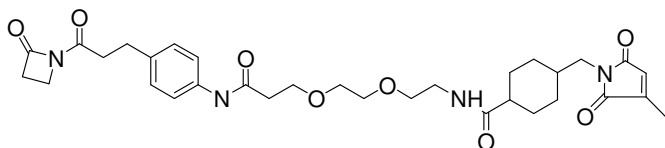
L3-FGF21

Cuando L3 se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo anticuerpo-L3-FGF21 puede comprender la fórmula:



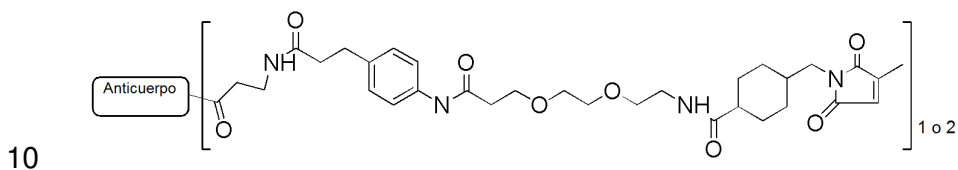
5 Ab-L3-FGF21

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



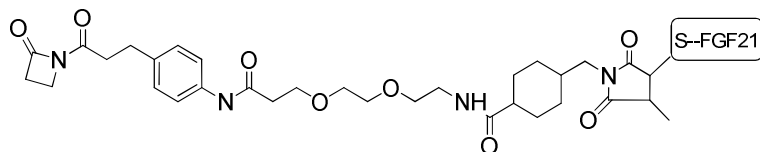
L4

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

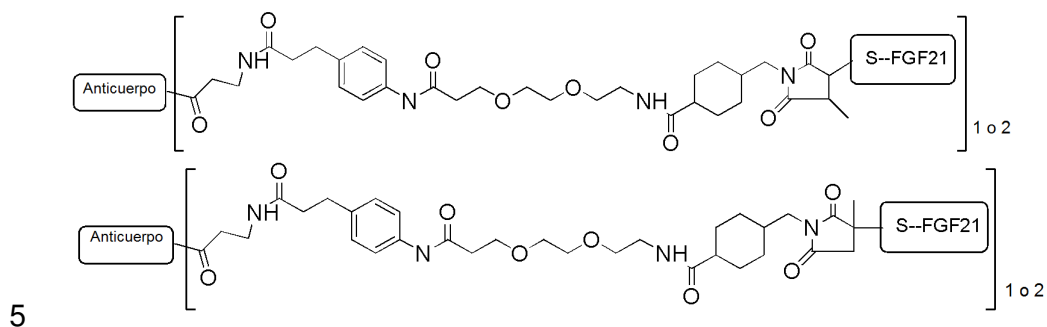


Ab-L4

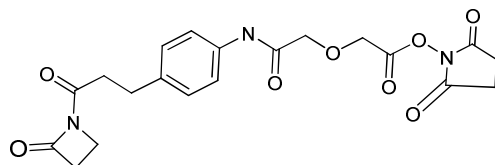
Cuando se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L4-FGF21 puede comprender la fórmula:



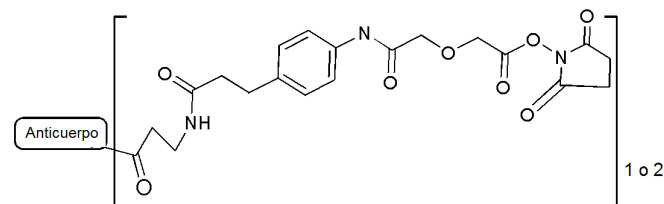
Cuando L4 se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo L4-FGF21 puede comprender la fórmula:



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

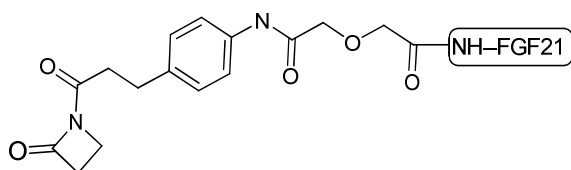


10 Cuando L5 se conjuga con el anticuerpo, el complejo anticuerpo-L5 puede comprender la fórmula:



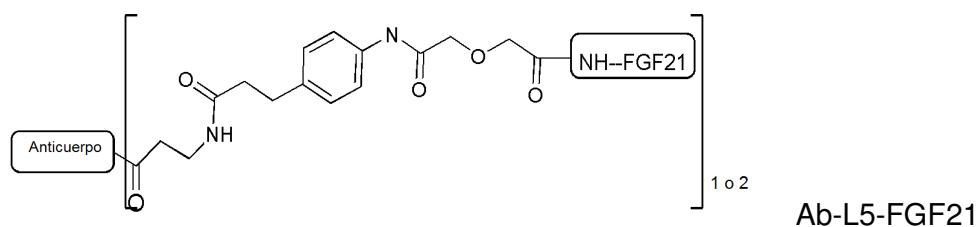
Ab-L5

Cuando L5 se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L5-FGF21 puede comprender la fórmula:



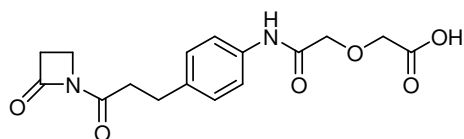
L5-FGF21

Cuando L5 se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo anticuerpo-L5-FGF21 puede comprender la fórmula:



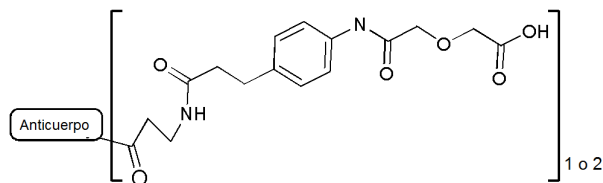
5

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



L6

Cuando L6 se conjuga con el anticuerpo, el complejo anticuerpo-L5 puede comprender la fórmula:



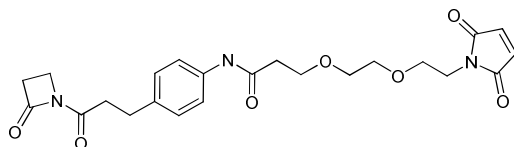
10

Ab-L6

Cuando L6 se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L6-FGF21 puede comprender la misma fórmula que para L5-FGF21. De manera similar, cuando L6 se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo

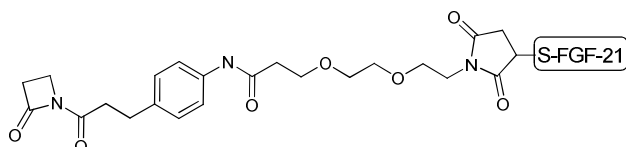
anticuerpo-L6-FGF21 puede comprender la misma fórmula que para Ab-L5-FGF21.

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



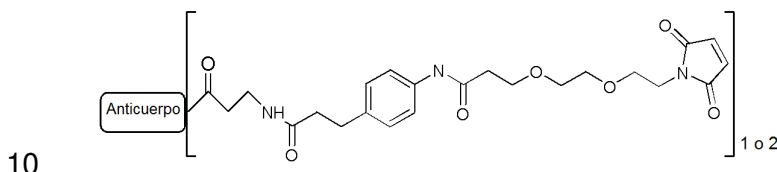
L7

5 Cuando se conjuga con el anticuerpo, el complejo anticuerpo-L7 puede comprender la fórmula:



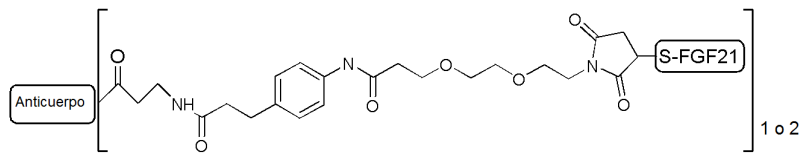
L7-FGF21

Cuando se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo, L7-FGF21 puede comprender la fórmula:



Ab-L7

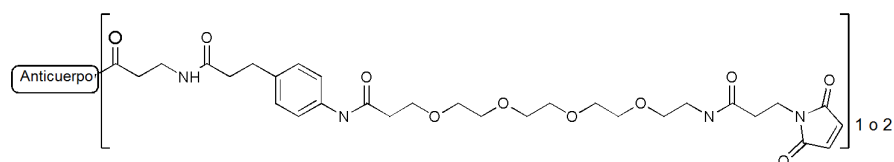
Cuando se conjuga con el anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo anticuerpo-L7-FGF21 puede comprender la fórmula:



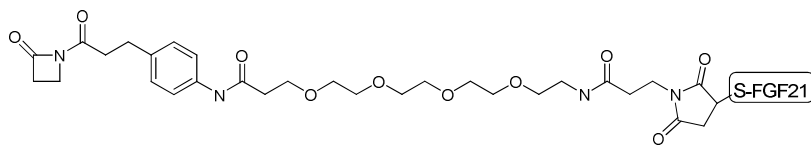
Ab-L7-FGF21

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

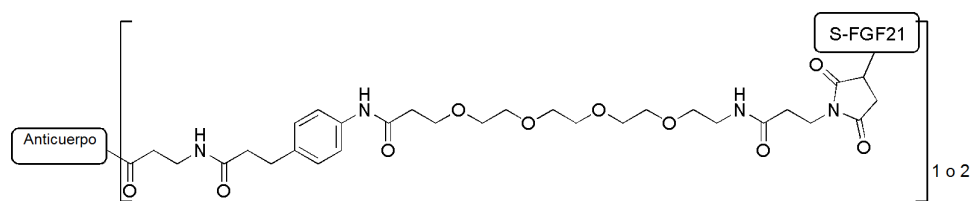
Cuando L8 se conjuga con el anticuerpo, el complejo anticuerpo-L8 puede comprender la fórmula:



5 Cuando L8 se conjuga con la molécula de FGF21, el complejo L8-FGF21 puede comprender la fórmula:

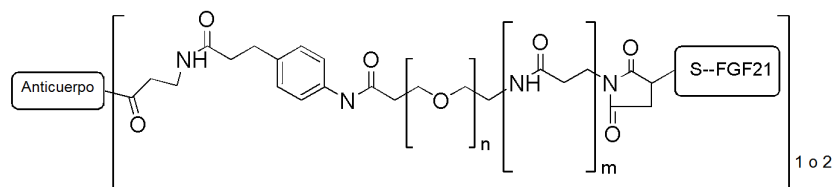


Cuando L8 se conjuga con anticuerpo y la molécula de FGF21, el complejo anticuerpo-L8-FGF21 puede comprender la fórmula:



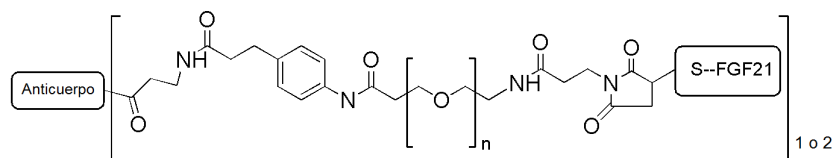
10

En algunas realizaciones, el conjugado Ab-engarce-FGF21 puede tener la fórmula:



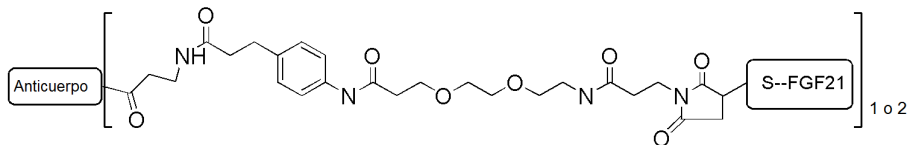
en la que el sitio de combinación del Anticuerpo está unido covalentemente al engarce, S-FGF21 es el enlace covalente con una cadena lateral portadora de tiol en una molécula de FGF21, $n=1$ o 2 o 3 o 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 o 10 ; n puede ser 1 , 2 , 3 , 4 , 5 o 6 ; n puede ser 1 ; n puede ser 2 ; n puede ser 3 ; n puede ser 4 , y m es opcional. M puede estar ausente. M puede estar presente.

En algunas realizaciones, el conjugado Ab-engarce-FGF21 puede ser de fórmula:



en la que el sitio de combinación del Anticuerpo está unido covalentemente al engarce, S-FGF21 es un enlace covalente con una cadena lateral portadora de tiol en una molécula de FGF21, $n=1$ o 2 o 3 o 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 o 10 ; n puede ser 1 , 2 , 3 , 4 , 5 o 6 ; n puede ser 1 ; n puede ser 2 ; n puede ser 3 ; n puede ser 4 .

En algunas realizaciones la composición comprende fórmula:

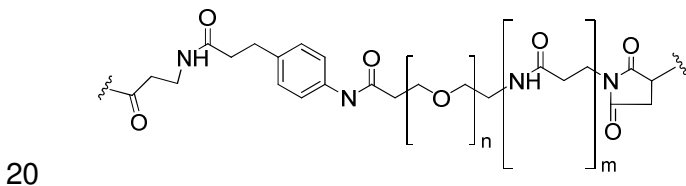


en la que el Anticuerpo es un enlace covalente con el sitio de combinación de un anticuerpo, S-FGF21 es un enlace covalente con una cadena lateral portadora de tiol en una molécula de FGF21. En algunas realizaciones, la

molécula de FGF21 comprende la SEC ID N°: 10. En algunas realizaciones, la molécula de FGF21 comprende la SEC ID N°: 7.

En algunos aspectos, la invención se refiere a los engarces y componentes de engarce como se describen en el presente documento, particularmente, pero sin limitación, a los grupos X descritos en el presente documento. En algunos aspectos, la invención se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, conjugado covalentemente con un engarce o grupo de engarce como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el engarce o grupo de engarce adicionalmente puede conjugarse directa o indirectamente con un péptido o proteína. Será evidente que la utilidad de los engarces y de los conjugados de engarce y anticuerpo no se limita por la aplicación con moléculas de FGF21, y que dichos conjugados Ab-engarce pueden ser conjugados con otros péptidos, proteínas y agentes terapéuticos y de dirección. Para estos propósitos, puede entenderse que las mismas estructuras descritas en el presente documento que representan S-FGF21 y NH-FGF21 se aplican a otras proteínas, péptidos y moléculas terapéuticas y de dirección; reemplazándose la nomenclatura FGF21 de la estructura representada por dicha proteína, péptido o molécula.

En algunos aspectos, la invención proporciona un engarce de fórmula



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

menos aproximadamente 35 horas en modelos de rata. En algunas realizaciones, la semivida SC es al menos aproximadamente 36 horas en modelos de rata. En algunas realizaciones, la semivida SC es al menos aproximadamente 40 horas en modelos de primate. En algunas realizaciones, la semivida SC es de al menos aproximadamente 45 horas en modelos de primate. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 28 horas en modelos murinos. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 55 horas en modelos de rata. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 55 horas en modelos de rata. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 60 horas en modelos de rata. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 60 horas en modelos de primate. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV de al menos aproximadamente 65 horas en modelos de primate. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV después de una sola dosis de al menos aproximadamente 30 horas en seres humanos. En algunas realizaciones, la invención proporciona un complejo anticuerpo-proteína conjugado con una semivida IV después de una sola dosis de al menos aproximadamente 35 horas en seres humanos.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición que comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo mediante un engarce, en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión dentro de FGF21 formando un complejo proteína-anticuerpo conjugado, de tal manera que la biodisponibilidad subcutánea del complejo proteína-anticuerpo conjugado es de al menos aproximadamente el 50% en modelos murinos. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 65%. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 50% en modelos de rata. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 50% en modelos de primate. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 60% en modelos de primate. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 65% en modelos de primate.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición que comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo mediante un engarce, en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión dentro de FGF21 formando FGF21 un complejo proteína-anticuerpo conjugado, de tal manera que la biodisponibilidad subcutánea del complejo proteína-anticuerpo conjugado es de al menos aproximadamente el 50% en modelos murinos. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos

aproximadamente el 55%. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad SC es de al menos aproximadamente el 65%.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición que comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de
5 combinación de un anticuerpo mediante un engarce, en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión dentro de FGF21 formando un complejo proteína-anticuerpo conjugado, de tal manera que el complejo proteína-anticuerpo conjugado tiene una potencia CE_{50} en un ensayo Glut1 Taqman de menos de aproximadamente 5 nM. En algunas
10 realizaciones, la potencia CE_{50} en un ensayo Glut1 Taqman es menor de aproximadamente 4nM. En algunas realizaciones, la potencia CE_{50} en un ensayo Glut1 Taqman es menor de aproximadamente 3 nM.

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

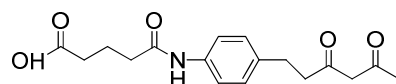
Anticuerpos

El contenido del documento US2006205670 se incorpora en el presente
20 documento por referencia, en los párrafos particulares [0153]-[0233], que describen anticuerpos, fragmentos útiles y variantes y modificaciones de los mismos, sitios de combinación y CDR, preparación de anticuerpos, expresión, humanización, modificación de aminoácidos, glicosilación, ADCC, CDC, aumento de semivida en suero de anticuerpos, vectores de expresión, sistemas

huésped de mamíferos, y plegamiento, entre otros elementos de la tecnología de anticuerpos.

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

“Anticuerpos de aldolasa”, como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que contienen partes del sitio de combinación que, cuando no están restringidas (por ejemplo por conjugación), catalizan una reacción de adición de aldol entre una cetona alifática donante y un aceptor aldehído. Los anticuerpos de aldolasa pueden generarse por inmunización de un animal inmuno-sensible con un inmunógeno que incluye un hapteno 1,3-dicetona de fórmula:



acoplado a la proteína de soporte, y caracterizarse adicionalmente por tener una lisina con un grupo ϵ -amino reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo. Los anticuerpos de aldolasa adicionalmente se caracterizan por su actividad catalítica que es objeto de inhibición con el hapteno 1,3-dicetona por formación de un complejo entre el hapteno 1,3-dicetona y el grupo ϵ -amino de la lisina del anticuerpo catalítico.

Como se ha analizado, en algunas realizaciones, algunos anticuerpos que pueden usarse junto con los compuestos de la invención pueden requerir

una cadena lateral reactiva en el sitio de combinación del anticuerpo. Una cadena lateral reactiva puede estar presente de manera natural o puede ponerse en un anticuerpo por mutación. El resto reactivo del sitio de combinación del anticuerpo puede estar asociado con el anticuerpo, tal como

5 cuando el resto está codificado por un ácido nucleico presente en la célula identificada primero para fabricar el anticuerpo. Como alternativa, el resto de aminoácido puede producirse deliberadamente mutando el ADN de manera que codifique el resto particular (por ejemplo, documento WO 01/22922). El resto reactivo puede ser un resto producido de manera no natural, por ejemplo,

10 por incorporación biosintética usando un solo codón, ARNt y aminoacil-ARNt como se analiza en el presente documento. En otra estrategia, el resto de aminoácido o sus grupos funcionales reactivos (por ejemplo, un grupo amino nucleófilo o grupo sulfhidrilo) pueden unirse a un resto de aminoácido en el sitio de combinación del anticuerpo. Por lo tanto, la unión covalente con el

15 anticuerpo que se produce "a través de un resto de aminoácido en un sitio de combinación de un anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa que el engarce puede formarse directamente con un resto de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpo o mediante un radical químico que está unido a una cadena lateral de un resto de aminoácido de un

20 sitio de combinación de anticuerpo. En algunas realizaciones, el aminoácido es cisteína y el grupo reactivo de la cadena lateral es un grupo sulfhidrilo. En otras realizaciones, el resto de aminoácido es lisina y el grupo reactivo de la cadena lateral es el grupo ϵ -amino. En algunas realizaciones, el aminoácido es Lys93 en la cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas

25 realizaciones, el aminoácido es Lys-99 en h38C2 de HC (SEC ID N°: 26).

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

- 5 Una realización comprende un anticuerpo aldolasa tal como los anticuerpos monoclonales de ratón mAb 33F12 y mAb 38C2, así como versiones quiméricas y humanizadas convenientemente de dichos anticuerpos (por ejemplo, h38C2, SEC ID N°: 25 y 26). El mAb 38C2 de ratón (y h38C2) tiene una lisina reactiva cerca pero fuera de HCDR3 y es el prototipo de una
- 10 nueva clase de anticuerpos catalíticos que se generaron por inmunización reactiva y enzimas aldolasa naturales miméticas desde el punto de vista del mecanismo. Véase C. F. Barbas 3rd y col., Science 278: 2085-2092 (1997). Otros anticuerpos catalíticos aldolasa que pueden usarse incluyen los anticuerpos producidos por el hibridoma 85A2, que tiene el número de acceso
- 15 PTA-1015 de la ATCC; el hibridoma 85C7, que tiene el numero de acceso PTA-1014 de la ATCC; hibridoma 92F9, que tiene el número de acceso PTA-1017 de la ATCC; hibridoma 93F3, que tiene el número de acceso PTA-823 de la ATCC; hibridoma 84G3, que tiene el número de acceso PTA-824 de la ATCC; hibridoma 84G11, que tiene el número de acceso PTA-1018 de la ATCC;
- 20 hibridoma 84H9, que tiene el número de acceso PTA-1019 de la ATCC; hibridoma 85H6, que tiene el número de acceso PTA-825 de la ATCC; hibridoma 90G8, que tiene el número de acceso PTA-1016 de la ATCC. Mediante una lisina reactiva, estos anticuerpos catalizan reacciones aldol y retro-aldol usando el mecanismo de enamina de las aldolasas naturales. Se
- 25 describen anticuerpos aldolasa y procedimientos para generar anticuerpos

aldolasa en las Patentes de Estados Unidos N° 6.210.938, 6.368.839, 6.326.176, 6.589.766, 5.985.626 y 5.733.75, que se incorporan en el presente documento por referencia.

- También pueden formarse compuestos de la invención por unión de un
- 5 compuesto de la invención con una cisteína reactiva, tal como las encontradas en los sitios de combinación de anticuerpos catalíticos tioesterasa y esterasa. K. D. Janda *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 2532-2536 (1994) describen anticuerpos catalíticos tioesterasa adecuados. P. Wirsching *y col.*, Science 270: 1775-1782 (1995) describen anticuerpos esterasa adecuados.
- 10 Los anticuerpos que contienen aminoácidos reactivos pueden prepararse por medios bien conocidos en la técnica, incluyendo la mutación de un resto de sitio de combinación anticuerpo para codificar el aminoácido reactivo o la modificación química de una cadena lateral de aminoácido en un sitio de combinación de anticuerpo con un engarce que contenga el grupo reactivo.
- 15 El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. Cuando los compuestos de la invención están unidos covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo y dichos anticuerpos están humanizados, es importante que dichos anticuerpos estén humanizados con retención de una alta afinidad de unión por el grupo Z. Se contemplan diversas formas de
- 20 anticuerpos aldolasa murinos humanizados. Otra realización usa el anticuerpo catalítico aldolasa humanizado h38c2 IgG1 o h38c2 Fab con dominios constantes humanos C_κ y C_{γ1}. C. Rader *y col.*, J. Mol. Bio. 332: 889-899 (2003) desvela las secuencias de genes y vectores que pueden usares para producir h38c2 Fab y h38c2 IgG1. Se usaron el gen DPK-9 de V_κ de línea
- 25 germinal y el gen JK4 de J_κ humano como armazones para la humanización del

domino variable de cadena ligera kappa de m38c2, y se usaron el gen DP-47 de línea germinal humana y el gen JH4 de J_H humano como armazones para la humanización del domino variable de cadena pesada de m38c2. La figura 1 ilustra un alineamiento de secuencia entre las cadenas ligera y pesada variables en m38c2, h38c2 y líneas germinales humanas. h38c2 puede utilizar dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, incluyendo cualquiera de sus alotipos. En algunas realizaciones de los compuestos de la invención en las que el anticuerpo es h38c2 IgG1 con el alotipo G1m(f), Z se une a la cadena lateral del resto de lisina en la posición 99 de la cadena pesada. Otra realización usa un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables (V_L y V_H) de h38c2 (SEC ID N°: 27 y 28) y los dominios constantes de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, un diacuerpo, o un minicuerpo que comprende dominios V_H y V_L de h38c2. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que comprende los dominios V_L y V_H de h38c2 y un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo puede ser h38C2 IgG1 (SEC ID N°: 25 y 26). El anticuerpo puede ser una versión humanizada de un anticuerpo aldolasa murino que comprende una región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD o IgE humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende la región V_L y V_H de un anticuerpo aldolasa murino y una región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD o IgE humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las regiones V_L y V_H de m38C2 (SEC ID N°: 29 y 30). En otras realizaciones, el anticuerpo es una versión completamente humana de un

anticuerpo aldolasa murino que comprende una secuencia polipeptídica del anticuerpo natural o nativo humano IgG, IgA, IgM, IgD, o IgE.

También se contemplan diversas formas de fragmentos de anticuerpos aldolasa humanizados. Una realización usa h38c2 F(ab')₂. h38c2 F(ab')₂ puede producirse por digestión proteolítica de h38c2 IgG1. Otra realización usa un h38c2 scFv que comprende los dominios V_L y V_H de h38c2 que están opcionalmente conectados por el engarce intermedio (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N°: 31). Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, después de inmunización (o inmunización reactiva en el caso de anticuerpos catalíticos) de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas.

Como alternativa, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* usando repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina a partir de donantes no inmunizados. Como se ha indicado anteriormente, también pueden generarse anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro*, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275.

Se contempla la modificación (o modificaciones) de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones

incluyen, por ejemplo, deleciones de, inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Para llegar a la construcción final se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución, siempre que la construcción final posea las características
5 deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden modificar procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambios en el número o posición de sitios de glicosilación.

Un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede derivatizarse o unirse a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los
10 anticuerpos o partes de los mismos se derivatizan de manera que la capacidad del engarce para conjugarse covalentemente con el anticuerpo de combinación no se vea influida de forma adversa por la derivatización o marcaje. Por consiguiente, se pretende que los anticuerpos y partes de anticuerpos de la invención incluyan tanto formas modificadas como intactas de los anticuerpos
15 descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares distintas, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente
20 citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como la región núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

En otras realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser un anticuerpo de fusión o un anticuerpo unido
25 a otro polipéptido. En algunos aspectos, solamente las regiones variables del

anticuerpo se unen al polipéptido. En algunos aspectos, el anticuerpo está conjugado de manera covalente con un péptido de tal modo que no interfiere con la capacidad de unión del sitio de combinación.

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

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce entrecruzando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo para crear
15 anticuerpos biespecíficos). Los entrecruzamientos adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos diferenciados separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, disuccinimidil suberato).

20 Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Los agentes de detección útiles con los que puede derivatizarse un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánido y similares.
25 Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que sean útiles para la

detección, tales como peroxidasa de rábano picante, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando se marca un anticuerpo con una enzima detectable, ésta se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede diferenciarse. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse mediante medición indirecta de unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo puede marcarse con un agente magnético, tal como gadolinio. Un anticuerpo también puede marcarse con epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, pares de secuencias de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores epitópicos). En algunas realizaciones, los marcadores se unen por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

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

Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden composiciones y/o compuestos de la invención. Los agentes que comprenden composiciones de la invención pueden formularse y

administrarse sistémicamente. En *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración.

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

Las composiciones de la invención pueden formularse en soluciones
15 acuosas que contengan tampones fisiológicamente compatibles tales como citrato, acetato, histidina o fosfato. Cuando es necesario, dichas formulaciones también pueden contener diversos agentes de ajuste de la tonicidad, agentes solubilizantes y/o agentes estabilizantes (por ejemplo, sales tales como cloruro sódico, azúcares tales como sacarosa, manitol y trehalosa, proteínas tales
20 como albúmina, aminoácidos tales como glicina e histidina, tensioactivos tales como polisorbatos (Tweens) o codisolventes tales como etanol, polietilenglicol y propilenglicol). Las composiciones de la invención también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes dispersantes y agentes conservantes. Las composiciones
25 de la invención también pueden comprender agentes de suspensión, tales

como agar-agar, metahidróxido de aluminio, bentonita, isoestearil alcoholes etoxilados, celulosa microcristalina, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, y tragacanto o mezclas de los mismos.

Las composiciones de la invención también pueden comprender
5 diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de las composiciones inyectables de la invención puede modificarse usando agentes que pueden retrasar la absorción, por ejemplo,
10 monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones de la invención pueden contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o
15 la penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido L-metionina ascórbico, sulfito sódico o hidrógeno-sulfito sódico), tampones (tales como acetato sódico, lactato, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos,
20 fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes que proporcionan volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), DPTA), agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa
25 o dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o

inmunoglobulinas), agentes colorantes, saporíferos y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics; PEG; ésteres de sorbitán, polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos - preferentemente cloruro sódico o potásico – o sorbitol manitol), vehículos de liberación, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos.

Los componentes de la formulación pueden estar presentes en concentraciones que sean aceptables para el sitio de administración. Pueden usarse tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente menor, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

En algunos aspectos, pueden prepararse composiciones farmacéuticas de la invención en las que los compuestos de la invención se formulan para la liberación controlada o prolongada del compuesto. Los ejemplos incluyen ácido hialurónico y similares, geles poliméricos, perlas, partículas, microesferas inyectables, liposomas, películas, microcápsulas, matrices de liberación

sostenida y dispositivos de liberación de fármacos implantables.

En algunos aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas de la invención en jeringas pre-cargadas de una sola o de múltiples cámaras.

En algunos aspectos, la invención proporciona un kit que comprende al menos un compuesto o composición de la invención junto con al menos un ingrediente adecuado adicional para su uso en una composición farmacéutica. En algunos aspectos, la invención proporciona un kit que comprende al menos un compuesto o composición de la invención junto con al menos un medio para administrar dicha composición a un paciente.

Las composiciones de la invención pueden sintetizarse por unión covalente de una molécula de FGF21 a un engarce y conjugación del engarce con un sitio de combinación de un anticuerpo multivalente. Por ejemplo, un conjugado FGF21-engarce, en el que el engarce incluye un radical reactivo de dicetona o AZD (β -lactama), puede incubarse con 0,5 equivalentes de un anticuerpo aldolasa tal como h38C2 IgG1 para producir una composición de la invención.

Procedimientos de uso

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

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

diabetes.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para aumentar la secreción de insulina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un
5 derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

10 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para el tratamiento de la obesidad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para controlar o
15 reducir los niveles de peso de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

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

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para el tratamiento de la hipertensión en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado
25 farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para tratar la hepatoesteatosis en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

- 5 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

- 10 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para reducir los niveles de glucagón en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

- 15 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para reducir los niveles de triglicéridos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

- 20 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para aumentar los niveles de ácidos grasos libres no esterificados en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

- Otro aspecto de la invención es un procedimiento para reducir los niveles de colesterol de baja densidad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

- 25 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para reducir los

niveles de la proteína C reactiva en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para reducir los
5 niveles de fructosamina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para controlar el control glucémico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una
10 cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para aumentar los niveles de adipsina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un
15 derivado farmacéutico de la misma.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para aumentar los niveles de HDL en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéutico de la misma.

20 En algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento para tratar afecciones relacionadas con la diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatoesteatosis o enfermedades cardiovasculares; o controlar o reducir niveles de peso; o controlar el control glucémico; o aumentar la secreción de insulina o niveles de ácidos grasos libres no esterificados; HDL o
25 adipsina; o reducir los niveles de glucosa en sangre, glucagón, triglicéridos,

fructosamina, colesterol de baja densidad o proteína C reactiva; que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica de la invención a un sujeto.

En algunos aspectos, la invención proporciona el uso de una
5 composición o una composición farmacéutica de la invención en la preparación de un medicamento para tratar afecciones relacionadas con la diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatoesteatosis o enfermedades cardiovasculares; o controlar o reducir niveles de peso; o controlar el control glucémico; o aumentar la secreción de insulina, HDL o niveles de ácidos grasos
10 libres no esterificados; o reducir los niveles de glucosa en sangre, glucagón, triglicéridos, fructosamina, colesterol de baja densidad o proteína C reactiva.

La expresión “dosis terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, significa la cantidad de compuesto, composición o composición farmacéutica de la invención que provoca la respuesta biológica o
15 medicinal en un sistema tisular, animal o ser humano buscada por un investigador, doctor u otro profesional clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando.

Procedimientos de administración y dosificaciones

Las vías de administración de la composición de la invención pueden
20 incluir la administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, SC o intramedulares, así como la administración intratecal, intraventricular directa, IV e intraperitoneal. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa. Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante cualquiera de las vías parenterales por inyección directa de la formulación o por infusión
25 de una mezcla de la formulación de la composición de la invención con una

matriz de infusión tal como solución salina normal, D5W, solución de Ringer con lactato u otro medio de infusión usado normalmente.

En el tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, que padecen diabetes o una afección relacionada con la diabetes (o en algunos
5 aspectos, una o más de las siguientes afecciones: diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatoesteatosis, enfermedades cardiovasculares, glucosa elevada en sangre, bajos niveles de insulina, o cualquiera de las afecciones indicadas en el presente documento o una afección asociada con un síntoma indicado en el presente documento), se administra una cantidad
10 terapéuticamente eficaz de una composición de la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, puede administrarse una composición de la invención como una infusión IV diaria de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal. Por consiguiente, algunas realizaciones proporcionan una dosis de
15 aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 0,75 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 1,0 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 2,5 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones
20 proporcionan una dosis de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal. Otras realizaciones proporcionan una dosis de aproximadamente 15,0 mg/kg de peso corporal. Las dosis de una composición de la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable deben administrarse en intervalos de
25 aproximadamente una vez al día a 2 veces por semana o, como alternativa, de

aproximadamente una vez por semana a una vez al mes. En algunas realizaciones, se administra una dosis para conseguir concentraciones máximas en plasma de una composición de la invención de acuerdo con la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma de
5 aproximadamente 0,002 mg/ml a 30 mg/ml. Esto puede conseguirse por inyección estéril de una solución de los ingredientes administrados en una formulación apropiada (puede usarse cualquiera de las soluciones de formulación adecuadas conocidas por los expertos en la técnica química). Los niveles en sangre deseables pueden mantenerse por una infusión continua de
10 la composición de la invención de acuerdo con la invención como se determina por niveles en plasma medidos mediante una metodología analítica validada.

Un procedimiento para administrar una composición de la invención a un individuo comprende administrar un conjugado FGF21-engarce al individuo y permitir que forme un compuesto covalente con un sitio de combinación de un
15 anticuerpo apropiado *in vivo*. La parte de anticuerpo de una composición de la invención que se forma *in vivo* puede administrarse al individuo antes, al mismo tiempo o después de la administración del conjugado FGF21-engarce. Como alternativa, o además, puede estar presente un anticuerpo en la circulación del individuo después de la inmunización con un inmunógeno apropiado. Por
20 ejemplo, pueden generarse anticuerpos catalíticos por inmunización con un intermedio reactivo del sustrato conjugado con una proteína de soporte. En particular, pueden generarse anticuerpos catalíticos aldolasa administrando hemocianina de lapa californiana unida a un resto dicetona.

Por lo tanto, la composición puede administrarse como una sola dosis,
25 como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la

molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implante o catéter. Los expertos en la materia realizan de manera rutinaria otros perfeccionamientos de las dosificaciones apropiadas y éstos se encuentran dentro del ámbito de la tarea realizada

5 rutinariamente por ellos. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos apropiados de respuesta a la dosis.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, la vía oral, mediante inyección por vía SC, IV, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimática),

10 intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación prolongada; o mediante dispositivos de implante. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse por inyección en embolada o por infusión continua, o por un dispositivo de implante.

15 Como alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse localmente mediante implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada

20 puede realizarse por infusión, embolada de liberación temporalizada o administración continua.

Terapias de combinación

En otro aspecto de la invención, puede usarse una composición de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos usados para el

25 tratamiento de la diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes o para

aumentar la secreción de insulina o disminuir los niveles de glucosa en sangre, o tratar cualquiera de las afecciones indicadas en el presente documento. En una realización, puede administrarse una composición de la invención en combinación con insulina, tal como, por ejemplo, insulina humana sintética, que

5 incluye insulina de acción rápida, de acción corta, de acción intermedia, o de acción prolongada. En otras realizaciones, puede administrarse una composición de la invención en combinación con compuestos pertenecientes a las familias de inhibidores de α -glucosidasa, sulfonilurea, meglitinida, biguanida o tiazolidinadiona (TZD). Las composiciones de la invención también pueden

10 administrarse en combinación con proteínas o péptidos modificadores del metabolismo tales como glucoquinasa (GK), proteína reguladora de glucoquinasa (GKRP), proteínas de desacoplamiento 2 y 3 (UCP2 y UCP3), glucagón, péptido 1 y 2 semejante a glucagón (Glp1 y Glp2), una exendina (tal como exendina-4), polipéptido inhibidor gástrico (GIP), receptor α activado por

15 proliferadores de peroxisomas Glp2 (PPAR α), receptor de leptina (OB-Rb), inhibidores de DPP-IV, sulfonilureas, u otros péptidos de incretina. Un experto habitual en al materia conocerá una amplia diversidad de agentes que se usan actualmente en el tratamiento de la diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes.

20 Para evaluar la posible eficacia terapéutica de una composición de la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con otros agentes terapéuticos usados para tratar la diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes, aumentar la secreción de insulina, o disminuir los niveles de glucosa en sangre, estas combinaciones pueden

25 ensayarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la

capacidad de una combinación de una composición de la invención y otro agente terapéutico para aumentar la secreción de insulina puede medirse usando un ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa *in vitro*. En dicho ensayo, se tratan células β pancreáticas con diversas concentraciones de glucosa durante un periodo de tiempo establecido, y los niveles de insulina se miden usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, un radioinmunoensayo. El efecto de las composiciones de la invención y otros agentes terapéuticos sobre la secreción de insulina también puede medirse *in vivo*, administrando los agentes directamente a un sujeto y midiendo los niveles de insulina en muestras de fluidos corporales en diversos momentos. Los asistentes sanitarios clínicos conocerán bien procedimientos para administrar agentes terapéuticos conocidos a un sujeto para su uso en terapias de combinación.

Las dosificaciones eficaces de composición de la invención a administrar pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia que abordan parámetros tales como la semivida biológica, la biodisponibilidad y la toxicidad. Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos a usar en combinación con la composición de la invención o derivados farmacéuticamente aceptables de la misma se basan en las dosis recomendadas conocidas por los expertos en la materia para estos agentes. Estos niveles recomendados o conocidos se reducirán preferentemente en un 10%-50% de la dosificación citada después de ensayar la eficacia de estas dosificaciones en combinación con una composición de la invención o un derivado farmacéuticamente aceptable. Debe tenerse en cuenta que el médico a cargo del caso sabrá como y cuando terminar, interrumpir o ajustar la terapia

a dosificaciones más bajas debido a toxicidad, disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón o interacción fármaco-fármaco adversa. El médico a cargo del caso también sabrá como ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica es inadecuada (excluyendo la toxicidad).

- 5 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para ocasionar una mejoría de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La concentración eficaz *in vitro* de una composición de la invención puede determinarse midiendo la CE_{50} . La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos agentes *in vivo* puede
- 10 determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, determinando el valor de DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse
- 15 como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren compuestos que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos en cultivos celulares y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferentemente dentro de un intervalo de
- 20 concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivos celulares. Una dosis puede formularse en
- 25 modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes

en plasma que incluyan la CI_{50} (es decir la concentración del compuesto de ensayo que consigue una concentración semi-máxima de la producción RT a partir de células infectadas en comparación con un control no tratado como se determina en cultivo celular). Dicha información puede usarse para determinar

5 de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En las realizaciones en las que las composiciones de la invención se administran en combinación con otros agentes terapéuticos, el efecto

10 combinado de los agentes puede calcularse por el procedimiento de análisis de fármaco múltiple de Chou y Talalay (T. C. Chou and P. Talalay, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55 (1984)) usando la ecuación:

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

en la que CI es el índice de combinación, $(Dx)_1$ es la dosis del fármaco 1

15 necesaria para producir un efecto x en porcentaje en solitario, y D_1 es la dosis del fármaco 1 necesaria para producir el mismo efecto x en porcentaje en combinación con D_2 . Los valores de $(Dx)_2$ y $(D)_2$ derivan de manera similar del fármaco 2. El valor de α se determina a partir de la representación gráfica de la curva de dosis-efecto usando la ecuación de efecto medio:

20
$$\frac{fa}{fu} = \left(\frac{D}{Dm} \right)^m$$

en la que fa es la fracción afectada por la dosis D , fu es la fracción no afectada, Dm es la dosis necesaria para un efecto del 50% y m es la pendiente de la curva de dosis-efecto. Para fármacos mutuamente excluyentes (es decir, modos de acción similares), se representan gráficamente tanto los fármacos en

solitario como sus líneas paralelas en el efecto medio. Los fármacos mutuamente no excluyentes (es decir, con modo de acción independiente) proporcionarán líneas paralelas en la representación gráfica del efecto medio, pero en mezcla proporcionarán una curva ascendente cóncava. Si los agentes son mutuamente excluyentes α es 0, y si son mutuamente no excluyentes, α es 1. Los valores obtenidos suponiendo no exclusividad mutua siempre serán ligeramente mayores que los fármacos mutuamente excluyentes. Los valores $CI < 1$ indican sinergia, los valores > 1 indican antagonismo y los valores iguales a 1 indican efectos aditivos. Los efectos farmacológicos combinados también pueden calcularse usando el paquete de software CalcuSyn de Biosoft (Cambridge, UK).

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

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

Secuencias

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
1	Género FGF21 x1= H o ausente (H/Δ), x146= L/P.	<u>x</u> PIPDSSPLL QFGGQVRQRY LYTDDAQQTE AHLEIREDG <u>T</u> VGGAADQSPE SLLQL <u>K</u> AL <u>K</u> P GVIQILGV <u>K</u> T SRFLCQRP <u>D</u> G ALYGS <u>L</u> HFD <u>P</u> EACSFRELLL EDGYNVYQSE AHGLPLHLPG <u>N</u> <u>K</u> SP <u>H</u> RD <u>P</u> <u>A</u> P RGPARFLPLP GLPPAXPEPP GILAPQPPDV GSSDPLSMVG PSQGRSPSYA <u>S</u>
2	FGF21ΔH: H1 ausente (ΔH1), P146.	
3	Género 1 mutante Cys FGF21: x1= H/Δ, x79 = D/C, x125 = H/C, x129 = A/C, x146= P/L	
4	Género 2 mutante Cys FGF21 x1= H/Δ, x125 = C/H, x129 = A/C, x146 = L/P	
5	Género H125C FGF21: x1 = H/Δ, H125C, x146 = L/P	
6	FGF21ΔH-H125C-L146: ΔH1 H125C L146	
7	FGF21ΔH-H125C: ΔH1 H125C P146	
8	Género A129C FGF21: x1 = H/Δ, A129C, x146 = L/P	
9	FGF21ΔH-A129C-L146: ΔH1, A129C, L146	
10	FGF21ΔH-A129C: ΔH1, A129C, P146	
11	Género D79C FGF21: x1 = H/Δ, D79C, x146 = P/L	
12	FGF21ΔH-D79C: ΔH1, D79C, P146	
13	FGF21ΔH-D79C-L146: ΔH1, D79c, L146	
14	FGF21ΔH-L86C: ΔH1, L86C, P146	

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
15	FGF21 Δ H-T40C: Δ H1, T40C, P146	
16	FGF21 Δ H-H1C: H1C, P146	
17	Género mutante Lys FGF21: x1=H/ Δ , x56, x59, x122= K/R, R69, x146=L/P	
18	FGF21 Δ H-K56: Δ H1-K56-K59R-K69R-K122R-P146	
19	FGF21 Δ H-K59: Δ H1-K56R-K69R-K122R-P146	
20	FGF21 Δ H-K69: Δ H1-K56R-K59R-K122R-P146	
21	FGF21 Δ H-K122: Δ H1-K56-K59R-K69R-P146	
22	FGF21 Δ H-Knull-P2: Δ H1-K56R-K59R-K69R-K122R-P146	
23	FGF21 Δ H-Knull-H1K: Δ H1-H1K-K56R-K59R-K69R-K122R-P146	
24	FGF21 Δ H-Knull-S181K: Δ H1-K56R-K59R-K69R-K122R- P146-S181K	
25	Cadena ligera de h38C2	<u>ELQMTQSPSS</u> <u>LSASVGDRV</u> T <u>ITCRSSQSLL</u> <u>HTYGSPYLNW</u> <u>YLQKPGQSPK</u> <u>LLIYKVS</u> NRF <u>SGVPSRFSGS</u> <u>GSGTDFTL</u> TI <u>SSLQPEDFAV</u> <u>YFC</u> SQ <u>GTHLP</u> <u>YTFGGG</u> TKVE <u>IKRTVAAPSV</u> FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
26	Cadena pesada de h38C2	<u>EVQLVESGGG</u> <u>LVQPGGSLRL</u> <u>SCAASGFTFS</u> <u>NYWMSWVRQS</u> <u>PEKGLEWVSE</u> <u>IRLRSDNYAT</u> <u>HYAESVKGRF</u> <u>TISRDNSKNT</u> <u>LYLQMNSLRA</u>

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		<u>EDTGIYYCKT YFYSFSYWGQ GTLVTVSSAS</u> TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
27	VL de h38C2	
28	VH de h38C2	
29	VL de m38C2	
30	VH de m38C2	
31	(Gly ₄ Ser) ₃	
32	Secuencia líder N-terminal de 28 aa de FGF21 28	
33	Secuencia del resto 209 de FGF21, isoforma P174 (P146).	

La SEC ID Nº: 1 muestra la proteína expresada de 181 restos en la que H¹ es opcional y el resto 146 puede ser L o P. Las posiciones de los restos

ensayadas para la conjugación están subrayadas y se indican en negrita. En todo el texto se usa la numeración para la SEC ID N°: 1.

También se muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y pesada (SEC ID N°: 25 y 26, respectivamente) de una realización de 38c2 IgG1 humanizado. Las regiones variables (VC y VH) están subrayadas y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se representan en negrita. La lisina 99, cuya cadena lateral se combina covalentemente con los engarces descritos en el presente documento, está adyacente a la CDR3 de HC.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de los dominios variables de m38c2, h38c2 y líneas germinales humanas. Las regiones marco conservadas (FR) y las CDR se definen de acuerdo con Kabat y *col.* Los asteriscos marcan diferencias entre m38c2 y h38c2 o entre h38c2 y las líneas germinales humanas.

Figura 2A, 2B y 2C. Estudios farmacocinéticos en ratones de una sola dosis con Ab-FGF21 Δ H-A129C conjugado con Engarce-1 (L-1) en comparación con L-2, L-3, o L-4. Se administraron dosis a ratones Swiss-Webster macho jóvenes adultos IV o SC a 3 mg/kg. En todos los casos, el conjugado con L-1 funcionó mejor con respecto a la semivida (~33 horas SC e IV para el conjugado L-1, 13-23 horas SC y 22-37 horas IV para los conjugados L-2, -3, y -4) y/o biodisponibilidad SC (~100% para el conjugado L-1, 48-53% para los conjugados L-2, -3, o -4).

Figura 3A. Estudio farmacocinético en rata de una sola dosis con Ab-FGF21 Δ H-A129C conjugado con L-1 en comparación con L-2. A ratas Sprague Dawley macho adultas se les administraron dosis por vía IV o SC a 3 mg/kg.

Para ambas vías de administración, el conjugado con L-1 funcionó mejor que el conjugado L-2 con respecto a la semivida (~39 horas SC y ~60 horas IV para el conjugado L-1, ~33 horas SC y ~52 horas IV para el conjugado L-2) y la biodisponibilidad SC (~52% para el conjugado L-1, 36% para el conjugado L-2).

5 Figura 3B. Comparación de PK de Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C, Ab-L7-FGF21 Δ H-D79C y Ab-L8-FGF21 Δ H-D79C.

Figuras 4A y 4B. Área bajo la curva (ABC) de glucosa durante ensayo de tolerancia oral a glucosa (OGTT) en ratones ob/ob a los que se les administró una sola dosis SC (ABC Media de Glucosa (% de control con vehículo) en
10 corchetes): Vehículo [100], FGF21 Δ H (1 mg/kg [74]), FGF21 Δ H (0,6 mg/kg [103]) (no mostrado en la Figura 4B para mayor claridad), Ab-FGF21 Δ H-H125C (3 mg/kg [66] y 1mg/kg [87]) (conjugado con L1), Ab-FGF21 Δ H-K59 (3 mg/kg [105]) (conjugado con L5), Ab-FGF21 Δ H-Knull-H1K (3 mg/kg [100]) (conjugado con L5), control delgado [56]. *P<0,05, **P<0,01 frente a PBS por ANOVA de
15 una vía.

Figura 5A y 5B. Peso corporal acumulativo (A) y cambio de peso hepático (B) durante OGTT en ratones ob/ob a los que se administró una sola dosis SC (peso corporal medio (g) entre corchetes, peso hepático medio (g) entre llaves): Vehículo [2,6] {2,4}, FGF21 Δ H (1 mg/kg [2,5] {2,2}), FGF21 Δ H (0,6
20 mg/kg [3,2] {2,4}), Ab-FGF21 Δ H-A129C (3 mg/kg [1,7] {2,0}) (conjugado con L1), Ab-FGF21 Δ H-K59 (3 mg/kg [2,7] {2,4}) (conjugado con L5), Ab-FGF21 Δ H-Knull-H1K (3 mg/kg [2,6] {2,4}) (conjugado con L5), control delgado [0,6] {1,0}. *P<0,05, **P<0,01 frente PBS por ANOVA de doble vía (A) y ANOVA de una vía (B).

Figura 6A. Cambio de peso corporal acumulativo en ratones ob/ob a los que se administró una sola dosis (peso corporal medio (g) entre corchetes): Vehículo [1,7], FGF21 Δ H [1,9], FGF21 Δ H-D79C (2 mg/kg [2,1]), Ab-FGF21 Δ H-D79C (10 mg/kg [1,4]), Ab-FGF21 Δ H-H125C (10 mg/kg [0,8]), y Ab-FGF21 Δ H-A129C (10 mg/kg [0,9]), vehículo delgado [0,6]. d0: día 0. Todos los conjugados Ab usaron L1. **P<0,01 frente a PBS por ANOVA de doble vía.

Figura 6B. ABC de glucosa durante OGTT en ratones ob/ob a los que se administró una sola dosis (ABC de glucosa media en % entre corchetes): vehículo [100], FGF21 Δ H [63], Ab-FGF21 Δ H-D79C (2 mg/kg [86]), FGF21 Δ H-D79C (10 mg/ml [54]), Ab-FGF21 Δ H-H125C (10 mg/ml [51]), y Ab-FGF21 Δ H-A129C (10 mg/kg [54]), control delgado [48]. Todos los conjugados Ab usaron L1. **P<0,01 frente a Vehículo por ANOVA de una vía.

Figura 6C. ABC de glucosa durante OGTT en ratones ob/ob a los que se administró FGF21 Δ H y Ab-FGF21 Δ H-D79C, (10 mg/kg). Ab-FGF21 Δ H-D79C se conjugó con Engarce-1. **P<0,01 frente a Vehículo.

Figura 6D. ABC de glucosa durante OGTT en ratones ob/ob a los que se administró FGF21 Δ H y Ab-FGF21 Δ H-D79C (10 mg/kg) el día 6. Ab-FGF21 Δ H-D79C se conjugó con L1. **P<0,01 frente a ob/ob-PBS.

Figura 6E. ABC de glucosa durante OGTT realizada en ratones ob/ob a los que se administró una sola dosis de Ab-FGF21 Δ H-A129C los días 0, 1, 2, o 3 (3 mg/kg). El Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. *P<0,05, ***P<0,001 contra PBS por ANOVA de una vía.

Figura 6F. Una sola dosis de Ab-FGF21 Δ H-A129C aumenta la expresión de Ucp1 en tejido adiposo blanco en ratones ob/ob (10 mg/kg). Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1.

Figura 6G. Una sola dosis de Ab-FGF21 Δ H-A129C disminuye los triglicéridos hepáticos en ratones ob/ob (10 mg/kg). Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. *P<0,05, ***P<0,001 frente a Vehículo por ANOVA de una vía.

Figura 6H. Cambio de peso corporal acumulativo en ratones ob/ob a los
5 que se administró una sola dosis de Ab-FGF21 Δ H-A129C los días 0, 1, 2, o 3 (10 mg/kg). Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1.

Figura 7A. Una dosis repetida de Ab-FGF21 Δ H-A129C (10 mg/kg el día 0 y 7) mejora la tolerancia a la glucosa en ratones DIO. El OGTT se realizó el día 10. Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001
10 frente a Vehículo por ANOVA de una vía.

Figura 7B. Cambio de peso corporal acumulativo en ratones DIO a los que se habían administrado dos dosis de Ab-FGF21 Δ H-A129C el día 0 y 7 (10 mg/kg). Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. *P<0,05, frente a Vehículo por ANOVA de doble vía.

Figura 7C. La dosis repetida de Ab-FGF21 Δ H-A129C aumenta la
15 expresión de Ucp1 en tejido adiposo blanco en ratones DIO (10 mg/kg). Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. **P<0,01 frente a Vehículo por ANOVA de una vía.

Figura 7D. Ab-FGF21 Δ H-A129C disminuye los triglicéridos en suero en
20 ratones DIO (10 mg/kg). Figura 7E. Ab-FGF21 Δ H-A129C disminuye los ácidos grasos no esterificados en suero en ratones DIO (10 mg/kg). Figura 7F. Peso hepático con Ab-FGF21 Δ H-A129C. Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 frente a Vehículo (A, B) y frente a PBC (C) por ANOVA de una vía.

Figura 7G, 7H, 7i. Efecto de Ab-FGF21 Δ H-A129C sobre la Expresión Génica Hepática en Ratones *ob/ob*. (7G) SCD1: estearoil-CoA desaturasa 1, (7H) MOGAT2: monoacilglicerol aciltransferasa 2 (7i) FoxA2: factor A2 de transcripción de cabeza en orquilla. A2. Ab-FGF21 Δ H-A129C se conjugó con L1. **P<0,01 frente a Vehículo por ANOVA de una vía.

Figura 7J, 7K. Niveles en suero relacionados con la dosis de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en ratones *ob/ob* (7J) a los que se administró una dosis de 10 mg/kg y (7K) una dosis a 3mg/kg.

Figura 8A. Niveles de glucosa en plasma sobre todo el periodo de pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico. Figura 8B. Velocidades de infusión de glucosa durante el periodo completo del pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico. Figura 8C. Producción de glucosa hepática en condiciones basales y de pinzamiento (** = P< 0,0001).

Figuras 9A-E y 9H-9P. Los valores representan la media $\pm$ ETM, n=5 para AB-L1-FGF21 Δ H-A129C 1,5 mg/kg y FGF21 Δ H (proteína de control), n=6 para AB-L1-FGF21 Δ H-A129C 0,15 mg/kg y grupo de vehículo. En cada punto de tiempo se calculó el significado de los grupos tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C frente al vehículo. Para el grupo FGF21 Δ H, el significado en cada punto de tiempo se calcula frente a la línea basal. Los valores de significado son a = p<0,05, b = p<0,01, c = p<0,005 y d = p<0,001. El eje Y muestra cambios con respecto a la línea basal.

Figura 9A. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre el peso corporal.

Figura 9B. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre glucosa en plasma en ayunas.

Figura 9C. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre insulina en plasma en ayunas.

Figura 9D. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre fructosamina en plasma en ayunas.

5 Figura 9E. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre glucagón en plasma en ayunas.

Figura 9F. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre un ensayo de tolerancia a glucosa intravenosa (IVGTT), Δ ABC de glucosa. Los valores representan la media de Δ ABC $\pm$ ETM. Para los grupos tratados con 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C se evaluó el significado estadístico
10 frente al vehículo mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía con ensayo posterior de Dunnetts. Se evaluó el significado a través de los puntos de tiempo de IVGTT frente a la línea basal para el grupo de proteína de control FGF21 por medición repetida ANOVA con ensayo posterior de Dunnetts.

15 Figura 9G. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre Δ ABC de insulina de IVGTT. Los valores representan la media Δ ABC $\pm$ ETM. Para los grupos tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg, se evaluó el significado estadístico frente al vehículo mediante ANOVA de una vía con ensayo posterior Dunnetts. Se evaluó el significado a través de los puntos de
20 tiempo de IVGTT frente a la línea basal para el grupo de proteína de control FGF21 por medición repetida ANOVA con ensayo posterior Dunnetts.

Figura 9H. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre colesterol en plasma total en ayunas.

Figura 9i. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre triglicéridos en
25 plasma en ayunas.

Figura 9J. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre ácidos grasos libres en plasma en ayunas.

Figura 9K. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre colesterol de lipoproteína de baja densidad en plasma en ayunas.

5 Figura 9L. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre cuerpos cetónicos totales en plasma en ayunas.

Figura 9M. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre adiponectina en plasma en ayunas.

10 Figura 9N. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre proteína C reactiva en plasma en ayunas.

Figura 9o. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre leptina en plasma en ayunas.

Figura 9P. Efecto de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre adiposina en plasma en ayunas.

15 **Ejemplos**

Los siguientes Ejemplos que ilustran realizaciones típicas de la invención, ilustran la versatilidad de la misma y, de ninguna manera, limitan las reivindicaciones ni la memoria descriptiva.

Ejemplo 1 Identificación del sitio de contacto óptimo sobre FGF-21

20 Se emprendió un estudio para identificar el sitio óptimo para realizar la conjugación, mediante un engarce, de FGF21 con un sitio de combinación de un anticuerpo catalítico. Se consideraron dos estrategias de conjugación: la conjugación a través de una cadena lateral de lisina en superficie y conjugación a través de una cadena lateral de cisteína en superficie. Generalmente, las

25 proteínas globulares no tienen restos de cisteína desparejados en su superficie

y por tanto la incorporación de una sola cisteína en la superficie de la proteína puede usarse para modificarla por ingeniería genética en un solo sitio para conjugación específica. Sin embargo, frecuentemente la mutación con cisteína de restos en la superficie puede ocasionar problemas tales como dimerización intermolecular, emparejamiento erróneo de enlaces disulfuro nativos e interferencia con la unión al receptor. Por estas razones, la conjugación de proteínas está más comúnmente influenciada mediante restos de lisina.

Modelación por homología del receptor del FGF21 y su mecanismo de activación

El FGF21 se une al FGFR1c y al FGFR4, pero el complejo receptor puede activarse solamente a través del FGFR1c. Aunque el FGFR1b y el FGFR1c comparten una identidad del 87% (el FGFR1b es idéntico al FGFR1c a excepción de la región de corte y empalme alternativa IIIb/c), el FGF21 sólo reconoce específicamente al FGFR1c. En este caso, la modelación por homología de la estructura del complejo del FGF21-FGFR1c se realizó usando, como un molde, la estructura cristalina del FGFR2-FGFR1c. Se usó un soporte lógico (software) MOE para la modelación por homología y análisis estructural. La activación del receptor requiere otro receptor de superficie celular, β Klotho. β Klotho tiene dos dominios que son muy similares (idénticos ~35%) a la β -glucosidasa citosólica humana. La estructura de β Klotho humano se modeló usando β -glucosidasa citosólica humana y la estructura en la estructura modelada de FGF21-FGFR1c alineada. Esta estructura del complejo modelado proporcionó directrices lógicas para los sitios de conjugación de lisina óptimos e incorporación de restos de cisteína óptimos en FGF21, que no debe

interrumpir las interfaces de unión entre FGF21 y FGFR1c ni entre FGF21 y β Klotho.

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

La exposición al disolvente puede evaluarse en base al área de superficie accesible (ASA). El cálculo del ASA de la estructura modelada del FGF21 se realizó con software CCP4 (la Serie CCP4: Programas para
10 Cristalografía de Proteínas". (1994) Acta Cryst. D50, 760-763) y un programa interno. Brevemente el programa en CCP4 calcula un valor en Angstroms al cuadrado por restos en su registro de actividades. Para calcular la fracción del ASA (fASA) se usó un programa interno para normalizar el ASA por resto. La Tabla 1 muestra restos de ASA así como de fASA. No se incluyen restos en los
15 que se supone que la cadena lateral oculte la superficie. La columna 1 es el nombre del aminoácido, la 2 es el número de resto, la 3 es el ASA (en Angstrom al cuadrado) y la columna 4 es la fracción expuesta. El valor de fASA define la accesibilidad del disolvente hacia el resto de aminoácido en un polipéptido determinado. Un valor de fASA próximo a cero indica que se
20 supone que el resto es inaccesible al disolvente, lo que sugiere que es más improbable que este sea accesible a los engarces para la conjugación. Se usó un valor de fASA mínimo absoluto de 0,3, con valores de área de superficie >1.00 sugerentes de sitios de conjugación candidatos particularmente probables.

En base al análisis ASA, se consideró que K122 (área de superficie de 164,4) y K59 (área de superficie de 117,2) eran los sitios candidatos más prometedores para la conjugación. Con fines comparativos, también se conjugaron K69 (área de superficie 91) y K56 (área de superficie 73).

Aminoácido	Número de resto	Area de Superficie	Fracción Expuesta	Aminoácido	Número de	Area de Superficie	Fracción Expuesta
GLY	14	105,2	1,25387	PHE	88	123	0,55083
GLN	15	158,5	0,83774	ASP	89	50,7	0,32626
VAL	16	81,5	0,50216	PRO	90	107,5	0,7424
ARG	17	91,6	0,36743	GLU	91	121,5	0,64904
ARG	19	78,6	0,31528	ARG	96	92,6	0,37144
ALA	26	93,9	0,8067	LEU	98	114	0,57576
GLN	27	126,5	0,66861	LEU	99	113,2	0,57172
GLN	28	169,4	0,89535	GLU	101	182,1	0,97276
THR	29	64,2	0,43349	ASP	102	94,6	0,60875
GLU	30	103,9	0,55502	GLY	103	56,1	0,66865
GLU	37	117,1	0,62553	GLN	108	72,6	0,38372
ASP	38	90,5	0,58237	GLU	110	132,4	0,70727
THR	40	49,8	0,33626	ALA	111	62,7	0,53866
GLY	43	38,1	0,45411	GLY	113	56,8	0,677
ALA	45	93,6	0,80412	LYS	122	164,4	0,79229
ASP	46	95	0,61133	PRO	124	67,4	0,46547
PRO	49	82,4	0,56906	HIS	125	168,4	0,84836
GLN	54	66,8	0,35307	ARG	126	131,4	0,52708
LYS	56	73	0,35181	PRO	128	91,3	0,63053
ALA	57	46,6	0,40034	ALA	129	78,8	0,67698
LEU	58	82,7	0,41768	ARG	131	225,5	0,90453
LYS	59	117,2	0,56482	GLY	132	65,8	0,78427
PRO	60	153,8	1,06215	PRO	133	84,9	0,58633
GLY	61	27,9	0,33254	ARG	135	106,2	0,42599
VAL	68	58,8	0,36229	GLY	141	30,4	0,36234
LYS	69	91	0,43855	LEU	142	69,1	0,34899
SER	71	69	0,54893	PRO	143	71,4	0,49309
ARG	77	129,4	0,51905	ALA	145	86,4	0,74227
PRO	78	98,9	0,68301	LEU	146	123,3	0,62273
ASP	79	109,8	0,70656	PRO	147	131,1	0,90539
TYR	83	84,4	0,35418	GLU	148	67,3	0,35951
LEU	86	119,4	0,60303	PRO	149	170	1,17403
HIS	87	104,8	0,52796				

Tabla 1 Comparación de restos de superficie del FGF21**Ejemplo 2 Generación de proteínas y mutantes del FGF21**

El ADNc del FGF21 se adquirió de la ATCC. Se construyeron vectores de expresión mamíferos y bacterianos usando pcDNA3.1 (Invitrogen®) y pET21b (EMD), respectivamente. Para las variantes mutacionales del FGF21, se introdujeron mutaciones en los vectores de expresión usando un kit de mutagénesis dirigido QuikChange® (Stratagene®). La presencia de las mutaciones deseadas se verificó por secuenciación de ADN.

Para la expresión de mamíferos, se transfectaron células HEK293F (Invitrogen®) con el vector de expresión de FGF21 mamífero usando el reactivo 293fectina (Invitrogen®) y cultivo en medio asérico. El medio acondicionado, esterilizado por filtración, se dializó frente a un tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y se cargó sobre una columna HiTrap Q (GE healthcare®) preequilibrada con el tampón A. La proteína FGF21 se eluyó con un gradiente lineal del tampón A al tampón B (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM). La fracción agrupada se concentró y se cargó sobre Sephadex 300 con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). La solución de proteína resultante se concentró y se conservó por debajo de -80 °C. La pureza se confirmó por SDS-PAGE y RP-HPLC.

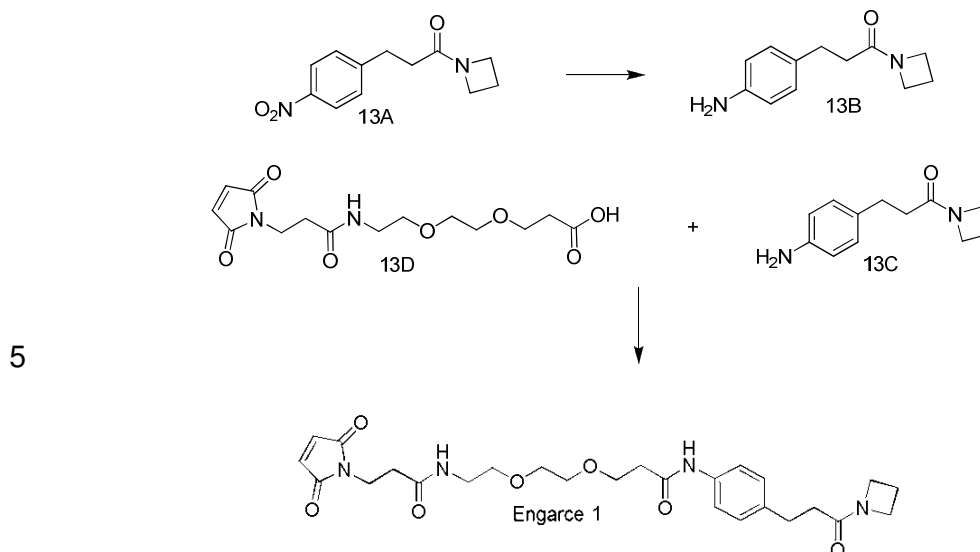
Para la producción de FGF21 Δ H a partir de *E.coli*, el vector de expresión bacteriano se transformó en la cepa huésped BL21- (DE3)-RIL (Stratagene®). Las células transformadas se cultivaron en 1 litro de medio LB a 37 °C y la expresión se inició por adición de isopropil β -D-tiogalactopiranosido 1 mM. Después de 4 horas, las células se recogieron y se congelaron a -20 °C. La pasta celular congelada se suspendió en tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 10

mM, pH 7,5), y se pasó 4 veces a través del microfluidizador. Después de 30 minutos de centrifugación a 17.000 X g, a 4 °C, el sedimento que contenía cuerpos de inclusión (CI) se resuspendió en Tris 50 mM, pH 7,5. La suspensión con CI lavada se centrifugó (30 min, 17.000 X g, 4 °C). El sedimento con CI se conservó a -80 °C. El sedimento con CI congelado se disolvió con urea 7 M, DTT 5 mM y bis-tris propano 50 mM, pH 10,5 para proporcionar de 1 a 10 mg/ml de FGF21 y se agitó durante 1 hora para disolver y reducir la proteína.

Después el CI disuelto se diluyó 10 veces en Bis-Tris propano 50 mM, pH 8,0. La concentración de proteína total era de 0,1 a 1 mg/ml. La solución se agitó durante ~2 días y se dializó frente a 4 litros de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. La solución de la proteína se centrifugó a 14.000 X g durante 30 min. El sobrenadante se cargó sobre una columna HP HiTrap Q (GE Healthcare®) y se equilibró con tampón A (véase anteriormente). Las proteínas bacterianas no unidas se lavaron con tampón A y la proteína FGF21 se eluyó con un gradiente lineal de tampón B. Después la fracción FGF21 se cargó sobre una columna HP quelante HiTrap (GE Healthcare®) previamente equilibrada con tampón PBS. La proteína FGF21 se eluyó con un gradiente lineal de tampón PBS a tampón PBS más imidazol 100 mM (el pH se ajustó a 7,4). Las fracciones se recogieron y se concentraron (hasta 50 mg/ml) y la solución de proteína se aplicó a una columna de exclusión por tamaño (Hiload 26/60, superdex 300) equilibrada con PBS (Gibco®, pH 7,4). La proteína purificada se esterilizó mediante un filtro de 0,22 µm y se conservó a -80 °C. La producción típica de FGF21ΔH a partir de medio de cultivo de 8 l fue de 600 ~ 700 mg. La pureza típica fue > 95%. El nivel típico de endotoxina fue ~ 1 EU/mg. Se produjeron los mutantes de FGF21 de cisteína y lisina con respecto a arginina y se purificó de

manera similar para FGF21 Δ H. Una producción típica de proteína purificada fue 350 ~ 400 mg. La cisteína libre se confirmó usando reactivo de Ellman.

Ejemplo 3 Síntesis del Engarce 1



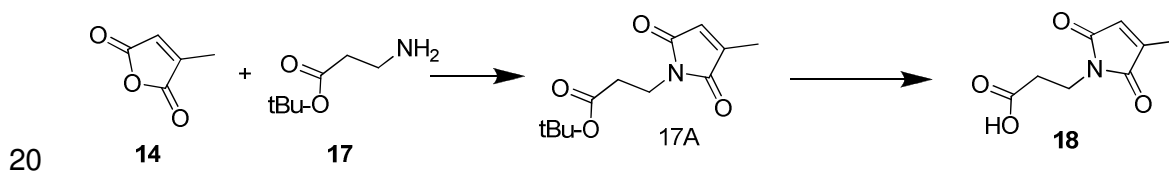
Síntesis del Engarce 1: En una parte se añadió paladio sobre carbono (por ejemplo, aproximadamente 1,0 g, aproximadamente 0,47 mmol) seguido de ácido clorhídrico (por ejemplo aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 30,2 mmol) gota a gota a una suspensión de **13A** (por ejemplo aproximadamente 5 g, aproximadamente 20,1 mmol) en metanol (por ejemplo aproximadamente 200 ml) a aproximadamente 35 °C con atmósfera de nitrógeno. El hidrógeno se introdujo burbujeando lentamente en la solución a aproximadamente 35 °C y la solución se agitó durante aproximadamente 2 horas a esta temperatura. El sólido se filtró a través de un lecho de celita y se recogió. El filtrado se concentró a presión reducida y el sólido se secó al vacío para dar **13B** como sal clorhidrato. El compuesto **13B** se mezcló con diclorometano (por ejemplo aproximadamente 200 ml) y la solución de bicarbonato de sodio saturada (por ejemplo, aproximadamente 250 ml) y la

10

15

capa de diclorometano se separaron. La capa de diclorometano se lavó con cloruro de sodio saturado (por ejemplo aproximadamente 250 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. La capa orgánica se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO₂, aproximadamente etil acetato al 60% en hexanos) para dar una producción de aproximadamente un 68% (por ejemplo aproximadamente 2,94 g) de **13C**. Una solución de **13C** (por ejemplo aproximadamente 4,65 g, aproximadamente 21,3 mmol), **13D** (por ejemplo aproximadamente 7,00 g, aproximadamente 21,3 mmol) clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (por ejemplo aproximadamente 3,3 g, aproximadamente 21,3 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (por ejemplo aproximadamente 2,75 g, aproximadamente 21,3 mmol) en diclorometano (por ejemplo aproximadamente 200 ml) a aproximadamente 0 °C con nitrógeno se agitó durante 5 minutos y a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. La capa orgánica se lavó con una solución de bicarbonato de sodio diluida y la solución de cloruro de sodio saturada se concentró al vacío y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO₂, acetonitrilo) para proporcionar el Engarce 1 (por ejemplo aproximadamente 8,25 g una producción de aproximadamente el 73%).

Ejemplo 4 Síntesis del Engarce 2



5
10

se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con acetato de etilo (por ejemplo aproximadamente 3x aproximadamente 30 ml). La capa orgánica se lavó con agua (por ejemplo aproximadamente 2 X aproximadamente 30 ml) y salmuera (por ejemplo aproximadamente 30 ml) y después se secó sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó al vacío y la mezcla en bruto se purificó por cromatografía de columna. Las fracciones deseadas se agruparon y se concentraron a presión reducida para dar **17A**.

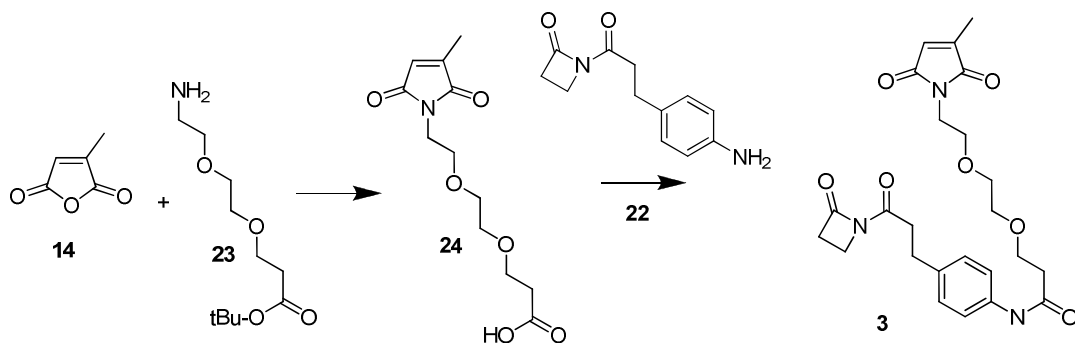
El compuesto **17A** (por ejemplo aproximadamente 0,5 g, aproximadamente 2,09 mmol) se agitó en aproximadamente ácido trifluoroacético al 15% en diclorometano a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas y se concentró hasta secarse a presión reducida. El ácido libre **18** se añadió a la N-hidroxisuccinimida (por ejemplo aproximadamente 0,25 g, aproximadamente 2,09 mmol) en tetrahidrofurano (por ejemplo aproximadamente 20 ml), seguido por diisopropilcarbodiimida (por ejemplo aproximadamente 0,33 ml, aproximadamente 2,09 mmol) y se agitó durante aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente. La diisopropil urea se eliminó por filtrado. El filtrado se evaporó hasta sequedad. Se añadió éter de petróleo (por ejemplo aproximadamente 30 ml) al resto, se trituro, se agitó y la capa de éter de petróleo se decantó. Este procedimiento se repitió una vez más con éter de petróleo y el producto **18** se secó al vacío.

A una solución de THF del **18** activado se añadió amina-peg2-tbutil éster, **19** (por ejemplo aproximadamente 0,5 g, 2,09 mmol) seguido de abundante DIPEA (por ejemplo ,aproximadamente 3 equivalentes). La solución se agitó a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora y se purificó por HPLC-MS recogiendo una Masa de 343 y 399. Las fracciones que contenían el

producto deseado se agruparon y se liofilizaron para recoger **20**. El resto se disolvió en ácido trifluoroacético aproximadamente al 15% en diclorometano y algunas gotas de agua y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. La reacción se concentró a aproximadamente 1 ml y el producto se trató con precipitado de agua. El material en bruto se purificó usando HPLC-MS para producir **21** (M+343).

Se agitó una solución de ácido **21** (por ejemplo aproximadamente 60 mg, aproximadamente 0,18 mmol), HBTU (por ejemplo aproximadamente 137 mg, aproximadamente 0,36 mmol), y clorhidrato de anilina **22** (por ejemplo aproximadamente 45 mg, aproximadamente 0,18 mmol), diisopropiletilamina (por ejemplo aproximadamente 0,14 ml, aproximadamente 0,90 mmol) en DMF (por ejemplo aproximadamente 2 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos y se purificó usando HPLC-MS. La fracción deseada se agrupó y se concentró para recoger **L2** (por ejemplo aproximadamente 16 mg, aproximadamente 0,03 mmol).

Ejemplo 5 Síntesis del Engarce 3

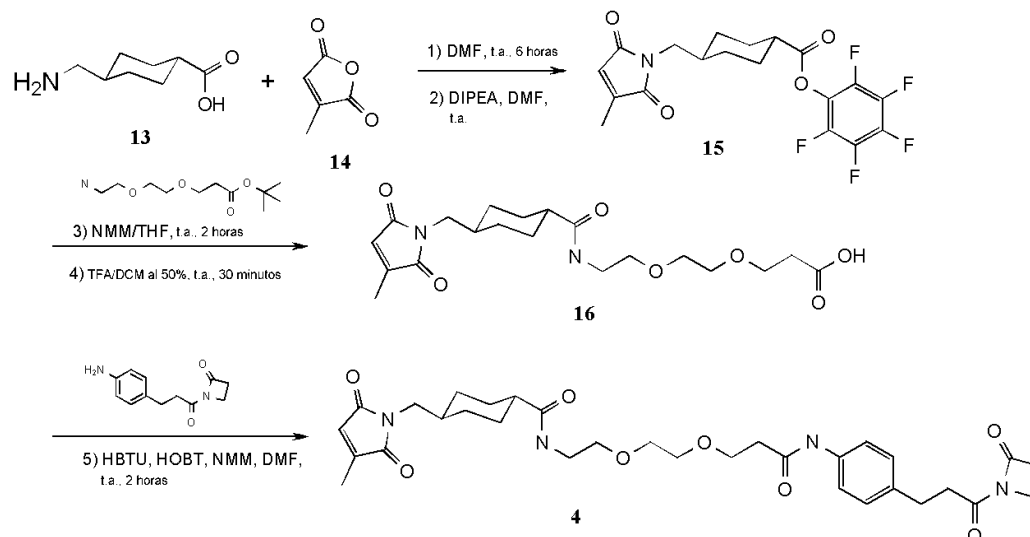


Se agitó una solución de anhídrido citracónico, **14** (por ejemplo aproximadamente 0,5 g, aproximadamente 16,4 mmol), amina-peg2-tbutil éster **23** (por ejemplo aproximadamente 1,0 g, aproximadamente 4,2 mmol) en DMF

- (por ejemplo aproximadamente 10 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Se añadió diisopropilcarbodiimida (por ejemplo aproximadamente 0,8 ml, aproximadamente 5,2 mmol) y HOBT (por ejemplo aproximadamente 0,7 g, aproximadamente 6,1 mmol) y la reacción se calentó a
- 5 aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 2 horas. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente durante una noche y se filtró la urea. El filtrado se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con salmuera y se concentró hasta producir aceite. El producto en crudo se disolvió en HCl 6 N aproximadamente al 50% en acetonitrilo para desproteger el ácido.
- 10 El producto se disolvió en DMF, se filtró y se purificó usando HPLC-MS para recoger **24** (por ejemplo aproximadamente 208 mg, aproximadamente 0,7 mmol).

- Se añadió una solución de maleimida, **24** (por ejemplo aproximadamente 0,16 g, aproximadamente 0,6 mmol) y clorhidrato de anilina **22** (por ejemplo
- 15 aproximadamente 150 mg, aproximadamente 0,6 mmol) en DMF, HBTU y DIEA abundantes (por ejemplo aproximadamente más de 3 equivalentes de cada uno). El material en bruto se purificó mediante aproximadamente 2 inyecciones en un HPLC-MS. Las fracciones deseadas que contenían el material más puro se agruparon y se liofilizaron para recoger **L3** (por ejemplo aproximadamente
- 20 17,3 mg, aproximadamente 36,7 mmol).

Ejemplo 6 Síntesis del Engarce 4



Se agitó una solución de anhídrido citracónico (**14**, por ejemplo aproximadamente 510 mg, aproximadamente 4,55 mmol) y ácido trans-4-aminometil ciclohexano carboxílico (**13**, por ejemplo aproximadamente 716 mg, aproximadamente 4,55 mmol) en dimetilformamida (por ejemplo aproximadamente DMF, aproximadamente 5 ml) con nitrógeno (N₂) a temperatura ambiente durante aproximadamente 6 horas. La solución de la reacción se enfrió a aproximadamente 0 °C, se añadió DIPEA (por ejemplo aproximadamente 1,98 ml, aproximadamente 11,4 mmol) seguido de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (por ejemplo aproximadamente 1,96 ml, aproximadamente 11,4 mmol) en DMF (por ejemplo aproximadamente 3 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente otras 16 horas con N₂. El sólido se filtró y el filtrado se vertió en aproximadamente 30 ml de agua, se extrajo con diclorometano (por ejemplo aproximadamente 2x aproximadamente 30 ml) y la capa de diclorometano se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó al vacío y la mezcla en bruto se purificó por cromatografía de columna para producir aproximadamente 550 mg

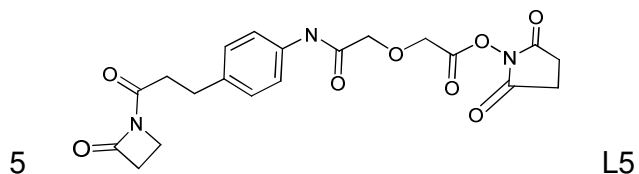
del producto intermedio pentafluorofenil éster (**15**, por ejemplo aproximadamente una producción del 29%).

Se añadió N-metil morfolina (por ejemplo aproximadamente 290 μ l, aproximadamente 2,64 mmol) a la solución del producto intermedio pentafluorofenil éster (**15**, por ejemplo aproximadamente 550 mg, aproximadamente 1,32 mmol) y terc-butil éster del ácido 3-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-propiónico (por ejemplo aproximadamente 295 mg, aproximadamente 1,32 mmol) en tetrahidrofurano (THF, por ejemplo aproximadamente 5 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. El disolvente se eliminó al vacío y el resto se disolvió en DMF y se purificó por HPLC preparativa. El producto intermedio *terc*-butil éster obtenido se trató con ácido trifluoroacético aproximadamente al 50% en diclorometano (por ejemplo aproximadamente 4 ml) durante aproximadamente 30 minutos. El disolvente se eliminó al vacío y el resto se purificó por HPLC preparativa para obtener aproximadamente 300 mg del producto intermedio ácido **16** como un sólido blanco (por ejemplo aproximadamente una producción del 55%; MS: 411,2 (M+H⁺)).

Se agitó una solución del producto intermedio ácido anterior (**16**, por ejemplo aproximadamente 33 mg, aproximadamente 0,08 mmol), 1-[3-(4-amino-fenil)-propionil]-acetidin-2-ona (por ejemplo aproximadamente 18 mg, aproximadamente 0,08 mmol), HOBT (por ejemplo aproximadamente 25 mg, aproximadamente 0,16 mmol) y HBTU (por ejemplo aproximadamente 61 mg, aproximadamente 0,16 mmol), y N-metil morfolina (por ejemplo aproximadamente 44 μ l, aproximadamente 0,4 mmol) en DMF (por ejemplo aproximadamente 1 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 2

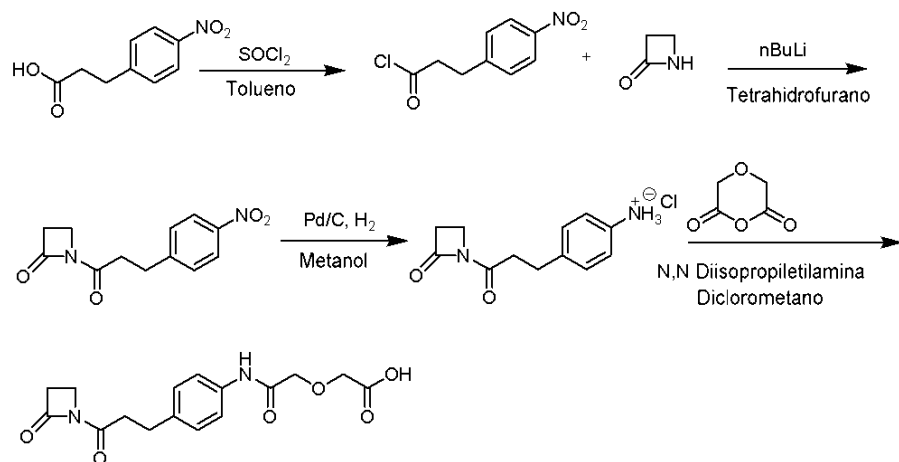
horas. La mezcla en bruto se purificó por HPLC preparativa para obtener **L4** como aceite incoloro (por ejemplo aproximadamente 22 mg, producción del 45%; MS: 611,4 (MH⁺)).

Ejemplo 7 Síntesis del Engarce 5

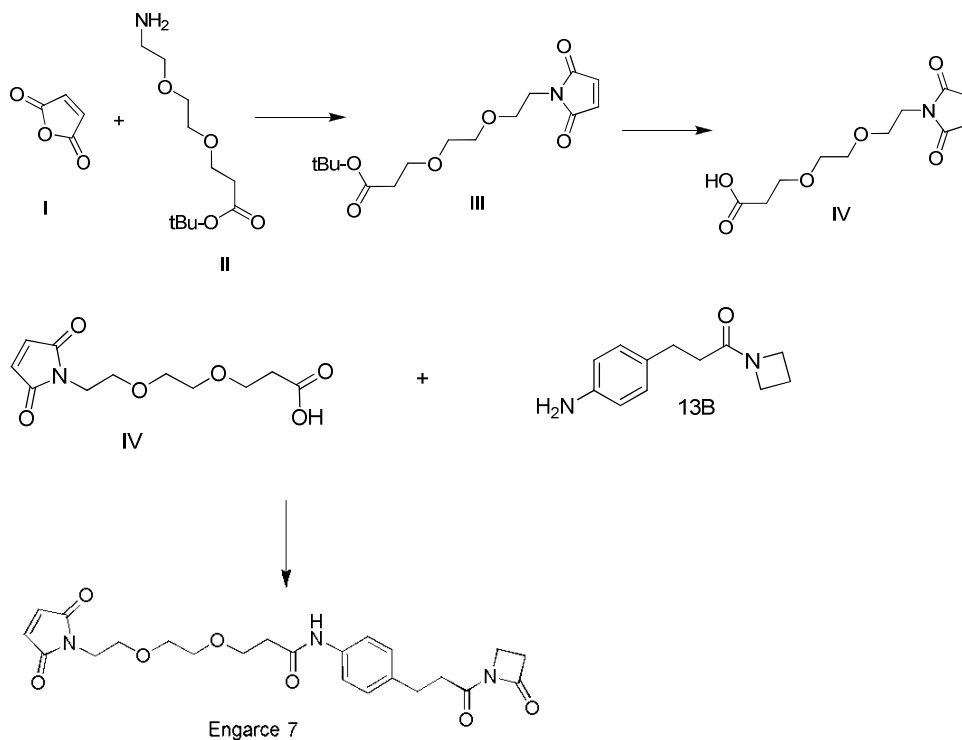


Se añadió diisopropil carbodiimida (por ejemplo aproximadamente 3,11 ml, aproximadamente 19,86 mmol, aproximadamente 2,95 eq) a una solución del Engarce **6** (por ejemplo, aproximadamente 6,63 g, aproximadamente 20,69 mmol, aproximadamente 3,07 eq) y N-hidroxisuccinimida (por ejemplo aproximadamente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

Ejemplo 8 Síntesis del Engarce 6



Ejemplo 9 Síntesis del Engarce 7



5

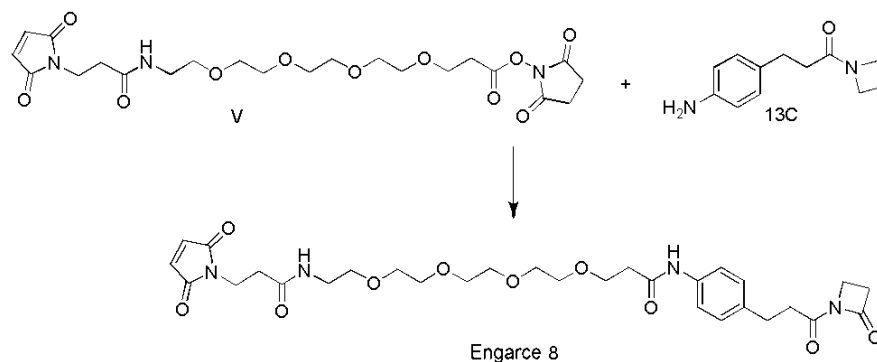
Se agitó una solución de I (por ejemplo aproximadamente 438 mg, aproximadamente 4,47 mmol) y II (por ejemplo aproximadamente 1,04 g, aproximadamente 4,47 mmol) en dimetil formamida (por ejemplo

aproximadamente 25 ml) con una atmósfera de nitrógeno durante aproximadamente 2,5 horas. La reacción se enfrió a aproximadamente 0 °C usando un baño con hielo. Se añadió 1-hidroxipirrolidina-2,5-diona (por ejemplo aproximadamente 647 mg, aproximadamente 5,62 mmol), y N-(3-
5 dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (por ejemplo aproximadamente 1,71 g, aproximadamente 8,92 mmol) y se agitó a temperatura ambiente aproximadamente durante una noche. La capa orgánica se diluyó con diclorometano, se lavó con agua, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO₂, acetato de etilo
10 aproximadamente al 75% en hexanos a aproximadamente metanol al 5% en diclorometano para obtener **III** (por ejemplo aproximadamente 767 mg). Se agitó una solución de **III** (por ejemplo aproximadamente 573 mg, aproximadamente 1,83 mmol) en diclorometano (por ejemplo aproximadamente 15 ml) y ácido trifluoroacético (por ejemplo aproximadamente 1,16 ml) durante
15 aproximadamente 9,5 horas a temperatura ambiente aproximadamente. El material se concentró a presión reducida y se secó en una bomba de vacío durante una noche para obtener **IV**. El compuesto **IV** en bruto se disolvió en diclorometano (por ejemplo aproximadamente 15 ml), y dimetil formamida (aproximadamente 2 gotas) y se agitó con oxalil cloruro (por ejemplo
20 aproximadamente 465 mg, aproximadamente 3,66 mmol) durante aproximadamente 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el aceite se secó al vacío durante 1 hora. El aceite se disolvió en diclorometano (por ejemplo aproximadamente 15 ml) y se agitó con **13B** (por ejemplo aproximadamente 464 mg, aproximadamente 1,83 mmol) y diisopropil etilamina
25 (por ejemplo aproximadamente 2,9 ml, aproximadamente 16,5 mmol) con

nitrógeno durante aproximadamente 30 minutos. La capa orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, solución saturada de cloruro de sodio, se concentró a presión reducida y se purificó usando cromatografía ultrarrápida (SiO_2 , etil acetato aproximadamente al 85% en hexanos a

5 aproximadamente etil acetato al 100%) para obtener el Engarce 7 (por ejemplo aproximadamente 323 mg, aproximadamente 39%).

Ejemplo 10 Síntesis del Engarce 8



Se agitó una solución de **V** (por ejemplo aproximadamente 980 mg, aproximadamente 1,91 mmol), **13C** (por ejemplo aproximadamente 484 mg, aproximadamente 1,91 mmol), diisopropiletilamina (por ejemplo aproximadamente 2 ml, aproximadamente 11,5 mmol) en diclorometano durante aproximadamente 6 horas a aproximadamente temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente otro 1 eq de **13C** (por ejemplo

10 aproximadamente 484 mg, aproximadamente 1,91 mmol) y aproximadamente 3 eq de diisopropiletilamina (por ejemplo aproximadamente 1 ml, aproximadamente 5,73 mmol) y se agitó a aproximadamente temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, solución saturada de cloruro de sodio, se

15

20 secó (sobre sulfato de sodio) se filtró, se concentró a presión reducida y se

purificó usando cromatografía ultrarrápida (etil acetato aproximadamente al 100% a aproximadamente 5% de metanol en etil acetato a aproximadamente metanol al 10% en etil acetato) para obtener el Engarce 8 (por ejemplo aproximadamente 285 mg, aproximadamente el 24%).

5 **Ejemplo 11 Conjugación de proteína y engarce**

Se hicieron reaccionar las proteínas mutantes FGF21 con el engarce en cuestión a una proporción molar de 1:10 a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, todas las proteínas FGF21 unidas al engarce se purificaron usando una columna PD-10 y el tampón se intercambió en Tris-HCl 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0.

Ejemplo 12 Conjugación del complejo proteína-engarce con anticuerpo.

Todas las proteínas FGF21 unidas al engarce se fusionaron con h38C2 IgG1 (SEC ID N°: 25 y 26) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0) a una proporción molar de 6:1 a temperatura ambiente durante una noche. Los complejos proteína-engarce-anticuerpo se purificaron por SEC. La eficacia de la conjugación se confirmó mediante análisis LCMS.

Ejemplo 13 Ensayo de Producción de Proteínas

Todas las proteínas FGF21 se expresaron en *E. coli*. Las proteínas FGF21 expresadas en bacterias se encontraron en cuerpos de inclusión. Después de realizar la lisis de las células y de eliminar el sobrenadante, los sedimentos se disolvieron en urea 7 M, Bis-Tris propano 50 mM, pH 10,5 a 4 °C. Los cuerpos de inclusión solubilizados se disolvieron en Bis-Tris propano 50 mM, glutatión oxidado 10 mM, pH 9,0 y se agitó durante 2 horas, seguido de diálisis frente Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 a 4 °C durante una noche. Las fracciones solubles se purificaron por columna HiTrap Q. Las proteínas se caracterizaron

mediante análisis SDS-PAGE. Los niveles de expresión de los mutantes de lisina fueron 10-50 mg/l.

Ejemplo 14 Ensayo de Glut1 por Taqman

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

Ejemplo 15 Ensayo de Captación de Glucosa

Los adipocitos 3T3-L1 diferenciados se trataron con los compuestos en ausencia de suero durante 24 horas. Después las células se incubaron con ^{14}C -2-desoxiglucosa durante 1 hora y se cuantificó la captación de glucosa en las células en un instrumento Wallac 1450 MicroBeta (Trilux). La captación de glucosa se expresó en recuentos por minutos (RPM). En el ensayo, los valores de CE_{50} se obtuvieron como mediciones de la fuerza de los compuestos a partir de las curvas de respuesta a la dosis.

Ejemplo 16 Farmacocinética en Ratón

La PK de los conjugados del anticuerpo FGF21 se examinó en ratones después de administración IV o SC. Los conjugados del anticuerpo se

inyectaron en ratones macho adultos jóvenes Swiss-Webster (20-25 g) y se obtuvieron muestras de sangre a partir de los puntos de tiempo desde 5 minutos a 120 horas después de la dosificación. Las concentraciones de los conjugados de anticuerpo en suero se determinaron usando un ELISA que

5 captura la parte FGF21 de los conjugados de anticuerpo mediante un anticuerpo anti-hFGF21 monoclonal unido a una placa de 96 pocillos. Los conjugados de anticuerpo FGF21 unidos a la placa se detectaron mediante un anticuerpo anti-hFc monoclonal y las concentraciones se determinaron usando una curva convencional de la solución de dosificación de PK diluida en tampón

10 de ensayo que contenía suero. La biodisponibilidad SC se calculó como la proporción del área bajo la curva (ABC) del perfil de concentración de suero SC divide entre el ABC del perfil de concentración de suero IV.

Ejemplo 17 Eficacia en Ratón

La eficacia de los conjugados de los anticuerpos FGF21 se evaluó en

15 dos modelos murinos obesos de resistencia a insulina - ratones ob/ob y ratones obesos inducidos por una dieta rica en grasas. Para ambos modelos, se enjaularon 2-4 ratones macho (de 6-8 semanas de vida para ob/ob, de 12-14 semanas de vida para DIO con dieta rica en grasas iniciada a las 6 semanas de vida) y por inyección SC se les administró conjugados de anticuerpo FGF21. El

20 peso corporal se tomaba diariamente por las mañanas. Se evaluó la tolerancia a glucosa mediante ensayo de tolerancia a glucosa oral. Brevemente, la mañana del día del ensayo se dejó en ayunas a los ratones durante 4-5 horas. Se obtuvo una muestra de sangre basal y los niveles de glucosa en sangre se determinaron usando un glucómetro portátil. Después de la muestra basal, se

25 administró glucosa por sonda oral y después de esto se extrajeron muestras de

sangre a partir de 15 a 120 minutos. La tolerancia a glucosa se calculó como el ABC desde el punto de tiempo basal hasta los 120 minutos.

Ejemplo 18 actividad de K56 en Ab-L5-FGF21 Δ H-K56

Se generó FGF21 Δ H-K56-K59R-K69R-K122R (SEC ID N°: 18) y se purificó como se ha descrito anteriormente. Se observó que FGF21 Δ H-K56-K59R-K69R-K122R era fuerte en el ensayo de Glut1 por Taqman (CE_{50} =0,9 nM; n=2). Se demostró que la captación de glucosa fue de 5,5 nM. Con L5 se combinó FGF21 Δ H-K56-K59R-K69R-K122R a K56 y se conjugó con h38C2 como se ha descrito para formar Ab-L5-FGF21 Δ H-K56. Ab-L5-FGF21 Δ H-K56 conservó la fuerza en el ensayo de Glut1 por Taqman (CE_{50} =1,9 nM; n=1), y mostró una semivida después de administración IV de 17 horas y una semivida después de administración SC de 13 horas. La biodisponibilidad fue del 66%.

Ejemplo 19 actividad de K59 en Ab-L5-FGF21 Δ H-K59

Se generó FGF21 Δ H-K56R-K59-K69R-K122R (SEC ID N°: 19) y se purificó como se ha descrito. Se observó que FGF21 Δ H-K56R-K59-K69R-K122R era fuerte en el ensayo de Glut1 por Taqman (CE_{50} =0,6 nM; n=1). La captación de glucosa fue de 0,9 nM. Con L5 se combinó FGF21 Δ H-K56R-K59-K69R-K122R a K59 y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21 Δ H-K59. Ab-L5-FGF21 Δ H-K59 conservó la fuerza *in vitro* en el ensayo de Glut1 por Taqman (CE_{50} =6,5 nM; n=2) y mostró una semivida IV de 13 horas.

Ejemplo 20 actividad de K69 en Ab-L5-FGF21 Δ H-K69

Se generó FGF21 Δ H-K56R-K59R-K69-K122R (SEC ID N°: 20) y se purificó como se ha descrito. Se observó que FGF21 Δ H-K56R-K59R-K69-K122R era fuerte tanto en un ensayo de Glut 1 por Taqman (CE_{50} =1,3 nM; n=1) como en un ensayo de captación de glucosa (CE_{50} =5,2 nM). Con L5 se

combinó FGF21ΔH-K56R-K59R-K69-K122R a K69, y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-K69.

Ejemplo 21 K122 actividad Ab-L5-FGF21ΔH-K122

Se generó FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 (SEC ID N°: 21) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 era fuerte tanto en un ensayo de Glut 1 por Taqman ($CE_{50}=2,6$ nM; $n=2$) como en un ensayo de captación de glucosa ($CE_{50}=1,7$ nM). Con L5, FGF21ΔH-K56-K59R-K69R-K122 se combinó a K122 y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-K122. Ab-L5-FGF21ΔH-K122 conservó la fuerza *in vitro* ($CE_{50}=1,6$ nM en ensayo Glut1 Taqman; $n=2$) y mostró una semivida IV de 16 horas y una semivida SC de 14 horas. La biodisponibilidad fue del 40%.

Ejemplo 22 actividad de K-null-P2 en Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2

Se generó FGF21ΔH-Knull-P2 (SEC ID N°: 22) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-Knull-P2 era fuerte en un ensayo Glut 1 Taqman ($CE_{50}=1,2$ nM; $n=2$). Con L5, FGF21ΔH-Knull-P2 se combinó al extremo N' de P² y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-P2 presentó fuerza reducida *in vitro* ($CE_{50}=16.6$ nM en ensayo Glut1 Taqman; $n=1$) y una semivida IV de 17 horas.

Ejemplo 23 actividad de Knull-H1K en Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-H1K

Se generó FGF21ΔH-Knull-H1K (SEC ID N°: 23) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-Knull-H1K era fuerte en un ensayo Glut 1 Taqman ($CE_{50}=6,4$ nM; $n=2$). Con L5, FGF21ΔH-Knull-H1K se combinó a H1K y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔK-Knull-H1K. FGF21ΔH-Knull-H1K conservó la fuerza *in vitro* ($CE_{50}=4,3$ nM en ensayo Glut1 Taqman; $n=2$), y

mostró una semivida IV de 16 horas, una semivida SC de 11 horas y una biodisponibilidad SC del 51%.

Ejemplo 24 actividad de K-null-S181K en Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K

Se generó FGF21ΔH-Knull-S181K (SEC ID N°: 24) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-Knull-S181K era fuerte en un ensayo Glut 1 Taqman (CE₅₀=7,5 nM; n=2). Con L5, FGF21ΔH-Knull-S181K se combinó a S181K y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K. Ab-L5-FGF21ΔH-Knull-S181K mostró una pérdida de fuerza *in vitro* (CE₅₀=>500 nM en ensayo Glut1 Taqman; n=2).

10 Ejemplo 25 Sumario de resultados de actividad de los mutantes de lisina

Todas las proteínas mutantes de lisina eran activas en el ensayo Glut1 por Taqman. Cuando se conjugaron, la mayoría de los conjugados (K56, K59, K122, Knull-H1K) conservaron actividad en ensayo Taqman, con valores CE₅₀ similares a los de la proteína FGF21 nativa. El conjugado Knull-P2 mostró alguna reducción en cuanto a la fuerza inicial y el conjugado Knull-S181K mostró pérdida de actividad en el ensayo Taqman.

Ejemplo 26 Identificación de sitios de contacto óptimos en FGF21 usando conjugación cisteína-maleimida

Cuando se introduce una mutación por sustitución de cisteína como un resto de unión, uno de los desafíos es que el resto de cisteína puede encontrarse en contacto con otros restos, y/o formar un puente salino o un enlace de hidrógeno. Aunque puede ser difícil predecir las distancias a nivel de átomo usando estructuras modeladas, se seleccionaron diversos restos en base a la posibilidad de estar localizados distalmente de los sitios de unión a FGFR1c y βKlotho: His1, Thr40, Asp79, Leu86, His125 y Ala129.

Los seis restos son distintos entre sí en términos de elementos estructurales (giro y bucle), área de superficie accesible (ASA) y configuración en el medio (convexa y cóncava) y todos se modelaron en el lado opuesto de la proteína para las interacciones con FGFR1c (Tabla 2). En particular, His1, Asp79, Leu86 e His125 se identificaron como sitios de conjugación potencialmente activos debido a altos valores ASA asociados con estos sitios.

Restos	Estructura	Configuración	% ASA	ASA	Sitio β Klotho
His1	Desordenada	No disponible	No disponible		
Thr40	Cadena β	cóncava	34	49,8	poco alejado
Asp79	Giro β	convexa	71	109,8	alejado
Leu86	Cadena β	convexa	60	119,4	poco alejado
His125	desordenada	convexa	85	169,4	alejado
Ala129	desordenada	cóncava	68	78,8	alejado

Tabla 2 Comparación de restos candidatos para sustitución por cisteína

Ejemplo 27 H1C FGF21 Δ H-H1C

Se generó FGF21 Δ H-H1C (SEC ID N°: 16) y se expresó. Sin embargo, los mutantes FGF21 Δ H-H1C, carecían del grupo N' cisteína y por lo tanto la investigación de este mutante se suspendió.

Ejemplo 28 T40C FGF21 Δ H-T40C

La generación de FGF21 Δ H-T40C (SEC ID N°: 15) presentó desafíos significativos. La mutación de treonina por cisteína en la posición 40 produjo especies múltiples de FGF21 Δ H-T40C en RP-HPLC después del

replegamiento. Se realizaron intentos adicionales para mejorar el proceso de replegamiento cambiando la concentración de la proteína y el pH, con y sin adición de glutatión. El proceso de replegamiento se controló mediante RP-HPLC. La adición de glutatión dio como resultado un replegamiento eficaz de

5 T40C; sin embargo, se encontró que el glutatión se unió a FGF21, más probablemente mediante la cisteína introducida en la posición 40. El aducto de glutatión mostró la misma actividad biológica que la del tipo silvestre FGF21ΔH, indicando que la posición 40 no está implicada en la activación del receptor por FGF21.

10 **Ejemplo 29 actividad de D79C en Ab-L1-FGF21ΔH-D79C**

Se generó FGF21ΔH-D79C (SEC ID N°: 12) y se purificó como se ha descrito. FGF21ΔH-D79C era fuerte en ensayo Glut 1 Taqman (CE₅₀=2,1 nM; n=4). Con L1, FGF21ΔH-D79C se combinó a D79C y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L1-FGF21ΔH-D79C. Ab-L1-FGF21ΔH-D79C conservó la fuerza

15 *in vitro* (CE₅₀=3,7 nM en ensayo Glut1 Taqman; n=3) y mostró una semivida IV de 17 y 19 horas (n=2), una semivida SC de 20 y 20 horas (n=2) y una biodisponibilidad SC del 55% y 70 (n=2).

Ejemplo 30 Ensayo de estabilidad de FGF21ΔH-D79C

Se produjo la proteína mutante FGF21ΔH-D79C en *E. coli* y se purificó

20 como se ha descrito anteriormente. FGF21ΔH-D79C se expresó a partir de 1 l de cultivo. Se obtuvo un cuerpo de inclusión de 150 mg y se obtuvo una proteína purificada de 85 mg que representaba una producción al 60%. Para ensayar la estabilidad de FGF21ΔH-D79C así como de FGF21ΔH (SEC ID N°: 2), se conservaron a 4 °C muestras recién descongeladas durante siete días y

25 se examinaron para determinar su integridad por RP-HPLC, SEC_HPLC,

ensayo Ellman y SDS-PAGE los días 0, 3 y 7. Se observó que FGF21 Δ H-D79C era estable a pH neutro 7,4: únicamente ligeras cantidades de FGF21 Δ H-D79C parecieron oxidarse y dimerizarse incluso después de incubación de siete días a 4 °C, mientras que más de la mitad de FGF21 Δ H-D79C se oxidó a un pH inferior a 6,0 después de tres días de incubación a 4 °C. El PBS (pH 7,4) y Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM (pH 7,5) no presentaron diferencias significativas de estabilidad de FGF21 Δ H-D79C.

El motivo por el cual la cisteína libre de FGF21 Δ H-D79C era más estable a pH 7,4 que a pH 6,0 no está claro. El punto isoeléctrico (pI) calculado de WT FGF21 era 5,43 (es decir, FGF21-H1-P146); el pI de FGF21 Δ H era 5,27; y el pI de FGF21 Δ H-D79C de 5,47. Es posible que la solubilidad de FGF21 Δ H-D79C pudiera reducirse a pH 6,0. La estabilidad de FGF21 Δ H-D79C se examinó después de ciclos múltiples de congelación/descongelación. Las proteínas se repitieron para congelar (-80 °C) y descongelar (4 °C) 9 veces. Ninguna muestra mostró diferencia alguna entre el ciclo 1 y los 9 ciclos en ensayos RP-HPLC, SEC y Ellman. Como conclusión, FGF21 Δ H-D79C pareció ser significativamente menos estable a 4 °C que a - 80 °C.

Ejemplo 31 L86C FGF21 Δ H-L86C

Se generó FGF21 Δ H-L86C (SEC ID N°: 14) y se purificó como se ha descrito. Aunque la mayoría de los restos hidrófobos estaban ocultos en los núcleos de las proteínas, algunos restos estaban expuestos al disolvente lo que podría ocasionar la no solubilidad de la proteína. Leu86 es un resto hidrófobo y aparecía expuesto al disolvente en la estructura modelada de FGF21. Se supuso que la mutación L86C podía proporcionar beneficios en cuanto a solubilidad.

La mutación L86C dio como resultado un replegamiento ineficaz y un bajo rendimiento de proteína. La adición de glutatión dio como resultado un replegamiento eficaz de L86C; sin embargo, se observó que más de un glutatión se unió a una molécula de FGF21, más probablemente a través del C86 introducido así como restos de cisteína nativos. El aducto de glutatión mostró una reducción de aproximadamente 10 veces de la actividad biológica y por lo tanto la investigación de FGF21 Δ H-L86C se suspendió.

Ejemplo 32 actividad de H125C en Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C

Se generó FGF21 Δ H-H125C (SEC ID N°: 7) y se purificó como se ha descrito. FGF21 Δ H-H125C era fuerte en ensayo Glut 1 Taqman (CE_{50} =1,2 nM; n=3). FGF21 Δ H-H125C se combinó con L1 y con h38C2 se conjugó a H125C para formar Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C. Cuando estuvo conjugado, Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C conservó la fuerza *in vitro* (CE_{50} =3,2nM en ensayo Glut1 Taqman; n=4), y mostró una semivida IV de 37 horas, una semivida SC de 32 horas y una biodisponibilidad SC del 67%.

Ejemplo 33 actividad de A129C en Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Se generó FGF21 Δ H-A129C (SEC ID N°: 10) y se purificó como se ha descrito. FGF21 Δ H-A129C era fuerte en ensayo Glut 1 Taqman (CE_{50} =1,4 nM; n=6). FGF21 Δ H-A129C se combinó con L1 a A129C y se conjugó con h38C2 para formar Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C conservó su fuerza *in vitro* (CE_{50} =2,7 nM en ensayo Glut1 Taqman; n=7) y mostró una semivida IV de 33 horas, una semivida SC de 37 horas y una biodisponibilidad del 69% (en ratones). En la rata, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C mostró una semivida IV de 60 horas, una semivida SC de 39 horas, y una biodisponibilidad SC del

52%. En monos, la semivida IV fue de 65 horas, la semivida SC fue de 48 horas y la biodisponibilidad SC fue del 68%.

Ejemplo 34 Mejora de Pureza de Endotoxina

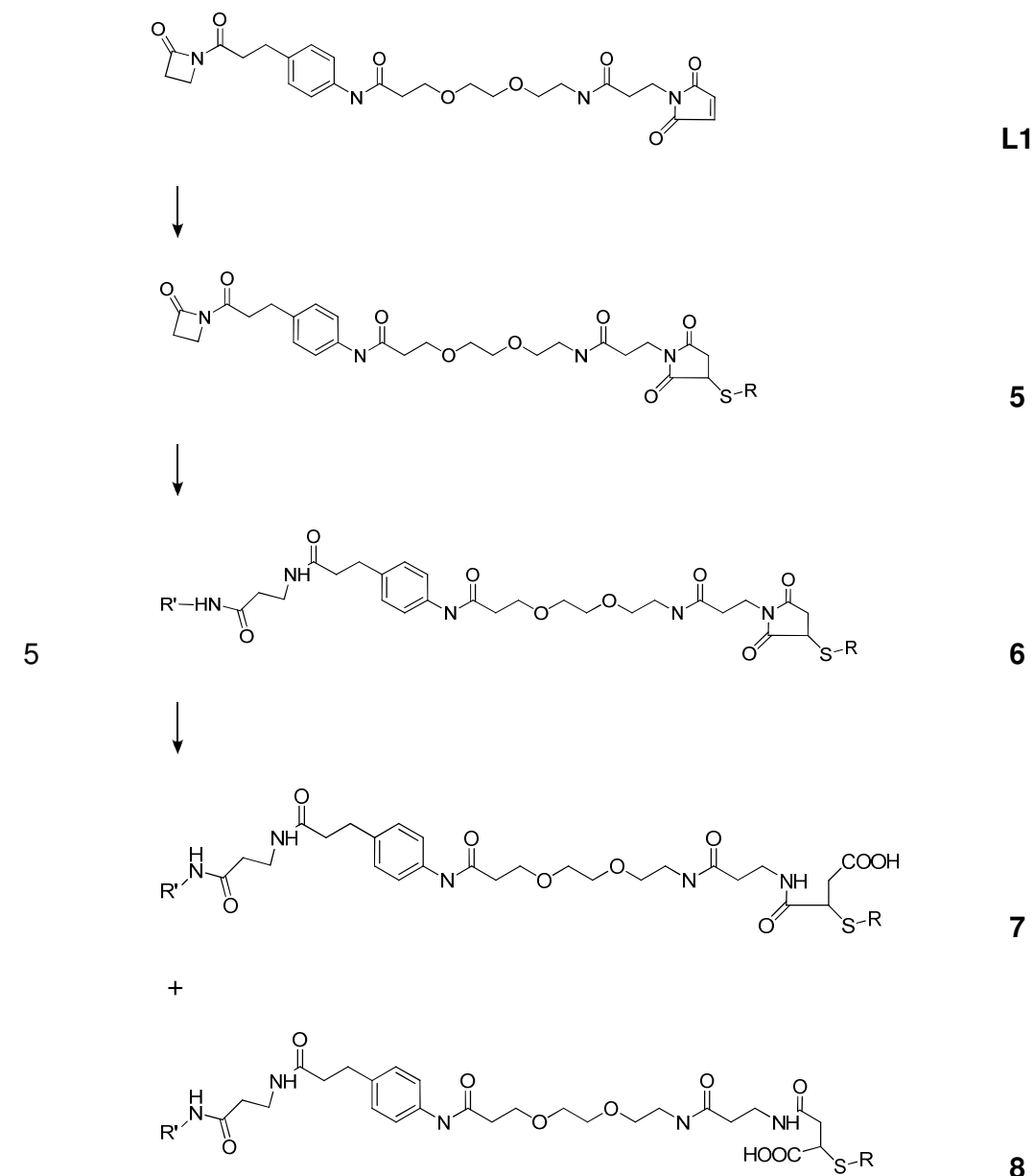
Se produjeron las proteínas FGF21 Δ H-H125C y FGF21 Δ H-A129C por cultivo de fermentación de *E. coli*. Para reducir niveles de endotoxina, después de la primera Q, se utilizó una etapa Q adicional, que redujo los niveles de toxina de 10 EU/ml $\rightarrow$ 0,1 EU/ml. El protocolo de purificación se modificó de la siguiente manera. Aproximadamente se obtuvieron 10 g de IB a partir del medio de cultivo de 1 l y se disolvieron con 40 ml de Urea 7 M, DTT 5 mM, BTP (Bis-tris Propano) 50 mM, pH 10,5 (1 ~ 2 horas). La reducción de la proteína FGF21 se controló por RP-HPLC. La proteína solubilizada se replegó por dilución en 400 ml de BTP 50 mM, pH 8,0 (24 ~ 36 horas). La oxidación de enlace disulfuro nativo de FGF21 se controló por RP-HPLC. Una vez casi completado el replegamiento, la solución se dializó dos veces frente a 4 l de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Las proteínas no solubilizadas se precipitaron por centrifugación a 20.000 X g durante 60 min, 4 °C. El sobrenadante se cargó sobre una Hitrap Q FF y la proteína FGF21 se eluyó con gradiente NaCl 0 ~ 200 mM (20 CV, Tris-HCl 20 mM, TCEP 0,01 mM, pH 7,5). Las fracciones recogidas se cargaron sobre una Hitrap Ni-NTA FF con gradiente de imidazol 0 ~ 100 mM (10 CV, TCEP 0,01 mM, PBS, pH 7,4) para eliminar eficazmente el ADN residual. Las fracciones deseadas se dializaron dos veces frente a 4 l de Tris-HCl 20 mM, TCEP 0,01 mM, pH 7,5 y se cargaron sobre una columna Hitrap Q HP con un gradiente de NaCl 0 ~ 100 mM (20 CV, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) para elución. Las fracciones de la proteína purificada se recogieron, se esterilizaron con un filtro de 0,22 mm y se conservaron a -80 °C.

La producción típica a partir del medio de cultivo de 1 l fue de aproximadamente 350 a aproximadamente 400 mg. La producción típica de proteína purificada fue de aproximadamente 220 a aproximadamente 280 mg. Esta técnica de purificación produjo proteína con una pureza de > 95% y un
5 nivel de endotoxina típico de aproximadamente 1 EU/mg. Usando un fermentador en lugar de matraces de agitación la producción mejora aproximadamente de 4 a aproximadamente 5 veces.

Ejemplo 35 Selección del engarce

Se sabe que, con el transcurso del tiempo, el anillo de maleimida de L1,
10 mencionado más adelante, puede ser susceptible a la apertura y posterior degradación del producto (Woodnutt, G; IBC Conference “Beyond Antibodies/Protein Engineering Design”, San Diego, 21-23rd septiembre 2009).

El engarce de maleimida tal como L1 puede reaccionar con tiol para formar un aducto de tiol con parte de maleimida como se muestra en el
15 Esquema 1. Esta reacción de adición de tiol a maleimida se denomina reacción de Michael. Posteriormente, un grupo que contiene amina (tal como anticuerpo h38C2) puede reaccionar con AZD (β -lactama) como se muestra en el Esquema 1 para producir **6**. El aducto tiol-succinimida resultante es estable. Sin embargo, el anillo de succinimida puede someterse a una lenta escisión
20 hidrolítica con el tiempo dando como resultado **7** y/u **8**. Por lo tanto es deseable tener un anillo de maleimida con estabilidad mejorada hacia escisión hidrolítica, que al mismo tiempo conserve su estabilidad para someterse a reacción Michael.

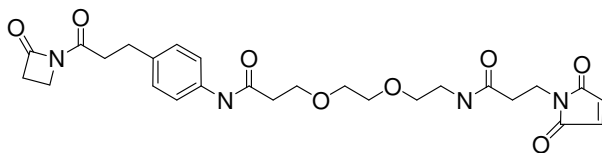


10 Esquema 1

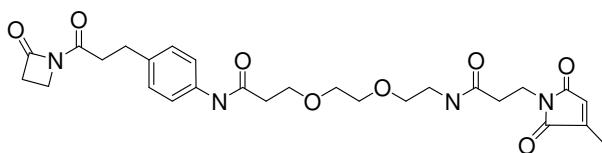
Ejemplo36 Modificación con Maleimida

Por consiguiente, se examinó la estabilidad del anillo de maleimida en **L1**, con la esperanza de que pudieran generarse más engarces estables modificando el anillo de maleimida. Para retrasar la posible escisión hidrolítica

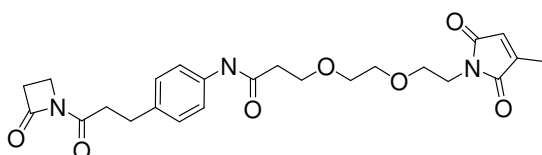
del anillo de maleimida por agua, se adoptaron tres estrategias diferentes (**L2-L4**) para modificar el anillo y mejorar la estabilidad.



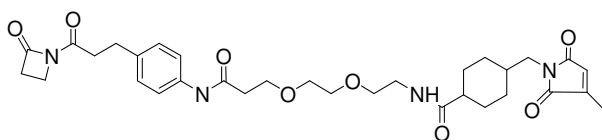
L1



L2



L3



L4

5

En primer lugar, se contempló que un pequeño grupo alquilo unido al anillo podría retrasar la escisión hidrolítica del anillo de succinimida. Se preparó el engarce **2**, que tiene un grupo metilo en el anillo de succinimida. Para someter al anillo a escisión hidrolítica, se añadió una molécula de agua al grupo carbonilo y se formó un intermedio tetraédrico como estado de transición. La presencia del grupo metilo limitaría estérica y electrónicamente la formación del intermedio tetraédrico y retrasaría la velocidad de hidrólisis considerablemente.

15

La segunda modificación se centró sobre el grupo carbonil propionamida muy próximo al grupo carbonilo del anillo de maleimida. En general los grupos carbonilo atraen agua. El tener un grupo carbonilo muy próximo al anillo de maleimida ayuda a atraer agua y facilita el ataque sobre el grupo carbonilo del

anillo de maleimida. Eliminando el grupo carbonil propionamida, la reacción hidrolítica de apertura del anillo se retrasa. Esta modificación se observó en **L3**.

La tercera modificación fue la introducción de un grupo ciclohexilmetileno en el lugar del grupo propionamida como se observa en **L4**.

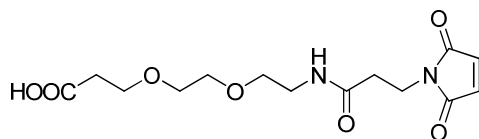
- 5 La naturaleza hidrófoba voluminosa del anillo ciclohexilo interferiría tanto electrónica como estéricamente hacia la formación de un intermedio tetraédrico por la adición de agua al grupo carbonilo del anillo que se requiere para la escisión hidrolítica de apertura de anillo. Se prevé que esto retrasaría la escisión hidrolítica.

10 Estudios de Estabilidad

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

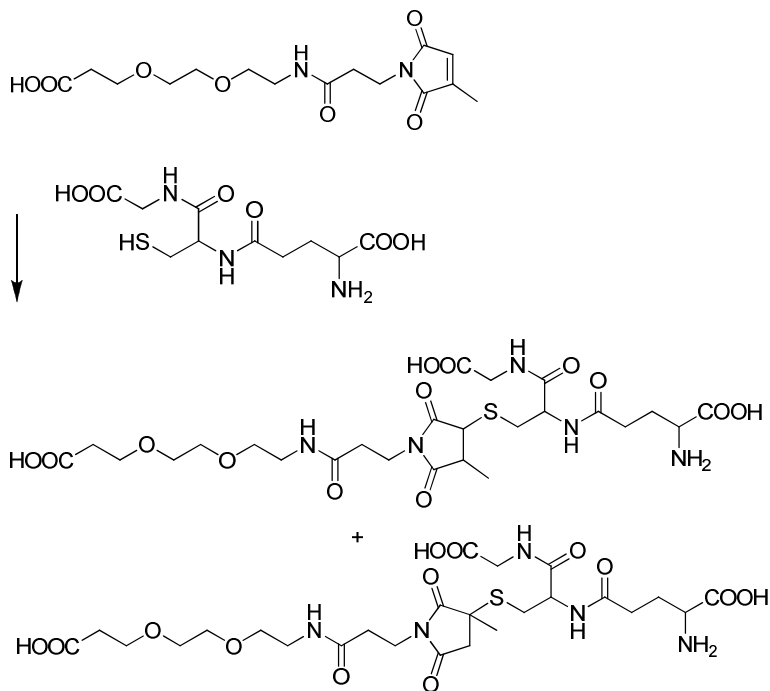
15 Ejemplo 37 Síntesis del compuesto 30

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



Ejemplo 38 Síntesis del compuesto 31

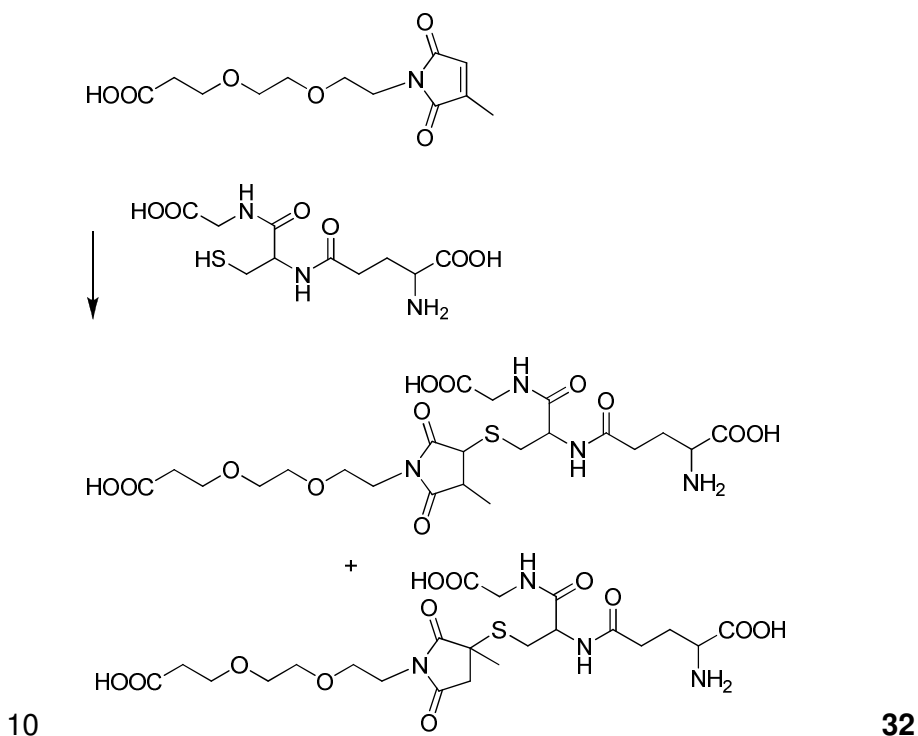
10



31

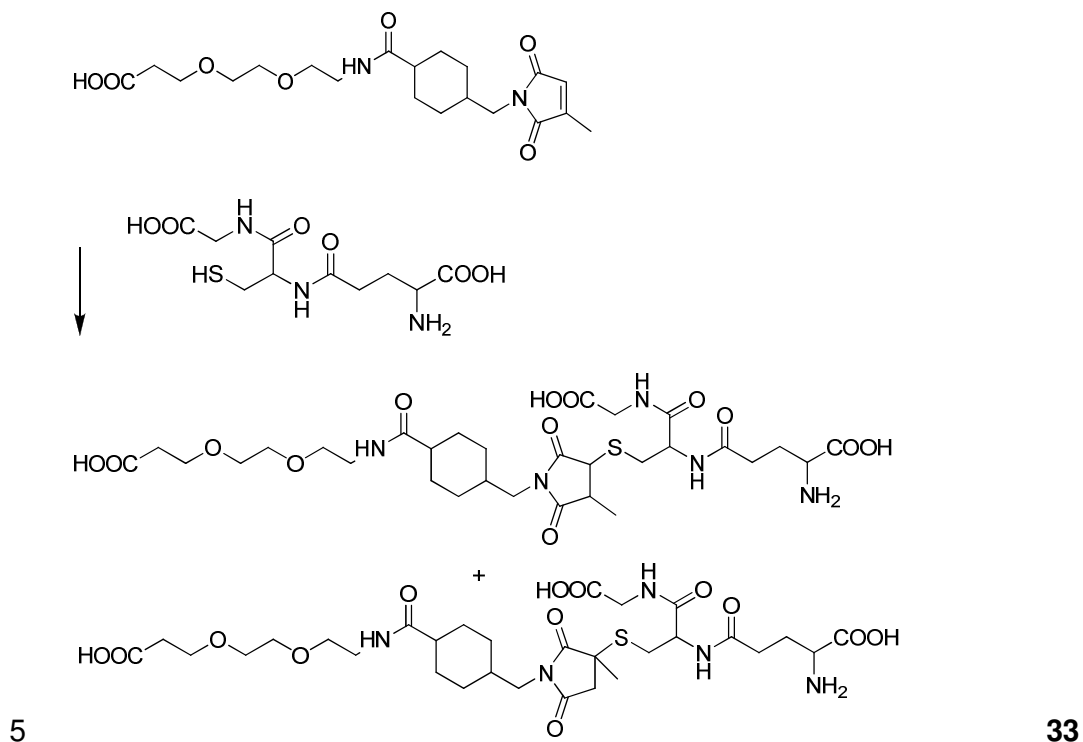
Ejemplo 39 Síntesis del compuesto 32

Se agitó una solución de ácido 3-(2-(2-(3-(3-metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etoxi)etoxi)propanoico (50 mg, 0,2 mmol) y glutatión reducido (61 mg, 0,2 mmol) en dimetilsulfóxido (2 ml) a temperatura ambiente durante 25 horas. A la mezcla de reacción se añadió acetato de etilo al 65% en éter (30 ml) y el sólido se filtró. El sólido se lavó con 25 ml más de acetato de etilo, se secó para dar 92 mg del compuesto **32**.

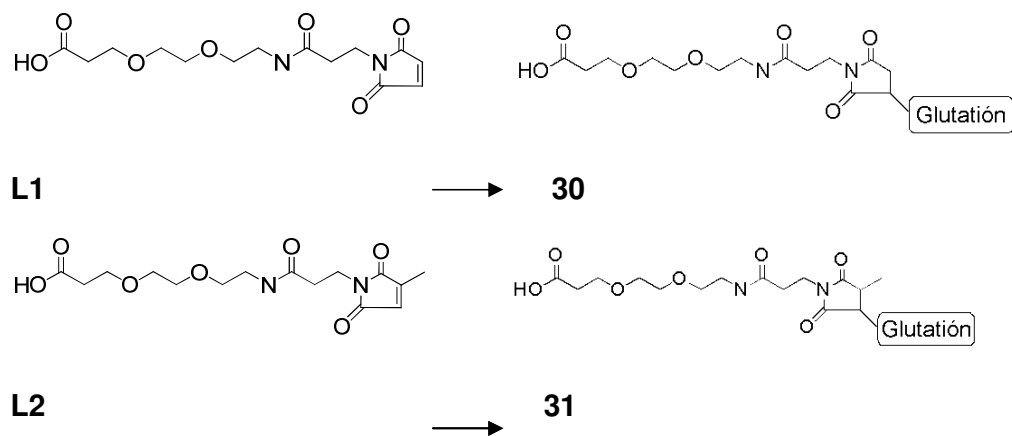
**Ejemplo 40 Síntesis del compuesto 33**

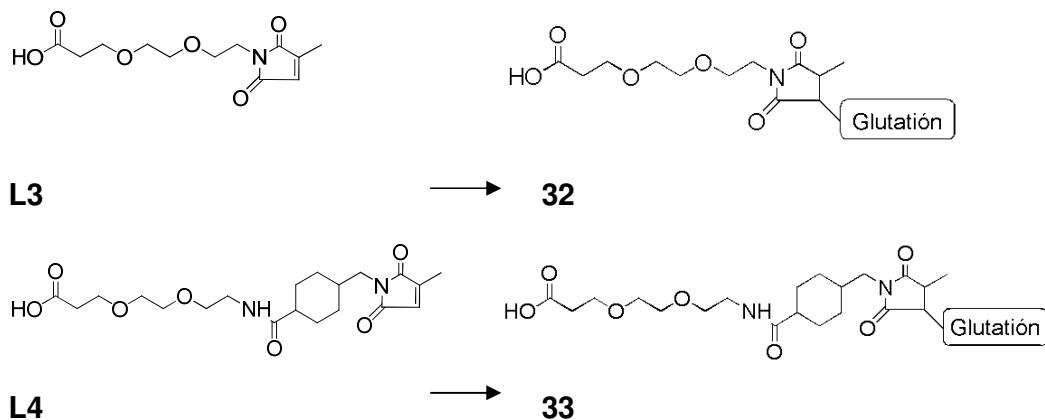
Se agitó una solución de ácido 3-(2-(2-(3-(3-metil-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etoxi)etoxi)propanoico (50 mg, 0,12 mmol) y glutatión reducido (37 mg, 0,12 mmol) en dimetilsulfóxido (1,2 ml) a temperatura ambiente durante 22 horas. A la mezcla de reacción se añadió

acetato de etilo al 50% en éter (10 ml) y el sólido se filtró. El sólido se lavó con 25 ml más de acetato de etilo, se secó para dar 75 mg del compuesto **33**.



Ejemplo 41 Estudio de estabilidad de los compuestos 30-33





Los compuestos **30**, **31**, **32**, y **33** se controlaron sobre LC-MS para la formación de los productos con anillo abierto así como escisión de glutatión. Estos nuevos análogos se examinaron para determinar su estabilidad a un tampón de pH = 6,5 a 40 °C, a un tampón de pH=7,5 a 40 °C, y a un tampón de pH=7,5 a 4 °C, todos durante un periodo de dos semanas (Tablas 3A-C).

Los compuestos **30**, **31**, **32**, y **33** se disolvieron en un tampón a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron a 40 °C y la solución tampón se analizó a los intervalos establecidos. A intervalos definidos, 10 µl de la solución tampón se inyectó en cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent y espectrómetro de masas para análisis. Los eluyentes de la columna se controlaron usando espectrometría UV a 210 y 254 nM y también usando espectrómetro de masas. Los productos derivados de la hidrólisis se controlaron usando espectrómetro de masas y se calculó el porcentaje de hidrólisis en base a la corriente iónica total de una masa particular.

A partir de los datos LC-MS, que muestran un % de hidrólisis en las Tablas 3A-3C, era obvio que los anillos de maleimida modificados de L2, L3 y L4 (31-33) eran 5-10 veces más estables a pH = 6,5 a 40 °C en comparación

con el anillo de maleimida en L1 (30), 4-15 veces más estable a tampón de pH=7,5 a 40 °C y hasta 20 veces más estable a tampón de pH=7,5 a 40 °C.

Los resultados de las conjugaciones con glutatión (incluyendo los datos mostrados en las Tablas 3A, 3B y 3C) se analizaron en la Conferencia IBC

5 “Beyond Antibodies/Protein Engineering Design”, San Diego, 21-23rd septiembre de 2009.

	Compuesto Nº	0 horas %	1 horas %	5 horas %	24 horas %	48 horas %	72 horas %	96 horas %	120 horas %	168 horas %	192 horas %
L1	30	0,0	0,4	0,6	4,9	11,6	14,8	18,3	17,0	25,0	25,9
L2	31	0,1	0,1	0,3	0,8	1,8	2,6	3,0	3,1	5,0	5,1
L3	32	0,0	0,1	0,3	0,9	1,7	2,4	2,8	4,2	4,6	4,9
L4	33	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6	0,6	0,3	1,1	1,1

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

	Compuesto Nº	0 horas %	1 horas %	5 horas %	24 horas %	48 horas %	72 horas %	96 horas %	120 horas %	144 horas %	168 horas %	264 horas %	336 horas %
L1	30	0,1	0,3	2,0	10,0	15,0	29,0						
L2	31	0,1	0,2	0,6	3,2	4,6	7,1	8,2	9,4	12,6	12,2	13,1	15,0
L3	32	0,1	0,1	0,1	1,0	1,1	2,2	2,8	3,3	3,3	3,9	4,4	5,0
L4	33	0,1	0,2	0,3	0,6	1,8	2,8	3,0	4,3	4,1	4,7	6,5	8,8

Tabla 3B Estudios de Estabilidad a 40 °C, pH = 7,5 (His 100 mM, Gly 200 mM,

10 tampón Suc 200 mM).

	Compuesto Nº	0 horas %	1 horas %	5 horas %	24 horas %	48 horas %	72 horas %	96 horas %	120 horas %	144 horas %	168 horas %	264 horas %	336 horas %
L1	30	0,1	0,1	0,1	0,7	2,0	2,2	4,4	5,5	6,9	7,5	8,7	12,2
L2	31	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,3	0,6	0,7

L3	32	0,1	0,1	0,0	0,2	0,3	0,3	0,4	0,6	0,6	0,7	1,1	1,3
L4	33	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,5	0,6

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

Ejemplo 42 Estabilidad de los Engarces L1-L4 conjugados con FGF21

- El siguiente experimento se realizó para investigar la estabilidad química superior a 2 semanas de los cuatro engarces después de la conjugación con FGF21: cada engarce se conjugó con FGF21, se puso en condiciones de almacenamiento de +4 °C, se extrajeron alícuotas y se inactivaron por congelación en puntos de tiempo específicos, la estabilidad del engarce se controló por análisis LCMS.
- Los cuatro engarces se disolvieron en DMSO de material de reserva liofilizado. La proteína FGF21 Δ H-A129C se redujo parcialmente con TCEP 0,1 mM durante 30 minutos antes de la adición de la reserva de engarce a una proporción 1:1 de engarce: proteína; la concentración de la proteína FGF21 Δ H-A129C en la reacción de conjugación fue de 5 mg/ml. L1 reaccionó con la proteína durante 30 minutos; L2, L3 y L4 reaccionaron durante 2 horas. La reacción de conjugación se inactivó por extracción de engarces sobrantes mediante resina de exclusión de tamaño. La proteína FGF21 Δ H-A129C conjugada se puso a +4 °C para determinar la estabilidad durante el almacenamiento. Se extrajeron alícuotas a t=0 (antes de estabilidad durante el almacenamiento) y a t=1, 3, 8 y 14 días. El análisis de estabilidad del engarce se realizó por análisis LC-MS para determinar la cantidad relativa de proteína no conjugada, conjugación proteína + engarce y acontecimientos de hidrólisis sencilla y doble del conjugado proteína + engarce.

La hidrólisis del engarce es la variable analítica crítica en este experimento. La hidrólisis se controló observando la adición posterior de H₂O al complejo FGF21-engarce. Una sola adición de H₂O, +(1) H₂O, probablemente indica la hidrólisis del grupo AZD activo que está presente en los 4 engarces.

- 5 La adición de una segunda molécula de H₂O, +(2) H₂O, es un fuerte indicador de hidrólisis (por ejemplo inestabilidad química) en el engarce. L1 es particularmente susceptible debido a la presencia de un grupo maleimida funcional.

Los resultados experimentales en la siguiente Tabla 4 demuestran que

- 10 L1 experimenta el mayor aumento en +(2) H₂O. A t=0, cada uno de L1-L4 tuvo un valor medido de +(2) H₂O entre 6-8% de la proteína total medida. Durante las 2 semanas estas muestras se controlaron, la +(2) H₂O observada en L1 tuvo un aumento al 18% mientras que el valor para cada uno de los restantes engarces L2-L4 fue constante a 6-8%. Estos datos sugieren que L1 es
- 15 relativamente inestable en comparación con L2-L4.

Engarce	Tiempo (horas)	Engarce 0	Engarce 1	+(1) H ₂ O	+ (2) H ₂ O
L1	0	13	49	30	8
L1	24	14	41	34	11
L1	72	14	40	35	11
L1	168	10	33	40	18
L1	336	12	28	41	18
L2	0	22	45	27	6
L2	24	23	43	26	8
L2	72	24	37	32	8

Engarce	Tiempo (horas)	Engarce 0	Engarce 1	+(1) H ₂ O	+ (2) H ₂ O
L2	168	24	40	29	7
L2	336	26	38	28	8
L3	0	19	45	30	6
L3	24	18	47	27	8
L3	72	19	43	30	8
L3	168	19	43	29	8
L3	336	20	43	29	8
L4	0	20	46	28	6
L4	24	20	46	27	7
L4	72	21	42	30	7
L4	168	21	41	32	6
L4	336	22	41	31	6

Tabla 4 Análisis de hidrólisis de L1-L4 conjugados con FGF21

Ejemplo 43 Ab-FGF21 Δ H-A129C conjugado con L1-L4

Anteriormente se demostró que L2-L4 eran más estables que L1 conjugaciones de glutatión en diversas condiciones (véanse las Tablas 3A-C) y FGF21 (Tabla 4). Los engarces L2-L4 modificados con maleimida se fusionaron con FGF21 Δ H-A129C (eficacias de conjugación mostradas en la Tabla 5) y mostraron actividad en el ensayo Glut1 de Taqman (Tabla 5): los valores CE₅₀ se normalizaron frente al valor relativo para FGF21 Δ H).

Engarce	[Compuesto]	Conjugación FGF21- Engarce	Conjugación FGF21- Engarce-Ab	CE ₅₀ (nM) Actividad Glut1 Taqman con respecto a FGF21 Δ H

L1	30	95%	95%	1,68
L2	31	67%	95%	1,00
L3	32	87%	89%	0,35
L4	33	90%	94%	2,71

Tabla 5 Eficacias de conjugación de L1-L4

Sin embargo, a pesar de lo anterior, cada uno de Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C, Ab-L3-FGF21 Δ H-A129C, Ab-L4-FGF21 Δ H-A129C era menos estable *in vivo* que Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Esto fue evidente en niveles prolongados más bajos en la circulación después de dosificación IV y en niveles máximos y prolongados más bajos en la circulación después de dosificación SC (Figuras 2A-C, Tabla 6). Sorprendentemente, estos resultados van en contra de los resultados de los estudios de estabilidad realizados con los engarces fusionados a un péptido pequeño en sistemas tamponantes.

Compuesto	T1/2 (h)		ABC (h*ug/ml)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	
Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C	33	33	491	511	~100
Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C	37	23	314	165	53
Ab-L3-FGF21 Δ H-A129C	32	13	254	129	51
Ab-L4-FGF21 Δ H-A129C	22	14	219	106	48

Tabla 6 Parámetros PK en ratón de conjugados de FGF21 con L1, L2, L3 y L4 después de administración IV y SC a 3 mg/kg

Estos resultados se confirmaron en un estudio adicional en suero de ratón. FGF21 Δ H-A129C se conjugó con h38C2 usando cada uno de L1, L2, L3 y L4. Cada muestra se diluyó en suero de ratón a 0,3 mg/ml y se incubó a 37 °C antes de congelar, seguido por análisis posterior por 2DLC/MS. En comparación contra un patrón de referencia, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C se

detectó al 149% después de 5 minutos, al 66% después de 34 horas, al 81% después de 72 horas y no fue detectable a las 120 horas. Por otro lado, Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C, Ab-L3-FGF21 Δ H-A129C, Ab-L4-FGF21 Δ H-A129C no se detectaron en ninguna de las muestras.

5 **Ejemplo 44 Estudio en la rata de Ab-FGF21 Δ H-A129C conjugado con L1 y L2**

Se determinó la farmacocinética (PK) de dosis sencilla de dos versiones de Ab-FGF21 Δ H-A129C diferentes por el engarce usado para conjugar la proteína FGF21 con el armazón del anticuerpo en ratas macho Sprague

10 Dawley. Las ratas recibieron administración IV o SC (3 mg/kg) con Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (engarce de maleimida) o Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C (engarce de metil maleimida) y se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 5 minutos a 14 días después de la dosis. Los niveles de Ab-FGF21 Δ H-A129C en

15 suero se determinaron mediante ELISA, en los que el conjugado FGF21 se capturó mediante un anticuerpo monoclonal específico para FGF21 y se detectó mediante anti-Fc humano. Los datos PK resultantes demostraron que el conjugado Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C tenía mejores características PK ($T_{1/2}$: IV = 60 horas, SC = 38 horas; biodisponibilidad SC = 52%) en comparación con el conjugado Ab-L2-FGF21 Δ H-A129C ($T_{1/2}$: IV = 52 horas, SC = 33 horas;

20 biodisponibilidad SC = 36%), (Figura 3A y Tabla 7). Estos resultados no estaban previstos dados los resultados de los estudios de estabilidad realizados en sistemas tamponantes con estos engarces fusionados a un pequeño péptido.

Compuesto	T _{1/2} (h)		ABC (h*ug/ml)		Biodisponibilidad SC (%)
	IV	SC	IV	SC	

Compuesto	T1/2 (h)		ABC (h*ug/ml)		Biodisponibilidad SC
Ab-L1-FGF21ΔH-A129C	60	38	1382	717	52
Ab-L2-FGF21ΔH-A129C	52	33	419	152	36

Tabla 7 Parámetros PK en rata de conjugados FGF21 con L1 y L2 después de administración IV y SC a 3 mg/kg (para la Figura 3A)

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

- 5 El día 8, se sembraron adipocitos 3T3-L1 8 en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Falcon®, Catálogo N° 353047) y se incubaron en medio completo DMEM (FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, 1 P/S %) a 37 °C, CO₂ al 5%. Las células se privaron (día 12) con medio DMEM asérico con BSA al 0,2% durante una noche y se trataron con Ab-L1-FGF21ΔH-A129C y Ab-L2-FGF21ΔH-A129C en DMEM asérico que contenía BSA 0,2% a 37 °C durante 6 horas. El medio se aspiró y después se extrajo el ARN de las células usando el kit RNeasy mini de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se midió a A260 nm usando el espectrofotómetro Spectramax® Plus.

Compuesto	Expresión de ARN Glut1 CE50 (nM)
FGF21ΔH	3,39
FGF21ΔH-A129C	16,03
Ab-L1-FGF21ΔH-A129C	1,72
Ab-L2-FGF21ΔH-A129C	9,33

Tabla 8 PCR Taqman cuantitativa en tiempo real

- 15 La estimulación de los adipocitos 3T3-L1 por FGF21ΔH, FGF21ΔH-A129C, Ab-L1-FGF21ΔH-A129C y Ab-L2-FGF21ΔH-A129C dio como resultado la inducción de *Glut1* dependiente de la dosis. Ab-L1-FGF21ΔH-A129C pareció ser más fuerte que Ab-L2-FGF21ΔH-A129C (Tabla 8).

Ejemplo 46 Estudio de longitud del engarce

Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C, Ab-L7-FGF21 Δ H-D79C y Ab-L8-FGF21 Δ H-D79C se ensayaron entre sí para evaluar la tolerancia de la longitud del engarce. Todas mostraron PK similar (Figura 3B y Tabla 9) y fuerza comparable (datos no mostrados) en ensayos basados en células.

Compuesto	T1/2 IV (h)	ABC IV (hr*ug/ml)
Ab-L1-FGF21 Δ H-D79C	19	176
Ab-L7-FGF21 Δ H-D79C	27	183
Ab-L8-FGF21 Δ H-D79C	15	248

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

Ejemplo 47 Sumario de posiciones de restos y selección de engarce

Usando una estrategia de conjugación tiol-maleimida, se ensayaron

10 H1C, T40C, D79C, L86C, H125C y A129C como posibles sitios de conjugación. De estos, H1C, T40C y L86C mostraron problemas con expresión y replegamiento. D79C, H125C y A129C se exploraron adicionalmente ya que todos mostraron niveles aceptables de producción de proteína y demostraron que la proteína mutante no conjugada permanecía fuerte. Ab-FGF21 Δ H-D79C,

15 Ab-FGF21 Δ H-H125C y Ab-FGF21 Δ H-A129C mostraron bioactividad similar a la de FGF21 Δ H, lo que sugería que la conjugación del anticuerpo en estas localizaciones no interfiere con la unión al receptor. D79C, H125C y A129C tenían estabilidad y bioactividad similar a la de FGF21 Δ H.

Todos los conjugados de anticuerpo mutante de lisina ensayados

20 mostraron PK inferior en ratón con respecto a los conjugados de anticuerpos H125C y A129C con semividas IV de 13-17 horas (Tabla 10).

	Producción de proteína de fermentación (mg/l)	Captación de glucosa CE ₅₀ (nM)	Proteína no conjugada Glut1 Taqman CE ₅₀ (nM)	Conjugado Glut1 Taqman CE ₅₀ (nM)	T _{1/2} IV (hora)	T _{1/2} SC (hora)	% de Biodisponibilidad SC	GTT* (% ABC de Control)
FGF21ΔH**		12 (12)	2,3 (7)	N/A	0,4	0,5	96	67
K56	10-50	5,5	0,9 (2)	1,9 (1)	17	13	66	100
K59	10-50	0,9	0,6 (1)	6,5 (2)	13	ND	N/A	100
K69	10-50	5,2	1,3 (1)	ND	ND	ND	ND	ND
K122	10-50	1,7	2,6 (2)	1,6 (2)	16	14	40	100
Knull-P2	10-50	ND	1,2 (2)	16,6 (1)	17	ND	N/A	100
Knull-H1K	10-50	ND	6,4 (2)	4,3 (2)	16	11	51	99
Knull-S181K	10-50	ND	7,5 (2)	>500 (2)	ND	ND	ND	ND
D79C		9,9	2,1 (4)	3,7 (3)	17, 19	20, 17	55, 70	54
L86C		62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H125C		0,65	1,2 (3)	3,2 (4)	37	32	67	48, 66
A129C		5,7	1,4 (6)	2,7 (7)	28, 33	37, 33	69, 100	64, 67, 72

Tabla 10 Sumario de sitios de conjugación sobre FGF21. *3 días después de una sola dosis SC de 3 mg/kg, excepto 10 mg/kg D79C y 1 mg/kg Cd para FGF21dH. **proteína; ND: no determinado.

- 5 Aunque Ala129 no se expuso altamente al disolvente y menos de lo que lo hizo D79 o H125, sorprendentemente, FGF21ΔH-A129C, fue uno de los mutantes más estables y la mejor posición ensayada para la conjugación con el anticuerpo. Esto fue inesperado dado que la mutación no es conservativa.

Aunque sin desear quedar limitado a ninguna teoría, existen diversas razones posibles para la exclusiva idoneidad de conjugación a A129C. En primer lugar; tanto Ala129, como His125, se localizan en la región bucle que es flexible en la estructura modelada de FGF21. Estas regiones son normalmente sitios de unión a heparina para otros miembros de FGF de unión a heparina. Como FGF19, FGF21 y FGF23 no interaccionan con heparina, la conservación de fidelidad de secuencia de esta región puede no ser crítica para su función biológica. La flexibilidad de la posición puede ser beneficiosa para la conjugación con el anticuerpo para impedir interferencias de unión al receptor.

En segundo lugar; Ala129 está rodeada por restos cargados positivamente, concretamente His125, Arg126, Arg131 y Arg135. Esta ruta cargada positivamente puede impedir la dimerización-SS de FGF21 Δ H-A129C debido a la fuerte repulsión de carga. En tercer lugar, estos restos cargados pueden favorecer la estabilización del engarce de maleimida L1, que en su ausencia, puede generar un carboxilato después de la apertura del anillo de maleimida. Por tanto, cuando se conjuga FGF21 usando una estrategia de unión con maleimida, la unión en la posición del resto específico de A125 parece ser particularmente ventajosa.

Tanto Ab-L1- FGF21 Δ H-A129C como Ab-L1- FGF21 Δ H-H125C muestran altas semividas IV y semividas SC de al menos 30 horas en modelos murinos así como buena biodisponibilidad. Ambos conjugados demuestran fuerza inferior a 4 nM en el ensayo Glut1 Taqman. En general, Ab-L1- FGF21 Δ H-A129C muestra semivida y fuerza ligeramente mejoradas en comparación con Ab-L1- FGF21 Δ H-H125C. El uso de L1 en Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C también demostró sorprendentes ventajas *in vivo* sobre lo que sugieren

los ensayos *in vitro* y parece ser en general el engarce más ventajoso en comparación con los ensayados.

La combinación específica de los componentes de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C, (anticuerpo, engarce, posición de resto de unión, resto de unión, proteína) parece proporcionar el óptimo en cuanto a semivida, biodisponibilidad, fuerza, actividad, facilidad de producción y resistencia a hidrólisis en comparación con alternativas múltiples.

Ejemplo 48 Eficacia de los compuestos

La tolerancia a glucosa se ensayó en ratones ob/ob tratados con los compuestos Ab-FGF21 Δ H-K56 y Ab-FGF21 Δ H-Knull-H1K. Ambos compuestos se compararon mal frente a Ab-FGF21 Δ H-H125C (Figura 4A y 4B) y Ab-FGF21 Δ H-A129C (Figura 5A y 5B). Por otro lado, Ab-FGF21 Δ H-D79C y Ab-FGF21 Δ H-H125C mostraron que mejoraban la tolerancia a glucosa y reducían el aumento de peso corporal (Figuras 4A, 4B, 6A, 6B, 6C, 6D y Tabla 11).

Tratamiento	ABC de glucosa media (% de control con vehículo)
Vehículo	100
FGF21 Δ H 1 mg/kg CD	61
Ab-FGF21 Δ H-D79C, día 0 y 3	53
Ab-FGF21 Δ H-D79C, día 3	53
Ab-FGF21 Δ H-D79C, día 5	87
Ab-FGF21 Δ H-D79C, día 6	67
Control Lean (vehículo)	41

Tabla 11 ABC de glucosa durante la OGTT realizada el día 6 después de inyección SC de Ab-FGF21 Δ H-D79C a 10 mg/kg al tiempo indicado en ratones ob/ob (véanse las Figuras 6C y 6D).

Se observó que Ab-FGF21 Δ H-D129C mejoraba la tolerancia a glucosa y reducía el aumento de peso corporal debido a un mayor gasto de energía

demostrado por aumento de la expresión de *Ucp1* en tejido adiposo blanco (TAB) e inversión de esteatosis hepática en ratones ob/ob (Figuras 6E, 6F, 6G, 6H y Tabla 12). Para la expresión de *Ucp1*, se homogenizaron muestras de TAB viscerales congeladas recogidas de los estudios de eficacia *in vivo*. El

5 ARN total se extrajo de los homogenados tisulares y la expresión de ARNm de GAPDPH y Glut1 se midió usando un kit para RT-PCR Quantitect Probe y se ejecutó una reacción PCR cuantitativa en tiempo real en un aparato Taqman (Applied Biosystems). El efecto del tratamiento se determinó por un cambio en

10 veces de los niveles de ARNm de Glut1 normalizado por los niveles de ARNm de GAPDH para cada muestra. Ab-FGF21ΔH-D129C produjo pérdida de peso corporal debido a un mayor gasto de energía como se sugiere por la expresión de *Ucp1* aumentada en TAB, triglicéridos en suero y niveles de ácidos grasos en ratones DIO reducidos y disminución del peso hepático (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E y Tabla 13). También se observó una reducción del peso hepático en

15 ratones ob/ob (Figura 7F y Tabla 14). Ensayos adicionales en ratones ob/ob demostraron una reducción de los niveles de ARN de la estearoil-coenzima A desaturasa-1 (SCD1), de la monoacilglicerol O-aciltransferase (MOGAT2) y de la caja A2 de cabeza en horquilla (FoxA2), (Figuras 7G, 7H y 7i y Tabla 15).

Tratamiento	ABC de glucosa durante OGTT 3 mg/kg	Expresión de ARNm UCP1 en TAB 10 mg/kg	Contenido de triglicéridos en hígado 10 mg/kg	Cambio de peso corporal desde el día -1 10 mg/kg
Vehículo	100	1,0	35,7	6,2
FGF21ΔH 1 mg/kg CD	67	2,6	37,0	4,7
Ab-FGF21ΔH-A129C, día 0	80	2,4	22,2	4,2

Tratamiento	ABC de glucosa durante OGTT 3 mg/kg	Expresión de ARNm UCP1 en TAB 10 mg/kg	Contenido de triglicéridos en hígado 10 mg/kg	Cambio de peso corporal desde el día -1 10 mg/kg
Ab-FGF21 Δ H-A129C, día 1	68	2,6	22,1	3,8
Ab-FGF21 Δ H-A129C, día 2	68	2,1	22,2	3,8
Ab-FGF21 Δ H-A129C, día 3	57	2,5	27,7	4,0
Control Lean (vehículo)	57	0,2	9,3	1,1

Tabla 12 Resultados después de una sola inyección SC de Ab-FGF21 Δ H-A129C el día 6 en ratones ob/ob; véanse las Figuras 6E, 6F, 6G, 6H.

Tratamiento	ABC de glucosa durante OGTT	Cambio de peso corporal desde el día -1	Expresión de ARNm UCP1 en TAB	Valores medios de lípidos en suero	
				TG (mg/dl)	NEFA (mM)
	100	-0,2	1,00	133	0,61
FGF21 Δ H 1 mg/kg CD	75	-1,6	1,38	92	0,40
Ab-FGF21 Δ H-A129C, d 0 y 7	83	-2,4	4,02	69	0,36
Control alimentado con pienso (vehículo)	78	+1,2	0,42	104	0,52

Tabla 13 Resultados el día 10 después de una inyección SC repetida de Ab-FGF21 Δ H-A129C a 10 mg/kg el día 0 y 7 en ratones DIO (véanse las Figuras

5 7A, 7B, 7C, 7D, 7E).

Tratamiento	Peso hepático (g)
Vehículo	2,3
FGF21 Δ H 1 mg/kg CD	1,8
Ab-FGF21 Δ H-A129C, día 0	1,4
Ab-FGF21 Δ H-A129C, día 1	1,4
Ab-FGF21 Δ H-A129C, día 2	1,4

Tratamiento	Peso hepático (g)
Ab-FGF21ΔH-A129C, día 3	1,5
Contra control (vehículo)	0,8

Tabla 14 Peso hepático el día 6 después de una sola inyección SC de Ab-FGF21ΔH-A129C a 10 mg/kg al tiempo indicado en ratones ob/ob (para la Fig 7F)

Tratamiento	<i>SCD1</i>	<i>MOGAT2</i>	<i>FoxA2</i>
Vehículo	1,01	1,05	1,00
FGF21ΔH 1 mg/kg CD	0,95	0,37	1,23
Ab-FGF21ΔH-A129C, día 0	0,83	0,38	1,14
Ab-FGF21ΔH-A129C, día 3	0,61	0,31	1,81

Tabla 15 Media cambios en veces de la expresión de ARNm usando qPCR a

- 5 partir de muestras de tejido hepático recogidas 6 días después de una sola inyección SC de Ab-FGF21ΔH-A129C a 10 mg/kg al tiempo indicado en ratones ob/ob (para las Figs. 7G, 7H, 7i).

Ejemplo 49 Niveles de fármaco en plasma de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C en modelo ob/ob

- 10 Se examinaron los niveles de suero relacionados con la dosis de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C en ratones ob/ob los días 3, 4, 5 y 6 posteriores a la administración de la dosis, después de una dosificación de 10 mg/kg y 3 mg/kg. Se observó que los niveles en suero de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C se mantenían bien (Figuras 7J y 7K). Estos resultados coincidían con la farmacocinética en
- 15 individuos sanos.

Ejemplo 50 Efecto *in vivo* de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C sobre sensibilidad a insulina

Se emprendió un estudio para determinar el efecto *in vivo* de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C sobre sensibilidad a insulina corporal completa (medida

como velocidad de infusión de glucosa) y producción de glucosa hepática durante un pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico en ratones libres ob/ob, despiertos. Se administró Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (en tampón acetato 30 mM, pH 4,8) dos veces SC a la semana durante una semana a una dosis de 10 mg/kg. El volumen de dosificación fue de 2 ml/kg por inyección. Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C se inyectó los días 2 y 5 del estudio. Se administró vehículo (tampón acetato 30 mM pH 4,8) dos veces a la semana a un volumen de dosificación de 2 ml/kg por inyección los días 2 y 5 del estudio. Los ratones se trataron con ketprofeno 2 mg/kg SC y ampicilina 100 mg/kg SC inmediatamente antes de la cirugía. Los animales (n=8 por grupo) se asignaron al azar de acuerdo con su glucosa en plasma en ayunas y peso corporal el día 1.

Los pesos corporales se registraron los días 1, 4, 7 y 8 del estudio. Sorprendentemente, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C no demostró ningún efecto sobre el peso corporal en este estudio (datos no mostrados). La glucosa en plasma en ayunas se determinó el día 1 (4 h de ayuno) y el día 8 (16 h de ayuno) con glucómetros portátiles Accu-Chek (Roche). Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C no tuvo efecto sobre los niveles de glucosa en plasma en ayunas en este estudio (datos no mostrados).

El día 7 del estudio, los ratones se dejaron en ayunas durante 16 h antes del procedimiento de pinzamiento el día 8. El día 8 los catéteres se exteriorizaron y los animales se conectaron a líneas de infusión. 90 min antes de comenzar el procedimiento de pinzamiento (-90 min), se inyectó una embolada de glucosa [3-3H] 6 μ Ci en la vena yugular seguido por una infusión constante 0,1 μ Ci/min hasta el final del pinzamiento. Se extrajo sangre a -10 min y 0 min para determinar el valor HGP basal. En el tiempo 0 min comenzó la

infusión de glucosa variable (dextrosa al 50%) así como la infusión constante de insulina 20 mU/kg/min. La glucosa en plasma se midió cada 10 min a partir de la vena de cola y las velocidades de infusión de glucosa se ajustaron de acuerdo con cada nivel de glucosa de los animales hasta alcanzar un estado de equilibrio estacionario. En los puntos de tiempo de 170 min y 180 min se extrajo sangre para determinar la producción de glucosa hepática (PGH) en condiciones de pinzamiento. Durante el procedimiento de pinzamiento, los animales estaban libres y despiertos.

La Producción de Glucosa Hepática (PGH) se calculó usando la siguiente fórmula:

HPG= Ra-Velocidad de infusión de glucosa fría, en la que

$$Ra = \frac{\text{Velocidad de infusión de glucosa (dpm/min)}}{\text{Actividad específica en sangre (dpm/mg)} \times \text{peso (kg)}} = \text{mg/kg/min}$$

La Velocidad de Aparición (Ra) (como estado de equilibrio estacionario = Velocidad de desaparición (Rd)).

Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C no influyó en el peso corporal o en la glucosa en plasma en ayunas en ratones ob/ob en comparación con animales tratados con vehículo. Todos los animales se pinzaron con éxito y alcanzaron niveles de glucosa en plasma euglucémicos de 100-110 mg/dl así como velocidades de infusión de glucosa constante durante los últimos 30 min del pinzamiento. La euglucemia (100 mg/dl – 110 mg/dl glucosa en plasma) se alcanzó en los grupos tratados con vehículo y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Los niveles de glucosa en plasma se midieron a lo largo del periodo completo del pinzamiento de euglucemia hiperinsulinémico (Figura 8A). No hubo diferencia estadística entre los animales tratados con vehículo y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C durante los últimos 30 minutos del experimento (periodo de pinzamiento). Ab-L1-FGF21 Δ H-

A129C aumentó significativamente la velocidad de infusión de glucosa (GIR) en comparación con el vehículo (figura 8B). Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C no modificó la producción de glucosa hepática basal (PGH) pero suprimió significativamente PGH en condiciones de pinzamiento (hiperinsulinémicas) (Figura 8C).

Como conclusión, en este estudio Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C aumentó significativamente las velocidades de infusión de glucosa, una medida de sensibilidad de insulina en cuerpo completa y suprimió la producción de glucosa hepática en comparación con animales tratados con vehículo sin tener efecto sobre el peso corporal o sobre los niveles de glucosa en plasma en ayunas.

Ejemplo 51 Efecto de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en macacos cynomolgus

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C sobre índices lipídicos y glucémicos en plasma, así como sobre la tolerancia a glucosa y biomarcadores inflamatorios cuando se administraba a macacos cynomolgus obesos resistentes a insulina (prediabéticos) mediante inyecciones SC dos veces por semana. Este estudio también se diseñó para determinar la duración del efecto farmacodinámico (PD) de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en los monos en comparación con dosificación diaria con FGF21 Δ H.

En el estudio se incluyeron veintidós monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) adultos. Los monos (13 machos, 11 hembras) se ordenaron en cuatro grupos de tratamiento de 6 individuos, basándose en el sexo, peso corporal e índices glucémicos basales y lipídicos en una muestra en plasma basal recogida 2 días antes del inicio de la dosificación. Los animales se mantuvieron con una dieta rica en grasas. Los animales recibieron dosificación

durante 4 semanas seguido de un periodo de eliminación de 4 semanas. Los animales recibieron dosificación de la siguiente manera: SC dos veces a la semana con Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en Tris 25 mM, NaCl 125 mM pH 7,0 y 1,5 mg/kg (grupo A; 4 machos (m) 1 hembra (f)) y 0,15 mg/kg (grupo B; 3m, 3f),
5 dos veces a la semana s.c. con vehículo (Tris 25 mM y NaCl 125 mM a un pH final de 7,0) (grupo C; 3m, 3f) y una vez al día (CD) con FGF21 Δ H a 0,3 mg/kg (grupo D; 3m, 2f).

Se extrajeron muestras de sangre semanalmente durante los periodos de dosificación y eliminación con la excepción de que no se recogieron
10 muestras a las 3 semanas de la eliminación. Después de un ayuno de una noche (16-18 h), los monos se sedaron con quetamina 10-15 mg/kg por inyección intramuscular (IM). Los pesos corporales se registraron y se extrajo sangre (5 ml) mediante punción venosa femoral percutánea en tubos Vacutainer tratados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) previamente
15 tratados con ~1,8 unidades de inhibidor de tripsina (UIT) Aprotinina (Sigma 0,6 UIT por ml de sangre completa). Inmediatamente los tubos se colocaron en hielo. El plasma se preparó por centrifugación, con el resultante plasma dividido en alícuotas y congelado a -80°C.

El muestreo del nivel de fármaco en plasma se realizó los Días 1, 14 y
20 28 del periodo de dosificación. Los niveles de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C se determinaron usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C se capturó usando anti-h38C2 idiopático de ratón y se detectó con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-FGF21 de ratón biotinilados dirigidos a los extremos N y C de FGF21. El anticuerpo de
25 detección C terminal tiene especificidad por los últimos 4-5 aminoácidos de

FGF21, mientras que el anticuerpo de detección N terminal se suscitó contra los primeros 11-12 aminoácidos de FGF21. La dilución mínima requerida para el ensayo con reactivo de detección dual fue 1:20 en solución salina tamponada con fosfato BSA al 3%. El intervalo de calibración fue 0,03-10 µg/ml y el intervalo de cuantificación fue 0,03-4 µg/ml.

Los datos se trataron de la misma manera para cada criterio de valoración farmacodinámico. El valor de línea basal para cada mono individual se restó de cada punto de tiempo para dar un valor correspondiente al cambio desde la línea basal. Los cambios desde los valores de la línea basal se promediaron para cada punto de tiempo en cada grupo de tratamiento y se calculó el error típico de la media (ETM). Los resultados se indican como cambio medio desde la línea basal $\pm$ ETM para cada grupo de tratamiento durante el desarrollo del estudio. Para los animales tratados con 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C, se evaluó el significado estadístico en cada punto de tiempo frente a vehículo usando el cambio a partir de valores de línea basal y un ensayo de la T de student (muestra no relacionada, varianza desigual). Como no había grupo de control con vehículo para los animales tratados con FGF21 Δ H, se usaron los datos sin procesar y no el cambio desde el valor de línea basal para evaluar el significado estadístico. En este caso se realizó un ensayo de la T de student (muestra bilateral, pareada) frente al valor de línea basal.

Ejemplo 52 Niveles de fármaco en plasma de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Los niveles de fármaco en plasma se muestran en la Tabla 16. Los niveles de fármaco medibles estaban presentes 4 h después de la primera dosis y en todos los puntos de tiempo posteriores ensayados.

Día	Dosis (mg/kg)	Media (DT) AB-L1-FGF21ΔH-A129C Concentración en Plasma por Tiempo (h)			
		Predosis	1	4	24
1	0,15	BLQ	NC	61,6(52,5)	60,1(25,0)
	1,5	BLQ	NC	221(186)	335(181)
14	0,15	31,7(20,8)	18,6(10,5)	27,1(10,3)	27,6(14,3)
	1,5	66,4(38,5)	249(188)	312(225)	300(228)
28	0,15	-	-	-	39,1(51,4)
	1,5	-	-	-	73,7(84,8)

Tabla 16 Niveles de fármaco en plasma de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C. BLQ = límite por debajo de la cuantificación (8 ng/ml), NC = no calculado n<3, - = muestra no disponible para el ensayo.

Ejemplo 53 Peso corporal

- 5 Hubo una disminución significativa en cuanto al peso corporal en el tratamiento después de 2 semanas en los dos grupos que recibieron dosis de AB-L1-FGF21ΔH-A129C y después de 1 semana en el grupo tratado con la proteína de control FGF21 (Figura 9A). En todos los grupos la pérdida de peso se mantuvo baja durante el periodo de eliminación aunque hubo pérdida
- 10 significativa a las 4 semanas de la eliminación en los dos grupos de AB-L1-FGF21ΔH-A129C. Los animales tratados con FGF21ΔH mostraron pérdida de peso mayor que los tratados con AB-L1-FGF21ΔH-A129C. La ingesta de alimento no se midió directamente en estos animales pero los cuidadores no observaron inapetencia en ninguno de los animales en ningún grupo de
- 15 tratamiento.

Ejemplo 54 Glucosa en plasma en ayunas

La glucosa en plasma se midió mediante un procedimiento colorimétrico enzimático usando el Analizador y los reactivos Alera® Clinical Chemistry (Alfa

Wassermann®, Caldwell, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. No hubo cambios significativos en cuanto a la glucosa en plasma en ayunas (Figura 9B) a través del tiempo en ninguno de los grupos de tratamiento, indicando que el tratamiento prolongado con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C no produce hipoglucemia.

Ejemplo 55 Insulina en plasma en ayunas

Las concentraciones de insulina en plasma se determinaron usando un kit ELISA de Mercodia® (Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con el transcurso del tiempo, no hubo cambios significativos en los niveles de insulina en plasma en ayunas (Figura 9C) en ninguno de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 56 Fructosamina en plasma en ayunas

La fructosamina en plasma se midió mediante un procedimiento colorimétrico enzimático usando el Analizador Químico Ace Alera Clinical un kit de Roche Diagnostics® (Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de fructosamina en plasma se redujeron significativamente después de 4 y 3 semanas de tratamiento respectivamente en los grupos de tratamiento de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C de 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg y después de 3 semanas en los animales tratados con proteína de control FGF21 (Figura 9D).

Este significado se mantuvo en el periodo de eliminación, particularmente en el grupo de tratamiento AB-L1-FGF21 Δ H-A129C de 1,5 mg/kg, pero no fue uniforme a través de los puntos de tiempo para los animales tratados con FGF21 Δ H. La reducción significativa en los niveles de fructosamina en plasma a lo largo del tiempo indica un control glucémico

mejorado.

Ejemplo 57 Glucagón en plasma en ayunas

El Glucagón en plasma se midió usando un kit de Inmunoensayo endocrino humano (que reacciona de forma cruzada con primates no humanos) de Millipore® en el instrumento BioPlex® (tecnología Luminex xMAP) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de glucagón disminuyeron en los 3 grupos de tratamiento, alcanzándose significado en algunos puntos de tiempo a lo largo del estudio, pero el significado de la disminución no es uniforme a través de los grupos de tratamiento o a través de los grupos de dosis AB-L1-FGF21 Δ H-A129C (Figura 9E).

Ejemplo 58 Ensayo de tolerancia a glucosa intravenosa (IVGTT)

Se realizaron ensayos de tolerancia a glucosa intravenosa (IVGTT) en cada animal en tres puntos de tiempo: línea basal (es decir, dos semanas antes del comienzo de la dosificación), de nuevo 4 semanas después de la dosificación, y finalmente después de 4 semanas de la eliminación después de la dosificación. En estos puntos de tiempo, los monos se sedaron y se recogieron muestras de sangre en ayunas como se ha descrito anteriormente. Se infundió dextrosa al 50% (500 mg/kg; 1 ml/kg) en una vena periférica (cefálica o safena) durante aproximadamente 30 segundos, seguido de lavado con una solución salina. Posteriormente se recogieron muestras de sangre en vacutainers tratados con EDTA (2 ml) 5, 10, 20, 30 y 60 minutos después de la administración de dextrosa.

Se midieron la glucosa y la insulina en cada uno de los puntos de tiempo de IVGTT. Las áreas bajo la curva de glucosa e insulina se calcularon durante el ensayo de tolerancia a glucosa (0-60 min). Se calcularon las Δ ABC para

glucosa e insulina a partir de las curvas de evolución de glucosa e insulina por la regla trapezoidal usando valores de tiempo 0 ($t=0$ min) como valor basal. Para los grupos tratados con 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C, se evaluó el significado estadístico frente al vehículo mediante ANOVA con ensayo posterior de Dunnett. Se evaluó el significado a través de los puntos de tiempo de IVGTT frente a la línea basal para el grupo FGF21 Δ H por ANOVA de medición repetida con ensayo posterior de Dunnett.

La media calculada $\Delta ABC \pm ETM$ para glucosa e insulina se muestra en las Figuras 9F y 9G respectivamente. No hubo cambios significativos en ninguno de los parámetros calculados para ninguno de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 59 Colesterol en plasma total (CPT)

Se midieron los niveles de CPT usando procedimientos enzimáticos en el analizador Ace Alera. Hubo una disminución significativa en el CPT después de 1 semana de tratamiento en todos los grupos de tratamiento (Figura 9H). En los animales tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 0,15 mg/kg, los niveles de CPT permanecieron reducidos a lo largo de toda la dosificación y la fase de eliminación, mientras que en los grupos tratados con 1,5 mg/kg y FGF21 Δ H, los niveles rebotaron hacia la línea basal durante la fase de eliminación.

Ejemplo 60 Triglicéridos (TG)

Los niveles de TG se midieron usando procedimientos enzimáticos en el analizador Ace Alera. Hubo una disminución significativa en TG a lo largo del periodo de dosificación tanto en el grupo tratado con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 1,5 mg/kg como en los animales tratados con FGF21 Δ H (Figura 9i). La reducción de los niveles de TG persistió a lo largo de la fase de eliminación en

el grupo tratado con FGF21 Δ H, mientras que los niveles de TG en el grupo tratado con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 1,5 mg/kg tendieron hacia la línea basal en la fase de eliminación.

Ejemplo 61 Ácidos grasos libres no esterificados (FFA)

- 5 Los ácidos grasos libres no esterificados (FFA) se midieron usando procedimientos enzimáticos en un analizador de química clínica Roche Cobas® C311 usando protocolos y reactivos de Wako® (Wako Diagnostics, Richmond, VA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. No hubo cambios significativos en los niveles de FFA en los grupos tratados con AB-L1-
10 FGF21 Δ H-A129C a 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg (Figura 9J). Los niveles de FFA en los animales tratados con FGF21 Δ H aumentaron significativamente durante las 2 primeras semanas de tratamiento y después volvieron a los niveles basales en la semana 1 de la fase de eliminación.

Ejemplo 62 Colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL)

- 15 Los niveles de HDL se midieron usando procedimientos enzimáticos en el analizador Ace Alera. No hubo cambios significativos en el colesterol HDL a lo largo del periodo de tratamiento en ninguno de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 63 Colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL)

- Los niveles de LDL se midieron usando procedimientos enzimáticos en
20 el analizador Ace Alera. Hubo una disminución significativa en el colesterol LDL desde 2 semanas y 1 semana de tratamiento, respectivamente, hasta la semana 2 del periodo de eliminación en los grupos tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg (Figura 9K). Solamente pudo observarse una disminución significativa en los niveles de colesterol LDL
25 después de 1 semana de tratamiento en los animales tratados con FGF21 Δ H.

No se observó significado en ningún otro punto de tiempo en este grupo de tratamiento.

Ejemplo 64 Cuerpos cetónicos totales (TOTK)

Los TOTK se midieron usando procedimientos enzimáticos en un
5 analizador de química clínica Roche Cobas® C311 usando protocolos y
reactivos de Wako®. No hubo un cambio significativo en los niveles de cuerpos
cetónicos totales en los animales tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 0,15
mg/kg y 1,5 mg/kg (Figura 9L). Los niveles de TOTK aumentaron
significativamente en los animales tratados con FGF21 Δ H durante las 3
10 primeras semanas de tratamiento, tendiendo los niveles hacia la línea basal
durante el periodo de eliminación.

Ejemplo 65 Adiponectina

Los niveles de adiponectina se determinaron usando un kit ELISA
Mercodia®. Los niveles de adiponectina en plasma se muestran en la Figura
15 9M. Se excluyeron tres animales del análisis (uno de cada uno de los grupos
de vehículo, AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 1,5 mg/kg y el grupo tratado con
FGF21 Δ H), ya que sus niveles de adiponectina estaban por debajo del límite de
detección para el ensayo. No se observaron cambios significativos en los
niveles de adiponectina en ninguno de los grupos de tratamiento, aunque los
20 niveles mostraron una tendencia ascendente en los animales tratados con
FGF21 Δ H.

Ejemplo 66 Proteína C Reactiva (CRP)

La proteína C reactiva (CRP) se midió usando un kit ELISA de ALPCO
Diagnostics® (Salem, NH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los
25 niveles de CRP en plasma disminuyeron significativamente en los animales

tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C a 0,15 y 1,5 mg/kg durante el periodo de tratamiento de 4 semanas con la excepción de la semana 2 (Figura 9N). Los niveles tendieron de nuevo a la línea basal durante la fase de eliminación. Los niveles de CRP en plasma también disminuyeron en los animales tratados con

5 FGF21 Δ H, pero únicamente se alcanzó significado en el punto de tiempo de eliminación de 1 semana.

Ejemplo 67 Leptina

La leptina se midió mediante tecnología Luminex® (número de catálogo Millipore® HMH-34K) con protocolos y reactivos de acuerdo con las

10 instrucciones del fabricante. Los niveles de leptina en plasma disminuyeron en los animales tratados con FGF21 Δ H (Figura 9o), pero esta disminución no alcanzó significado en ninguno de los puntos de tiempo. No hubo cambio en los niveles de leptina en los grupos tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C.

Ejemplo 68 Adipsina

15 Los niveles de adipsina se midieron usando un kit Quantikine de R&D systems® (Minneapolis MN) del factor D de complemento humano (número de catálogo DF00) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de adipsina en plasma aumentaron significativamente en todos los animales tratados (Figura 9Q) durante las 3 primeras semanas del tratamiento. Los

20 niveles tendieron de nuevo hacia la línea basal durante la fase de eliminación.

Ejemplo 69 Conclusión extraída de estudios en monos

AB-L1-FGF21 Δ H-A129C fue eficaz reduciendo el peso corporal, mejorando los índices de lípidos (TPC, TG y LDL) y reduciendo un biomarcador inflamatorio (CRP) en macacos cynomolgus con resistencia a la insulina de

25 leve a moderada. No hubo ningún efecto aparente de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C

o FGF21 Δ H en los niveles de glucosa en sangre en ayunas y no se produjo ninguna hipoglucemia. No hubo ningún efecto sobre la sensibilidad a la insulina según se evaluó mediante IVGTT. Aunque era inesperado, este resultado, junto con la ausencia de efecto sobre los niveles de glucosa en plasma, puede deberse a los niveles basales de glucosa e insulina en estos macacos, que sólo están ligeramente elevados en comparación con los macacos sanos normales. Esto sugiere que estos animales presentan solamente una resistencia leve a la insulina. El pequeño cambio en los niveles basales combinado con la variabilidad natural entre un mono y otro y el bajo número de animales por grupo, puede hacer que sea difícil observar cambios estadísticamente significativos en los índices glucémicos. La reducción de los niveles de fructosamina en los animales tratados con AB-L1-FGF21 Δ H-A129C hacia el final del periodo de tratamiento indica un control glucémico mejorado en estos animales. La dosificación de dos veces por semana de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C (particularmente la dosis de 1,5 mg/kg) produjo efectos beneficiosos comparables a la dosificación diaria de la proteína FGF21 de control.

Ejemplo 70 Primer estudio en seres humanos de AB-L1-FGF21 Δ H-A129C

Se emprendió un estudio aleatorio, controlado por placebo, de una sola dosificación oral ascendente, paralelo, de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (h38C2- (SEC ID N°: 10-L1)₂) en sujetos con diabetes mellitus de Tipo 2. Los sujetos recibieron placebo o Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C como una administración en embolada IV (0,5 mg y 1,5 mg) o infusión IV (5, 10, 50, 100, 200 mg), evaluándose 10 sujetos en cada grupo de dosis de tratamiento activo y 14 en el grupo de placebo. Hasta la fecha, se han evaluado siete cohortes hasta el nivel de dosificación de 200 mg sin identificación de la dosis máxima tolerada (DMT),

ya que se observó que dosis IV individuales de hasta 200 mg generalmente eran inocuas y se toleraban bien. En el presente documento se presenta un resumen preliminar de los datos de seguridad/tolerancia, farmacocinéticos y farmacodinámicos observados.

- 5 Después de la administración de una sola dosis, no se observaron diferencias entre perfiles de glucosa media en plasma de 7-pt y niveles de glucosa en plasma en ayunas en comparación con el placebo. Sin embargo, los grupos de placebo y de ensayo mostraron alguna reducción de los niveles de glucosa, lo que sugiere que se requieren estudios adicionales. No se
- 10 observaron tendencias relacionadas con la dosis en colesterol total, colesterol LDL, insulina en ayunas, glucagón en ayunas o beta-hidroxibutirato en ayunas. Se observó un aumento en el colesterol HDL en comparación con el placebo en los dos niveles de dosis superiores estudiados (100 y 200 mg IV). Se observó una disminución dependiente de la dosis en triglicéridos en ayunas.
- 15 Se estimaron por separado los parámetros farmacocinéticos del extremo C intacto y del extremo N intacto de FGF21 en voluntarios sanos después de la administración simple intravenosa de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Las exposiciones a las dos proteínas parecían aumentar proporcionalmente con el aumento de la dosis. Las fases terminales de las curvas de concentración
- 20 logarítmica frente al tiempo fueron paralelas con semividas medias terminales de 7 a 9 horas para el extremo C y de 30-36 h para el extremo N, respectivamente.

 No se notificaron acontecimientos adversos graves (AAG) y se notificó un total de 60 acontecimientos adversos (AA). De estos AA, se notificaron 54

25 en 28 sujetos que recibían Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. La mayoría de AA se

consideraron leves en intensidad excepto un episodio de náuseas clasificado como moderado que comenzó a las 32,5 h después de la dosificación de 15 mg de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C o placebo que duró 156 h, no necesitó intervención y se consideró relacionado con el tratamiento con el fármaco de estudio.

- 5 También se notificó un episodio de diarrea clasificado como moderado, que comenzó a las 2 h después de la dosis de 50 mg de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C o placebo y duró 156 h, que no necesitó intervención y se consideró relacionado con el tratamiento con el fármaco de estudio. La diarrea fue el AA más frecuente notificado (14 episodios en 12 sujetos) y, de éstos, nueve (9)
- 10 episodios se consideraron relacionados con el tratamiento. Los otros episodios de diarrea se consideraron relacionados con el tratamiento de cloración alterado del agua corriente servida a los sujetos en una cohorte durante el confinamiento hospitalario en una unidad de investigación clínica de participación. Los síntomas gastrointestinales (distensión abdominal, dolor
- 15 abdominal, diarrea, dispepsia, flatulencia, hiperclorhidria, náuseas y vómitos) parecían aumentar en frecuencia al aumentar la dosis, notificando cinco (5) sujetos nueve (9) AA GI en la Cohorte 7 (grupo de dosis de 200 mg o placebo). Ningún sujeto se retiró de la participación del estudio como resultado de un AA.

- No se observaron tendencias relacionadas con la dosis en valores de
- 20 IGF-1, ensayos de laboratorio, signos vitales o ECG de 12 derivaciones observados a lo largo de las dosis estudiadas. En el grupo de tratamiento de 200 mg, los valores medios para la presión sanguínea sistólica (PSS) tendieron a ser numéricamente más elevados que en los otros grupos de tratamiento (incluyendo placebo), con un mayor aumento desde el valor basal de 11,2
- 25 mmHg a las 0,5 h después de la dosis del Día 1, y se mantuvo a 7,0 mmHg

hasta el Día 15. Los cambios medios desde la línea basal observados en el grupo de tratamiento de 200 mg estaban dentro de una desviación típica de la línea basal media del grupo. Además, no hubo correlación entre la exposición a Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C y aumentos de PSS en sujetos individuales en el grupo de tratamiento de 200 mg. Además, la PSS aumentada persistió hasta el Día 15, bastante después de la eliminación del fármaco de estudio. Todas estas observaciones sugieren que el aumento medio observado está dentro y posiblemente relacionado con la variabilidad de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 71 Régimen de dosificación

La relación concentración-respuesta de la disminución de triglicéridos después de una sola dosis de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en pacientes que padecen diabetes de tipo 2 se describió usando un modelo de inicio farmacológico lento y PK/PD compensado. Para la proyección de la dosis se usó el valor de Cl_{50} obtenido del modelo PK/PD y la cinética farmacológica lenta procedente de los datos de triglicéridos FIH (primero en seres humanos) y la farmacología máxima derivada del modelo de los datos de OGTT en ratones ob/ob. Se proyecta una dosis semanal de 10 mg de h38C2-(SEC ID N°: 10-L1)₂ o dos veces una dosis por semana de 5 mg Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C durante 4 semanas para conseguir una disminución de la glucosa en plasma en ayunas de ~25% en pacientes diabéticos con HbA1C del 8%.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un régimen de dosificación que comprende tratar a un paciente con una dosis de aproximadamente 5 mg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C). En algunos aspectos, los aproximadamente 5 mg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C) se

administran bisemanalmente (dos veces por la semana). En algunos aspectos, los aproximadamente 5 mg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C) se administran durante al menos 4 semanas. En algún aspecto, los aproximadamente 5 mg/kg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C) se administran bisemanalmente durante al menos 4 semanas. En algunos aspectos ...

Por consiguiente, la presente invención proporciona un régimen de dosificación que comprende tratar a un paciente con una dosis de aproximadamente 10 mg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C). En algunos aspectos, los aproximadamente 10 mg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C) se administran una vez por la semana. En algunos aspectos, los aproximadamente 10 mg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C) se administran durante al menos 4 semanas. En algún aspecto, los 10 mg/kg de un compuesto de la invención (en particular Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C) se administran una vez por semana durante al menos 4 semanas.

En algunos aspectos, el paciente padece diabetes de tipo 2. En algunos aspectos, el paciente es un paciente diabético con la hemoglobina A1C elevada. En algunos aspectos, el régimen de dosificación es para disminuir los niveles de triglicéridos. En algunos aspectos, el régimen de dosificación es para aumentar el nivel de HDL. En algunos aspectos, el régimen de dosificación es para disminuir la glucosa en sangre. En algunos aspectos, el régimen de dosificación es para disminuir la glucosa en sangre en al menos aproximadamente un 25%. En algunos aspectos, el régimen de dosificación es

para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

Ejemplo 72 Estabilidad Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Se prepararon diversas formulaciones de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab (h38C2-(FGF21 Δ H-H125C-L1)₂) y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂) por UF-DF (diafiltración y ultrafiltración usando un límite de peso molecular de 30000) y después se filtraron de forma estéril. Las formulaciones se sometieron a una serie de condiciones de estrés (véase la Tabla 17). Después, las muestras se analizaron usando un ensayo de Aspecto, UV (absorbancia ultravioleta), SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida), Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) e iCe (electroforesis capilar por imagen). Algunas muestras se analizaron mediante técnicas biofísicas tales como calorimetría de barrido diferencial (DSC) y ultracentrifugación analítica. Las muestras se analizaron a diversos puntos de tiempo (Tabla 17) para evaluar la tendencia a la estabilidad. Para determinar cualquier efecto beneficioso del polisorbato 80, las formulaciones seleccionadas preparadas con o sin polisorbato 80 se sometieron a estrés de agitación (4 h de agitación orbital a 300 rpm). Adicionalmente, algunas formulaciones también usaron una mayor concentración para evaluar si los conjugados eran solubles en disolventes tamponados acuosos a alta concentración y para evaluar la estabilidad a alta concentración.

	Formulación	Proteína mg/ml	Aspecto					
			Ini- cial	4 h 300 rpm	4 sem. 5°C	4 sem. 25°C	2 sem. 40°C	2 sem. 50°C
A	"H125C-His6" (histidina 20 mM, pH 6)	7-10	C	PF	PF	PF	PF	PF
B	"H125C -NaAc4" (acetato de sodio 20 mM, pH 4)	7-10	C	nr	PF	nr	C	nr
C	"H125C -NaP8" (fosfato de sodio 20 mM, pH 8)	7-10	C	nr	PF	nr	C	nr
D	"H125C -His6-50" (histidina 20 mM, pH 6)	40-50	C	nr	PF	nr	C	nr
E	"H125C-His6-PS80" (his 20 mM, polisorbato 800, 2 mg/m, pH 6)	7-10	C	C	nr	nr	nr	nr

	Formulación	Proteína mg/ml	Aspecto					
			Ini- cial	4 h 300 rpm	4 sem. 5°C	4 sem. 25°C	2 sem. 40°C	2 sem. 50°C
F	"A129C-His6" (histidina 20 mM, pH 6)	7-10	C	PF	PF	PF	PF	PF
G	"A129C -NaAc4" (acetato de sodio 20 mM, pH 4)	7-10	C	nr	C	nr	C	nr
H	"A129C -NaP8" (fosfato de sodio 20 mM, pH 8)	7-10	C	nr	C	nr	C	nr
I	"A129C -His6-50" (histidina 20 mM, pH 6)	40-50	C	nr	PF	nr	C	nr
J	"A129C-His6-PS80" (his 20 mM, polisorbato 800, 2 mg/ml, pH 6)	7-10	C	C	nr	nr	nr	nr

Tabla 17 Formulaciones de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C (A-E) y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (F-I). PF: partículas formadas; C: transparente; nr: no realizado.

5 Ensayo de aspecto

Formación de partículas después del almacenamiento a diversas temperaturas: los dos candidatos en la formulación de histidina 20 mM, pH 6 (Formulaciones A y F) mostraron formación de partículas después de 4 semanas de almacenamiento a 5°C o 4 semanas a 25°C, o 2 semanas a 40°C o 2 semanas a 50°C. Estos datos sugieren que la formulación de histidina 20 mM, pH 6 conduce a inestabilidad de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Cuando se sometieron a estrés a 40°C durante 2 semanas, el acetato pH 4 y fosfato pH 8 no mostraron formación de partículas, a diferencia de la formulación de histidina a pH 6 al mismo nivel de concentración de proteínas. Sin embargo, la alta concentración de proteínas (40-50 mg/ml) parece ralentizar la formación de partículas cuando se compara con la misma formulación (histidina, pH 6) a menor concentración de proteína (7-10 mg/ml). Cuando se comparan los datos de aspecto de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C después del almacenamiento a 5°C durante 4 semanas, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C muestra un comportamiento superior frente a la

formación de partículas en las 2 formulaciones (acetato, pH 4, y fosfato pH 8).

La presencia de polisorbato 80 ayuda a impedir que el estrés por agitación induzca la formación de partículas en ambos candidatos como se observa en la Tabla 17 cuando se comparan formulaciones con y sin polisorbato 80. El estrés por agitación se usa normalmente para predecir la estabilidad frente a diversas etapas de procesamiento que implican interfase aire-agua así como estrés mecánico.

No se observó ningún cambio significativo en UV a lo largo del tiempo, indicando que incluso si se observaba formación de partículas en algunas de las formulaciones indicadas en la Tabla 17, la concentración neta de proteína no se veía significativamente afectada a lo largo del tiempo.

Formación de especies de alto peso molecular (EAPM)

Se usó SEC para medir la formación de EAPM para diversas formulaciones indicadas en la Tabla 17 (resultados mostrados en la Tabla 18). La SEC puede separar de manera fiable EAPM y es un ensayo indicativo de estabilidad importante para Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C. Las EAPM en el ensayo SEC se definen como las especies que eluyen antes que los conjugados que llevan 2 unidades de FGF21 (es decir, h38C2-(FGF21 Δ H-H125C-L1)₂ y h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂). Las formulaciones en histidina 20 mM, pH 6, para ambos candidatos mostraron una elevada formación inicial así como dependiente del tiempo de EAPM. De manera interesante, algunas de las formulaciones (acetato, pH 4; fosfato, pH 8 y formulaciones de alta concentración en histidina pH 6) de ambos candidatos a temperaturas elevadas (40^o C) tendían a mostrar una disociación inicial de agregados en la primera semana. En la bibliografía se conoce la tendencia a la

agregación no lineal de formulaciones de proteínas a lo largo del tiempo. Las formulaciones en acetato sódico 20 mM, pH 4, mostraron menos EAPM cuando se compararon con formulaciones en histidina 20 mM, pH 6. Por lo tanto, las formulaciones en acetato sódico 20 mM proporcionan mayor estabilidad que en histidina 20 mM, pH 6 para la formación de EAPM. El análisis de SDS PAGE fue coherente con estos resultados. Por último, cuando los dos candidatos se compararon para determinar la predisposición a la formación de EAPM a 5° C en acetato, la formulación pH 4, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C parecía comportarse mejor que Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C (Tabla 18).

Temperatura de almacenamiento	5° C				25° C			40° C		
Punto de Tiempo (semana)	inicial	2 sem.	4 sem.	8 sem.	1 sem.	2 sem.	4 sem.	1 sem.	2 sem.	4 sem.
H125C-His6	25,1	25,9	27,1	21,8	22,8	23,3	22,0	14,5	20,2	25,1
H125C -NaAc4	11,7	8,5	9,6					4,6	4,5	6,3
H125C -NaP8	21,0	20,2	21,7					15,0	12,0	10,1
H125C -His6-50	33,2		36,4						33,9	20,9
A129C-His6	27,3	23,3	25,0	24,3	18,6	20,3	18,9	14,0	23,2	13,0
A129C -NaAc4	3,6	3,2	3,5					2,9	3,6	5,0
A129C -NaP8	17,8	17,0	17,8					11,9	14,9	30,8
A129C -His6-50	28,2		35,3						29,6	23,5

TABLA 18 Datos de estabilidad de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

El % de EAPM (especies de alto peso molecular) se midió mediante SEC. Las condiciones de SEC incluyen: columna SEC 4,6 x 300 mm Waters Biosuite UHR 250 4 μ m, Fase Móvil: Fosfato Sódico 200 mM, Tampón de Cloruro Sódico 100 mM (pH 7,0), Temperatura de la Columna: Ambiente,

Caudal: 0,1 ml/min (Isocrático), Detección: absorbancia UV a 214 nm, Tiempo de Ejecución: 50 min.

Heterogeneidad de la carga

Las proteínas poseen heterogeneidad de carga causada por modificaciones postraduccionales tales como desamidación y fragmentación. El isoelectroenfoque capilar por imágenes (iCE) separa especies de proteínas basándose en sus diferencias de carga (valor pI) en un gradiente de pH. El iCE se usó para supervisar la heterogeneidad de carga en diversas formulaciones de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C, y se muestra en la

10 Tabla 19. Las condiciones de ejecución para iCE incluyen: aproximadamente 1 mg/ml de proteína con urea 2M, y Pharmalyte 3-10. Las formulaciones en histidina 20 mM, pH 6, así como en fosfato sódico 20 mM, pH 8 para ambos candidatos mostraron una mayor tendencia de formación de especies ácidas en comparación con las de acetato sódico 20 mM, pH 4. Por lo tanto, las

15 formulaciones en acetato sódico 20 mM, pH 4 proporcionan mayor estabilidad. Adicionalmente, Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C mostró una tendencia a una menor formación de especies ácidas en acetato sódico 20 mM, pH 4 que Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C en la misma formulación, demostrando de esta manera superior estabilidad para la heterogeneidad de carga.

Temperatura de almacenamiento	5° C			25° C			40° C	
Punto de Tiempo (semana)	inicial	2 sem.	4 sem.	8 sem.	1 sem.	2 sem.	4 sem.	1 sem.
H125C-His6	60,0	62,8	64,9	60,3	71,9	74,2	75,1	82,9
H125C -NaAc4	62,4	61,7	60,7				53,3	
H125C -NaP8	77,4	92,3	95,3				96,2	

Temperatura de almacenamiento	5° C			25° C			40° C	
Punto de Tiempo (semana)	inicial	2 sem.	4 sem.	8 sem.	1 sem.	2 sem.	4 sem.	1 sem.
H125C -His6-50	61,9		78,5					
A129C-His6	58,4	62,7	62,5	64,2	73,0	75,2	75,7	81,9
A129C -NaAc4	49,3	52,7	48,8				45,2	
A129C -NaP8	68,3	87,5	89,0				97,4	
A129C -His6-50	62,5		53,9					

TABLA 19 % de especies ácidas medido por Heterogeneidad de Carga iCE de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

La estabilidad térmica de los dos candidatos se investigó usando DSC midiendo el punto medio de transición (T_m) de desplegamiento inducido por la temperatura. El valor de T_m de la transición de desplegamiento principal para h38C2 fue 73,5° C. Los conjugados mostraron mayor T_m de la transición de desplegamiento principal, lo que sugiere mayor estabilidad térmica frente al desplegamiento (la T_m de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C (h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂) y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (h38C2-(FGF21 Δ H-H125C-L1)₂) fue de 79° C).

La estabilidad térmica de los dos candidatos también se investigó usando la fluorescencia intrínseca del triptófano en proteínas midiendo el punto medio de transición (T_m -FL) de desplegamiento inducido por la temperatura. Éste ensayo supervisa cambios en la estructura terciaria de manera semicuantitativa después del desplegamiento inducido por una elevada temperatura. Los valores T_m -FL de la transición de desplegamiento principal fueron aproximadamente 74,1° C, 77,7° C y 79,7° C para h38C2, Ab-L1-

FGF21 Δ H-A129C y Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C, respectivamente. De acuerdo con los valores de T_m medidos por DSC, los dos candidatos mostraron T_m-FL similares que son ligeramente superiores que los valores de T_m-FL de h38C2, lo que sugiere una mayor estabilidad termodinámica de los conjugados que h38C2 en solitario.

Ensayo de ultracentrifugación analítica

Este ensayo se usó como una medición ortogonal de la cantidad cualitativa de EAPM en formulaciones ensayadas seleccionadas. Muestra un nivel de EAPM en formulaciones de histidina 20 mM, pH 6, similar a los observados en SEC. También muestra un nivel menor de EAPM en acetato sódico 20 mM, pH 4, para Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C, cualitativamente coherente con la tendencia observada en el ensayo SEC. Los datos de ultracentrifugación analítica proporcionan una verificación ortogonal de que la formulación de acetato sódico 20 mM, pH 4, proporciona mayor estabilización en comparación con la formulación de histidina 20 mM, pH 6 (Tabla 20).

Formulación	% de EAPM
Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C en histidina 20 mM, pH 6	25,2
Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en histidina 20 mM, pH 6	24,3
Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en acetato sódico 20 mM, pH 4	5,2

TABLA 20 Datos EAPM medidos por ultracentrifugación analítica de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C y Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Comparando los datos de varios indicadores de estabilidad analizados en este ejemplo, el perfil de estabilidad global de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C parece ser superior que el de Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C. También es evidente

que la disminución del pH de la formulación (por ejemplo acetato, pH 4) proporciona mejor estabilidad en comparación con un mayor pH (por ejemplo, pH 6-8).

Ejemplo 73 Exploración de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C en tampón de pH

5 Se investigó la estabilidad de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂) en diversos tampones acuosos con el objetivo de encontrar un medio de estabilización apropiado. La inestabilidad del Engarce-1, así como cualquier fragmento hidrolítico de los componentes de la proteína (es decir h38C2 y FG21) da como resultado la generación de especies de bajo

10 peso molecular (EBPM). Además, pueden formarse especies de alto peso molecular si en la formulación se ensayan agregados de los conjugados. Las formulaciones se prepararon por intercambio de tampón en la formulación deseada con una concentración de proteína diana en el intervalo de 5-8 mg/ml. Las formulaciones se filtraron usando un filtro de 0,2 μ m, se envasaron en

15 viales de vidrio y se almacenaron a la temperatura deseada. Las muestras se ensayaron en los puntos de tiempo indicados.

Medición de EAPM y EBPM por SEC

Se observó un efecto pronunciado del tampón y pH después de un estrés de temperatura (40° C) durante 2 semanas. Los datos se presentan en

20 la Tabla 21. En el punto de tiempo inicial, se observó una tendencia al aumento de EAPM en formulaciones de mayor pH. Las formulaciones en histidina estaban entre las que mostraban un elevado % de EAPM. Las formulaciones en acetato sódico, lactato sódico, malato sódico y citrato sódico en el intervalo de pH del 4,5 a 5 mostraron relativamente menos agregados en el punto inicial.

25 Después del almacenamiento a 40° C durante semanas, el % de EAPM

disminuyó realmente en las formulaciones a pH 6,5 y 7. La formulación en lactato sódico, de pH 4,5, mostró un comportamiento relativamente superior para el % de EAPM.

La tendencia de EBPM fue diferente de la de EAPM. Excepto la
 5 formulación de citrato sódico, pH 5, todas las formulaciones mostraron valores
 uniformes de % de EBPM en el punto de tiempo inicial. Después del
 almacenamiento a 40° C durante 2 semanas, algunas de las formulaciones de
 pH bajo mostraron un aumento pronunciado en el % de EBPM supuestamente
 debido a fragmentación. Sin embargo, es evidente que los efectos de las
 10 especies tampón también desempeñan un papel en la estabilización frente a la
 formación de EBPM. La tendencia del % de EBPM dependiente del pH sugiere
 un refinado posterior de la formulación que pueda conseguir una mejora en la
 estabilidad.

ID	Formulación	% de EAPM inicial	% de EAPM después de 2 semanas a 40° C	% de EBPM inicial	% de EBPM después de 2 semanas a 40° C
A	Acetato Sódico 20 mM, pH 4,5	8,9	13,7	26,8	38,1
B	Acetato Sódico 20 mM, pH 5	9,4	22,6	26,1	33,8
C	Acetato Sódico 20 mM, pH 5,5	12,1	29,2	26,1	33,2
D	Histidina 20 mM, pH 5,5	16,9	26,0	25,3	29,7
E	Histidina 20 mM, pH 6	23,0	28,2	24,6	29,7
F	Histidina 20 mM, pH 6,5	18,0	14,8	25,5	38,6
G	Lactato Sódico 20 mM, pH 4,5	8,9	11,3	26,7	55,2
H	Malato Sódico 13 mM, pH 4,5	9,2	20,8	27,6	52,7

ID	Formulación	% de EAPM inicial	% de EAPM después de 2 semanas a 40° C	% de EBPM inicial	% de EBPM después de 2 semanas a 40° C
I	Malato Sódico 13 mM, pH 5	9,9	34,3	27,6	28,3
J	Citrato Sódico 10 mM, pH 5	7,8	24,3	36,5	47,5
K	Citrato Sódico 10 mM, pH 6,5	21,5	15,9	26,0	37,8
L	Succinato Sódico 13 mM, pH 6	16,8	13,3	26,2	42,1
N	Fosfato Sódico 10 mM, pH 6,5	22,2	12,9	25,3	45,3
P	Fosfato Sódico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5	19,3	15,4	25,7	40,0
Q	Fosfato Sódico 10 mM, pH 7	16,4	13,1	27,1	43,9
R	Acetato Sódico 7 mM, 7 mM Histidina, Malato Sódico 4 mM, pH 5	9,9	22,6	27,0	33,7
S	Citrato Sódico 5 mM, Fosfato Sódico 5 mM, pH 6,5	22,1	12,1	25,9	44,7

Tabla 21 Datos SEC de formulaciones de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Ejemplo 74 Estabilidad de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C frente a la agitación

Se prepararon formulaciones por intercambio de tampón y adición de excipiente con una concentración de proteína diana en el intervalo de 9-11 mg/ml. Las formulaciones preparadas se filtraron usando un filtro de 0,2 μ m y se envasaron en viales de vidrio. Se aplicó agitación usando un agitador orbital a una velocidad de 300 rpm. Las muestras se ensayaron en los puntos de tiempo indicados. Los resultados de la Tabla 22 demuestran que la presencia de polisorbato 80 ayuda a impedir la inestabilidad inducida por agitación.

Formulación	Aspecto inicial	Aspecto después de 24 h de agitación	Cambio en % de EAPM después de 24 h de agitación
Lactato Sódico 30 mM, dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, pH 4,8	Transparente	Líquido lechoso y precipitación	1,4
Lactato Sódico 30 mM, dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, polisorbato 800,5 mg/ml, pH 4,8	Transparente	Transparente con pocas partículas	0,1

Tabla 22 Datos de estabilidad de formulaciones frente a agitación por estrés

Ejemplo 75 Formulaciones liofilizadas de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C

Aunque pueden usarse formulaciones líquidas con los compuestos de la invención, las formulaciones liofilizadas pueden proporcionar mayor longevidad de estabilidad. El ejemplo 72 demostró el sorprendente resultado de que los compuestos de la invención eran más estables en acetato sódico. Sin embargo, el acetato sódico se sublima y, por consiguiente, es difícil de incorporar en un tampón liofilizado. Existe, por lo tanto, la necesidad de desarrollar un tampón alternativo para compuestos de la invención que proporcione estabilidad óptima a largo plazo en una formulación liofilizada.

Se prepararon formulaciones por intercambio de tampón y adición de excipiente con una concentración de proteína diana de aproximadamente 10 mg/ml salvo las formulaciones J y K que tenían una concentración diana de aproximadamente 20 mg/ml. Las formulaciones preparadas se filtraron usando un filtro de 0,2 μ m y se envasaron en viales de vidrio. Para preparar formulaciones liofilizadas, los viales se liofilizaron, se cerraron y se sellaron. En

los puntos de tiempo indicados, se extrajeron muestras y se ensayaron por diversos procedimientos analíticos incluyendo SEC e iCE. Las formulaciones líquidas también se evaluaron durante 2 semanas para evaluar la estabilidad.

Se evaluó el comportamiento de las formulaciones liofilizadas después del almacenamiento a temperatura elevada. La Tabla 23 muestra datos de SEC e iCE en los puntos de tiempo indicados. Las formulaciones liofilizadas se comportaron mejor incluso cuando se compararon con estrés a mayor temperatura. Entre las formulaciones liofilizadas, las formulaciones de lactato y acetato se comportaron relativamente mejor. Sin embargo, se sabe que el acetato experimenta sublimación cuando se liofiliza causando un desplazamiento del pH. De hecho, las formulaciones de acetato mostraron un aumento de 0,3-0,5 unidades de pH después de la liofilización. Por lo tanto, se llega a la conclusión de que la formulación de lactato liofilizada (formulación C) es apropiada para conseguir una estabilidad adecuada y proporciona suficiente protección frente a la formación de partículas, EAPM, EBPM y especies ácidas. Cuando se comparan con formulaciones presentadas en el Ejemplo 73, está claro que la formulación C (formada por lactato, dihidrato de trehalosa, PS20, EDTA, L-Met) ayuda a prevenir la inestabilidad del engarce y corte de proteínas (ocasionando estos dos acontecimientos la formación de EBPM), así como la agregación (formación de partículas y EAPM). Los Ejemplos 72 y 73 muestran que las formulaciones de h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂ solamente con lactato, a pesar de que éste sea superior a otros tampones tales como histidina, pueden no proporcionar una estabilidad adecuada para el uso deseado a largo plazo. La combinación de lactato con diversos tipos de estabilizadores tales como un azúcar o poliol que sirven como crioprotector y lioprotector (por

ejemplo, trehalosa, sacarosa, manitol), y un tensioactivo para la estabilidad de agitación (por ejemplo, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero) y un quelante (por ejemplo, EDTA, DTPA), y un antioxidante (por ejemplo, L-Metionina) proporciona una mejora sinérgica de la estabilidad. Las
 5 formulaciones de combinación mostradas en la Tabla 23 en las que el lactato se sustituye por malato, succinato o acetato, proporcionan una estabilidad superior cuando se comparan con las formulaciones solamente con tampón correspondientes. Por lo tanto, las combinaciones potencian claramente la estabilidad de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C.

10 **Ejemplo 76 Formulaciones liofilizadas de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C**

Se prepararon formulaciones por intercambio de tampón y adición de excipiente con una concentración de proteína diana que variaba entre las formulaciones. Las formulaciones preparadas se filtraron usando un filtro de 0,2 μ m y se envasaron en viales de vidrio. Para preparar formulaciones liofilizadas,
 15 los viales se liofilizaron, se cerraron y sellaron. En los puntos de tiempo indicados, las muestras ensayaron por diversos procedimientos analíticos incluyendo SEC e iCE. Adicionalmente, las formulaciones líquidas también se evaluaron durante 2 semanas para evaluar la tendencia a la estabilidad de las formulaciones líquidas. El contenido de agua de las formulaciones liofilizadas
 20 se ensayó después de la liofilización y fue inferior al 0,5%.

Las formulaciones liofilizadas se almacenaron a diversas condiciones de estrés de temperatura y la Tabla 24 muestra datos SEC, iCE y CGE (electroforesis capilar en gel) reducida en los puntos de tiempo indicados. CGE produce una estimación semicuantitativa de fragmentos de proteína. Las
 25 formulaciones liofilizadas mostraron mejor estabilidad cuando se compararon

con los homólogos líquidos. Las formulaciones liofilizadas de ácido láctico (lactato sódico) en presencia de excipientes estabilizantes (en presencia de un crioprotector/lioprotector) mostraron una buena estabilidad. Por lo tanto, se llega a la conclusión de que las formulaciones de ácido láctico liofilizadas son apropiadas para ensayar la estabilidad en almacenamiento a largo plazo. Entre las formulaciones de ácido láctico, se necesita un equilibrio de pH de las formulaciones para impedir la fragmentación excesiva debida a la inestabilidad del engarce y corte de la proteína. Por ejemplo, la formulación F, pH 4,5, en estado líquido, produce una fragmentación sustancial cuando se compara con otras formulaciones. Por último, cuando se comparan las formulaciones B y L, se observa que los estabilizadores (particularmente, EDTA y L-Metionina) minimizan las fragmentaciones, proporcionando un beneficio sustancial, especialmente para las formulaciones líquidas. Se espera que otras combinaciones de quelantes metálicos (por ejemplo, EDTA, DTPA) y antioxidantes (por ejemplo, L-Metionina, ácido ascórbico puro) sean beneficiosas para conseguir estabilidad.

También se ensayaron formulaciones seleccionadas con respecto a la bioactividad relativa para explorar si están correlacionadas con las degradaciones físicas y químicas observadas en los datos de la Tabla 24. La bioactividad se midió por un ensayo ELISA de unión a Células HEK-293 Indirecto de FGF-R/ β -Klotho y se expresó como % relativo con respecto al material de referencia. Los datos de bioactividad se presentan en la Tabla 25. Partir de los datos, parece ser que la degradación física y química están correlacionadas y las formulaciones que muestran una degradación significativa ensayadas mediante procedimientos analíticos (Tabla 24) también

mostraron una reducción significativa en la bioactividad. Estos datos proporcionan seguridad en cuanto a la estabilidad e integridad funcional proporcionada por los componentes de la formulación A.

Formulación ID	Bioactividad después de 2 semanas a 5º C	Bioactividad después de 2 semanas a 25º C	B Bioactividad después de 2 semanas a 40º C	Líquido/ Liofilizado
A	105	-	-	Liofilizado
B	-	107	64	Líquido
D	-	97	61	Líquido
F	-	98	49	Líquido

- 5 **Tabla 25** Datos de bioactividad (% relativo) de formulaciones Liofilizadas y Líquidas seleccionadas de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C indicadas en la Tabla 24

Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona una formulación que comprende entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 200 mg/ml de conjugado de FGF21 y una concentración entre
10 aproximadamente 1 y 150 mM de ácido láctico o acetato sódico, con pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5,5; y al menos uno de los siguientes:

- (i) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 mg/ml de crioprotector;
- (ii) entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1,0 mg/ml de
15 quelante;
- (iii) entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/ml de antioxidante;
- (iv) entre aproximadamente 0,02-2,0 mg/ml de tensioactivo.

En algunos aspectos, las formulaciones de la invención comprenden dos

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

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

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

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

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

mg/ml.

En algunos aspectos, el conjugado de FGF21 es un compuesto de la invención como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el conjugado de FGF21 es Ab-L1-FGF21 Δ H-H125C o Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C.

- 5 En algunos aspectos, el conjugado de FGF21 es la especie específica h38C2- (SEC ID N°: 10-L1)₂. En algunos aspectos, el conjugado de FGF21 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml. En algunos aspectos, el conjugado de FGF21 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y
- 10 aproximadamente 100 mg/ml. El conjugado de FGF21 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml. El conjugado de FGF21 está presente en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml.

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

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

mg/ml.

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

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

- (i) aproximadamente 10 mg/ml de h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂;
- (ii) una concentración de aproximadamente 30 mM de ácido láctico, pH 4,8 $\pm$ 0,5;
- (iii) aproximadamente 90 mg/ml de dihidrato de trehalosa;
- (iv) aproximadamente 0,05 mg/ml de dihidrato de EDTA disódico;
- (v) aproximadamente 0,1 mg/ml de L-metionina; y
- (vi) aproximadamente 0,2 mg/ml de polisorbato 20.

Salvo que se indique otra cosa, cuando se usa la expresión “Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C” en el contexto de los ejemplos específicos, se refiere al anticuerpo h38C2 (SEC ID N°: 25 y 26), estando cada brazo del anticuerpo unido covalentemente mediante K⁹⁹ de la SEC ID N°: 26 al engarce-1(L1) y estando conjugada cada molécula de L1 covalentemente con el grupo tiol de la Cys¹²⁹ en la SEC ID N°: 10 (de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1). El compuesto también puede describirse como Ab-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂, h38C2-(FGF21 Δ H-A129C-L1)₂ y h38C2-(SEC ID N°: 10-L1)₂. Será evidente

que son posibles modificaciones minoritarias de la secuencia del anticuerpo, el engarce específico y la molécula de FGF21.

Por lo tanto, la invención se ha descrito e ilustrado ampliamente con referencia a realizaciones representativas descritas anteriormente. Los
5 expertos en la materia reconocerán que pueden realizarse diversas modificaciones en la presente invención sin alejarse del espíritu y alcance de la misma. Todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes expedidas se incorporan en el presente documento por referencia en el mismo grado que si se indicara específica e individualmente que se incorpora por referencia en
10 su totalidad cada publicación, solicitud de patente o patente publicada individual. Las definiciones contenidas en los textos incorporados por referencia se excluyen en la medida en que pueden contradecir las definiciones en esta descripción.

Se aprecia que algunas características de la invención, que, por claridad,
15 se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

20 Se contempla específicamente que cualquier limitación analizada con respecto a una realización de la invención puede aplicarse a cualquier otra realización de la invención. Adicionalmente, cualquier composición de la invención puede usarse en cualquier procedimiento de la invención y cualquier procedimiento de la invención puede usarse para producir o utilizar cualquier
25 composición de la invención. En particular, cualquier aspecto de la invención

descrito en las reivindicaciones, en solitario o en combinación con una o más reivindicaciones y/o aspectos adicionales de la descripción, debe considerarse combinable con otros aspectos de la invención expuestos en cualquier parte de las reivindicaciones y/o descripción.

5 El uso de la expresión “o” en las reivindicaciones se usa para dar a entender “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalde una definición que se refiera solamente a alternativas e “y/o”.

10 Como se usa en el presente documento, la especificación “un” o “una” puede significar uno (una) o más, salvo que se indique claramente otra cosa. Como se usa en el presente documento en la reivindicación (reivindicaciones), cuando se usan junto con la palabra “que comprende”, las palabras “un” o “una” pueden significar uno (una) o más de uno (una). Como se usa en el presente
15 documento, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

 Las palabras “comprende/que comprende” y las palabras “que tiene/que incluye”, cuando se usan en el presente documento con referencia a la presente invención, se usan para especificar la presencia de características, números enteros, etapas o componentes indicados, pero no excluye la
20 presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos adicionales.

ID	Tampón	pH	Azúcar	Tensioactivo	EDTA mg/ml	L-Met mg/ml	% de EAPM al inicio (líquida)	% de EAPM después de 2 semanas a 25° C (líquida)	% de EAPM después de 9 semanas a 25° C (Liofilizada)	% de EAPM después de 4 semanas 40° C (Liofilizada)	% de Especies ácidas al inicio (Líquida)	% Especies ácidas después de 4 semanas a 40° C (Liofilizada)
A	Acetato 30 mM	4,5	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	0,5 mg/ml PS20	0,05	0,1	5,2	7,2	3,7	4,7	31,1	34,3
B	Succinato 20 mM	4,5	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	0,5 mg/ml PS20	0,05	0,1	5,9	25,2	4,0	4,9	31,8	40,2
C	Lactato 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	0,5 mg/ml PS20	0,05	0,1	5,2	7,8	3,7	4,7	31,8	32,0
D	Malato 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	0,5 mg/ml PS20	0,05	0,1	7,6	16,8	4,4	5,6	32,3	34,7
E	Malato 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 45 mg/ml	0,25 mg/ml PS20	0,025	0,05	7,8	15,7	4,9	7,4	32,1	34,0
F	Succinato 20 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 45 mg/ml	0,25 mg/ml PS20	0,025	0,05	6,6	23,5	4,3	5,7	31,3	38,2
G	Malato 30 mM NaCl 50 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 60 mg/ml	PS20 0,25 mg/ml	0,05	0,1	9,7	16,7	5,0	6,9	31,9	33,1

ID	Tampón	pH	Azúcar	Tensioactivo	EDTA mg/ml	L-Met mg/ml	% de EAPM al inicio (líquida)	% de EAPM después de 2 semanas a 25° C (líquida)	% de EAPM después de 9 semanas a 25° C (Liofilizada)	% de EAPM después de 4 semanas 40° C (Liofilizada)	% de Especies ácidas al inicio (Líquida)	% Especies ácidas después de 4 semanas a 40° C (Liofilizada)
H	Malato 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	Poloxámero 188 0,4 mg/ml	0,05	0,1	7,9	17,8	4,7	5,8	31,5	34,4
I	Malato 30 mM KCl 50 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 60 mg/m, manitol 20 mg/ml	PS20 0,25 mg/ml	0,025	0,05	9,5	15,6	5,1	6,7	32,9	34,5
J 20 mg/ml	Acetato 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	PS20 0,5 mg/ml	0,05	0,1	6,7	13,1	4,5	4,8	32,4	32,8
K 20 mg/ml	Succinato 20 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	PS20 0,5 mg/ml	0,05	0,1	8,1	16,7	5,0	5,8	32,0	35,9
L	Acetato 30 mM	5	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	PS200,5 mg/ml	0,05	0,1	6,4	7,8	4,5	4,8	32,2	31,9
M	Succinato 20 mM	5	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml	PS20 0,5 mg/ml	0,05	0,1	7,1	19,2	4,6	4,9	31,4	36,2

Tabla 23 Formulaciones Liofilizadas y Líquidas de Ab-L1-FGF21ΔH-A129C

ID	Concentración de proteína mg/ml	Tampón	pH	Excipientes	Liq/ Lio	% de EBPM al inicio	% de EBPM después de 2 semanas a 40° C	% de EBPM después de 8 semanas a 25° C	% de EBPM después de 4 semanas a 40° C	% de Especies ácidas al inicio	% de Especies ácidas después de 4 sem. a 40° C	% de Frag. al inicio	% de Frag después de 2 semanas a 40° C
A	10	Ácido Láctico 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, EDTA 0,05 mg/ml L-Metionina, 0,1 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Lio	5,5	5,4	5,5	5,2	38,1	40,4	2,1	2,0
B	10	Ácido Láctico 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, EDTA 0,05 mg/ml L-Metionina, 0,1 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Liq	5,5	14,1	8,7	-	38,2	-	1,7	1,4
C	10	Ácido Láctico 30 mM	5,1	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, EDTA 0,05 mg/ml L-Metionina, 0,1 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Lio	5,8	5,6	5,9	5,1	38,5	40,4	1,7	2,2

ID	Concentración de proteína mg/ml	Tampón	pH	Excipientes	Liq/ Lio	% de EBPM al inicio	% de EBPM después de 2 semanas a 40° C	% de EBPM después de 8 semanas a 25° C	% de EBPM después de 4 semanas a 40° C	% de Especies ácidas al inicio	% de Especies ácidas después de 4 sem. a 40° C	% de Frag. al inicio	% de Frag después de 2 semanas a 40° C
D	10	Ácido Láctico 30 mM	5,1	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, EDTA 0,05 mg/ml L-Metionina, 0,1 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Liq	5,8	16	9,3	-	39,1	-	1,7	1,3
E	10	Ácido Láctico 30 mM	4,5	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, EDTA 0,05 mg/m, L-Metionina 0,1 mg/ml, PS20 0,5 mg/m	Lio	5,5	5,4	5,3	5,1	38,9	40,3	2,0	0,8d
F	10	Ácido Láctico 30 mM	4,5	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, EDTA 0,05 mg/m, L-Metionina 0,1 mg/ml, PS20 0,5 mg/m	Liq	5,5	13,5	8,7	-	39,1	-	1,7	12,4

ID	Concentración de proteína mg/ml	Tampón	pH	Excipientes	Liq/ Lio	% de EBPM al inicio	% de EBPM después de 2 semanas a 40° C	% de EBPM después de 8 semanas a 25° C	% de EBPM después de 4 semanas a 40° C	% de Especies ácidas al inicio	% de Especies ácidas después de 4 sem. a 40° C	% de Frag. al inicio	% de Frag después de 2 semanas a 40° C
G	10	Acido Láctico 15 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 45 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Lio	5,4	5,5	5,3	6,4	38,6	40	1,7	2,2
H	20	Acido Láctico 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Liq	5,8	5,5	5,6	5,4	38,5	39,5	2,0	2,0
J	40	Acido Láctico 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Lio	7,3	6,4	5,7	6,2	40,4	39,3	1,7	2,2
K	10	Acido Láctico 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Lio	5,4	5,2	5,2	5,1	40,2	40,3	2,0	2,1
L	10	Acido Láctico 30 mM	4,8	dihidrato de trehalosa 90 mg/ml, PS20 0,5 mg/ml	Liq	5,4	13,5	nc	-	39,7	-	1,7	10,9

Tabla 24 Formulaciones liofilizadas y líquidas de Ab-L1-FGF21 Δ H-A129C (Liq=Líquida, Lio= liofilizada).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo o parte de unión a
 5 antígeno del mismo mediante un engarce.
2. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1, en la que el engarce está unido covalentemente a la molécula de FGF21 mediante la cadena lateral de un resto de unión a la posición de aminoácido 79,125 ó 129 de acuerdo con la numeración de la SEC ID Nº: 1.
- 10 3. Una composición como se reivindica en la reivindicación 2, en la que resto 129 es cisteína y el engarce está unido covalentemente al grupo tiol de cisteína 129.
4. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en la que el engarce comprende la fórmula X-Y-Z; en la que X es una cadena de
 15 conexión biológicamente compatible que incluye cualquier átomo seleccionado del grupo de consiste en C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br e I y puede comprender un polímero o copolímero de bloque y está unido covalentemente al resto de unión en la que el engarce es lineal, Y es un grupo de reconocimiento opcionalmente presente que comprende al menos una estructura en anillo; y Z es un resto de
 20 unión que comprende una unión covalente a una cadena lateral de aminoácidos en el sitio de combinación del anticuerpo.
5. Una composición como se reivindica la reivindicación 4, en la que Y tiene la estructura opcionalmente sustituida:



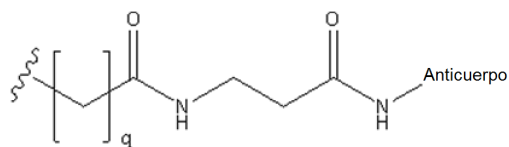
O



en la que a, b, c, d y e son independientemente carbono o nitrógeno; f es carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre.

6. Una composición como se reivindica en la reivindicación 5, en la que Y es fenilo.

- 5 7. Una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que Z tiene la fórmula:



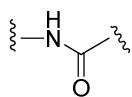
cuando se une covalentemente al anticuerpo, y $q = 1$ ó 2 .

8. Una composición como se reivindica en la reivindicación 7, en la que $q = 2$.

- 10 9. Una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en la que X es un grupo que comprende tres componentes; X_p - X_s - X_y , en la que X_p es un grupo específicamente adaptado para ser combinable con la cadena lateral del resto de unión de la proteína FGF21, X_s es una región espaciadora del grupo X e X_y es un grupo adaptado para unirse al grupo Y.

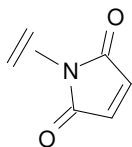
10. Una composición como se reivindica en la reivindicación 9, en la que X_y se seleccionan de un enlace amida, un enlace enamina o un enlace guanidinio.

11. Una composición como se reivindica en la reivindicación 10, en la que X_y tiene la fórmula:

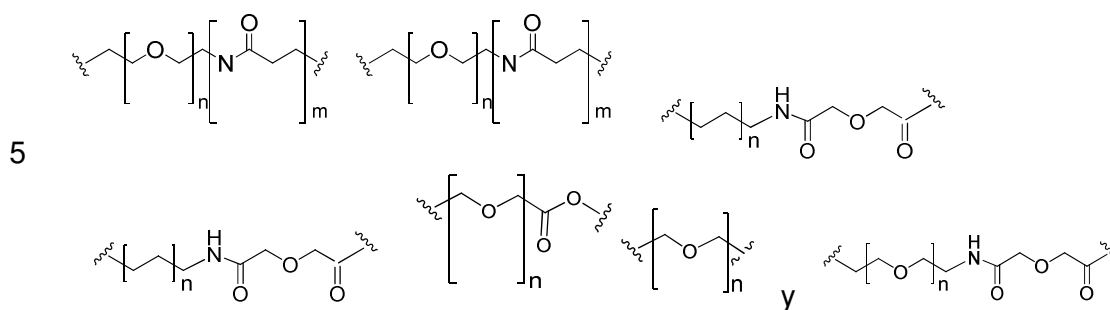


20

12. Una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en la que X_p comprende la fórmula:

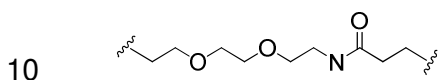


13. Una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, en la Xs se selecciona del grupo que consiste en

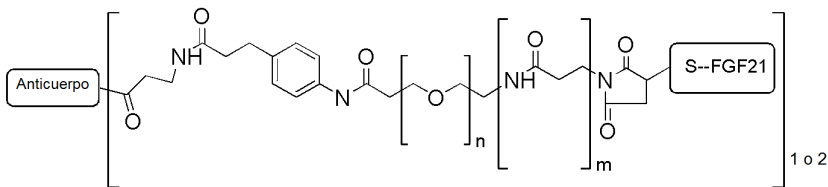


en la que $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ ó 10 y m está presente o ausente.

14. Una composición como se reivindica en la reivindicación 13, en la que Xs comprende la fórmula:



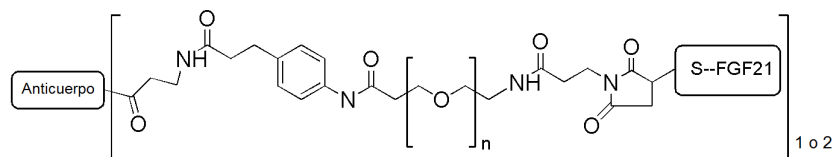
15. Una composición como se reivindica en la reivindicación 14, que comprende la fórmula:



15 en la que el anticuerpo es un enlace covalente con el sitio de combinación de un anticuerpo, S-FGF21 es el engarce covalente con una cadena lateral portadora de tiol del resto de unión, $n = 1$ ó $2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ ó 10 ; y m está

presente o ausente.

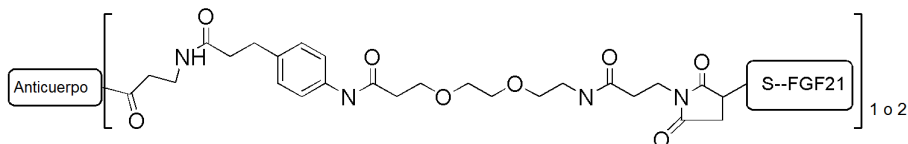
16. Una composición como se reivindica en la reivindicación 13 ó 14, que comprende la fórmula:



5 en la que el anticuerpo está unido covalentemente a su sitio de combinación, S-FGF21 es un enlace covalente con una cadena lateral portadora de tiol del resto de unión, $n = 1$ ó $2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ ó 10 .

17. Una composición como se reivindica en la reivindicación 15 ó 16, en la que $n = 1, 2, 3$ ó 4 .

10 18. Una composición como se reivindica en la reivindicación 17, que comprende la fórmula:



en la que el anticuerpo está unido al sitio de combinación del anticuerpo y S-FGF21 está unido a una cadena lateral portadora de tiol del resto de unión.

15 19. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en la que el engarce está conjugado covalentemente con el grupo ϵ -amino de lisina 93 de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la numeración de Kabat.

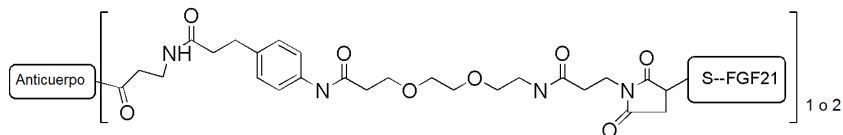
20 20. Un compuesto como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, dsF_v, scF_v, V_H, V_L, diacuerpo, minicuerpo que comprende los dominios V_H y V_L

de h38c2 o m38C2 o anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios V_H y V_L de h38c2 o m38C2 y un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y puede ser h38C2 IgG1.

21. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en
5 la que el anticuerpo es un anticuerpo aldolasa.
22. Una composición como se reivindica en la reivindicación 21, en la que el anticuerpo aldolasa comprende una región VL que comprende la SEC ID N°: 27.
23. Una composición como se reivindica en la reivindicación 22, en la que el
10 anticuerpo aldolasa comprende una región VH que comprende la SEC ID N°: 28.
24. Una composición como se reivindica en la reivindicación 23, en la que el anticuerpo aldolasa comprende una cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 25.
- 15 25. Una composición como se reivindica en la reivindicación 24, en la que el anticuerpo aldolasa comprende una cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 26.
26. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en la que la molécula de FGF21 comprende una secuencia seleccionada del grupo
20 que consiste en SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15 y SEC ID N°: 16.
27. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en la que la molécula de FGF21 comprende la secuencia de la SEC ID N°: 3.
- 25 28. Una composición como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en

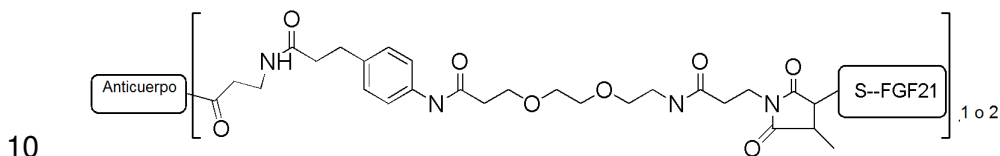
la que la molécula de FGF21 comprende la secuencia de la SEC ID N°: 10.

29. Una composición como se reivindica en la reivindicación 28, que comprende la fórmula:



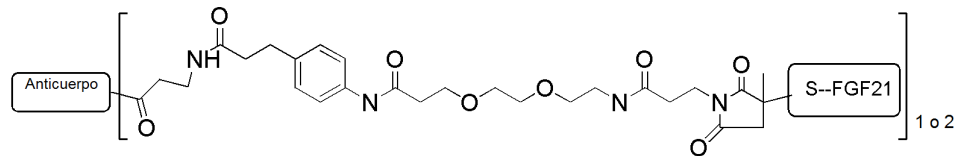
5 en la que el anticuerpo es el sitio de combinación de h38C2 y comprende la SEC ID N°: 25 y la SEC ID N°: 26 y S-FGF21 es la cadena lateral portadora de tiol de Cys129 de la SEC ID N°: 10.

30. Una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, que comprende la fórmula:



en la que el anticuerpo es el sitio de combinación de h38C2 y comprende la SEC ID N°: 25 y la SEC ID N°: 26 y S-FGF21 es la cadena lateral portadora de tiol de Cys125 de la SEC ID N°: 7.

15 31. Una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, que comprende la fórmula:



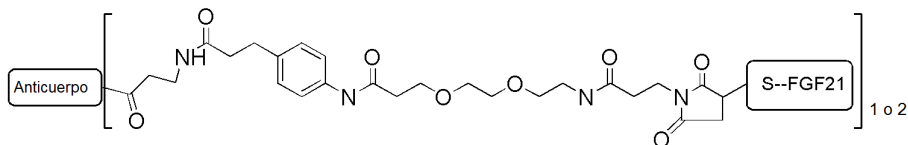
en la que el anticuerpo es el sitio de combinación de h38C2 y comprende la SEC ID N°: 25 y la SEC ID N°: 26 y S-FGF21 es la cadena lateral portadora de tiol de Cys79 de la SEC ID N°: 12.

32. Una composición que comprende una molécula de FGF21 conectada covalentemente a un resto que aumenta la semivida a un resto de unión localizado en el número de resto 79, 125 ó 129 de acuerdo con la numeración de la SEC ID N°: 1.

5 33. Una composición seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 13.

34. Una composición de comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo mediante un engarce, en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión dentro de FGF21 formando un complejo conjugado proteína-anticuerpo, de manera que el complejo conjugado proteína-anticuerpo tiene al menos una de las siguientes características:

(a) una semivida SC de al menos aproximadamente 30 h en modelos murinos,
15 (b) una fuerza de menos de aproximadamente 4 nM en un ensayo Glut1 Taqman y caracterizado por que el complejo conjugado proteína-anticuerpo tiene la fórmula:

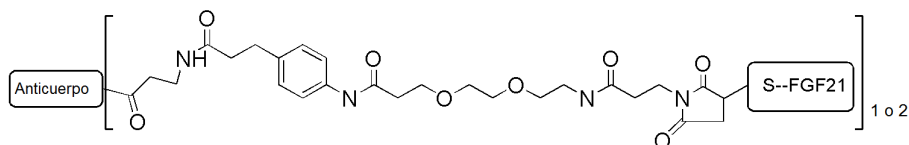


en la que el anticuerpo es el sitio de combinación de h38C2 y comprende la SEC ID N°: 25 y la SEC ID N°: 26 y S-FGF21 es la cadena lateral portadora de tiol de Cys 125 de la SEC ID N°: 7 o Cys129 de la SEC ID N°: 10.

35. Una composición de comprende una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo mediante un engarce,

en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto de unión dentro de FGF21 que forma un complejo conjugado proteína-anticuerpo, de manera que el complejo conjugado proteína-anticuerpo tiene al menos una de las siguientes características:

- 5 (a) una $T_{1/2}$ en plasma después de inyección SC de al menos aproximadamente 33 h en modelos murinos,
- (b) una $T_{1/2}$ en plasma después de inyección SC de al menos aproximadamente 35 h en modelos de rata,
- (c) una $T_{1/2}$ en plasma después de inyección SC de al menos aproximadamente
- 10 45 h en modelos de primates,
- (d) una fuerza de menos de aproximadamente 3 nM en un ensayo Glut1 Taqman y caracterizado por que el complejo conjugado proteína-anticuerpo tiene la siguiente fórmula:



- 15 en la que el anticuerpo es el sitio de combinación de h38C2 y comprende la SEC ID N°: 25 y la SEC ID N°: 26 y S-FGF21 es la cadena lateral portadora de tiol de Cys129 de la SEC ID N°: 10.

36. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se reivindica en cualquier
- 20 reivindicación anterior en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

37. Un procedimiento para el tratamiento de diabetes, afecciones relacionadas con diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatosteatois o

enfermedades cardiovasculares; o para controlar o reducir niveles de peso; o controlar el control glucémico; o aumentar la secreción de insulina, niveles de HDL o niveles de ácidos grasos libres no esterificados o adiposina; o reducir niveles de glucosa en sangre, glucagón, triglicéridos, fructosamina, colesterol de baja densidad o proteína C reactiva; que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-35 o una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 36.

38. El uso de una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-35 o una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 36 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de afecciones relacionadas con diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión, hepatosteatozosis o enfermedades cardiovasculares; o para controlar o reducir niveles de peso; o controlar el control glucémico; o aumentar la secreción de insulina, niveles de HDL o niveles de ácidos grasos libres no esterificados; o reducir niveles de glucosa en sangre, glucagón, triglicéridos, fructosamina, colesterol de baja densidad o proteína C reactiva.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente invención proporciona una molécula de FGF21 unida covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo mediante un engarce, en la que el engarce está unido covalentemente a la cadena lateral de un resto
5 de unión dentro de FGF21. Se proporcionan diversos usos de los compuestos, incluyendo procedimientos para prevenir o tratar la diabetes o afecciones relacionadas con la diabetes.

Figura 1
VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4 1
	12345678901234567890123	45678901abcde234	567890123456789	0123456	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567
m38c2	DVVMTQTPLSLPVRIGDQASISC	RSSQSLLHTYGSFYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYFC	SQGTHLPYT	EGGGTKLEIK
	*** * * **** * *				* * **** *		*
h38c2	ELQMTQSPSSSLASVGDRTITC	RSSQSLLHTYGSFYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFAVYFC	SQGTHLPYT	EGGGTKVEIK
	**	* ****	* **	** **		* * * **** *	
DPK-9	DIQMTQSPSSSLASVGDRTITC	RASQSISS----YLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFATYYC	QQSYSTP	
JK4						LT	EGGGTKVEIK
VH							
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	123456789012345678901234567890	1ab2345	67890123456789	012abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234	56789012	34567890123
m38c2	EVKLVESSGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTER	N--YWMS	WVRQSPKGLWVA	EIRLRSDNYATHYAESVKG	KFTISRDDSKSRLYLQMNSLRATEDTGIYYCKY	YFY-SFSY	WGQGTLLVTVSA
	* **** * * *		*		* * ** *		*
h38c2	EVQLVESSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	N--YWMS	WVRQSPKGLWVS	EIRLRSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTGIYYCKT	YFY-SFSY	WGQGTLLVTVSS
	*	* *	* *	* * * * * *		** **	* *
DP-47	EVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPKGLWVS	AISG--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		
JH4						YFDY	WGQGTLLVTVSS

Figura 2A

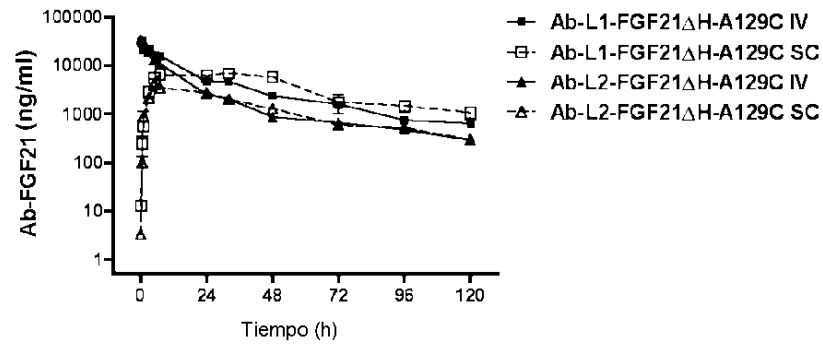


Figura 2B

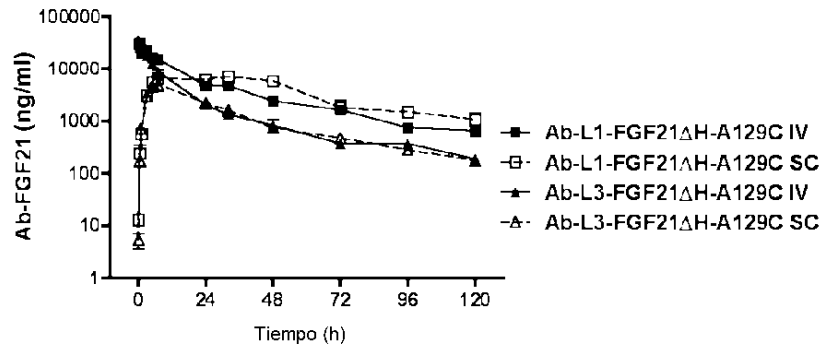


Figura 2C

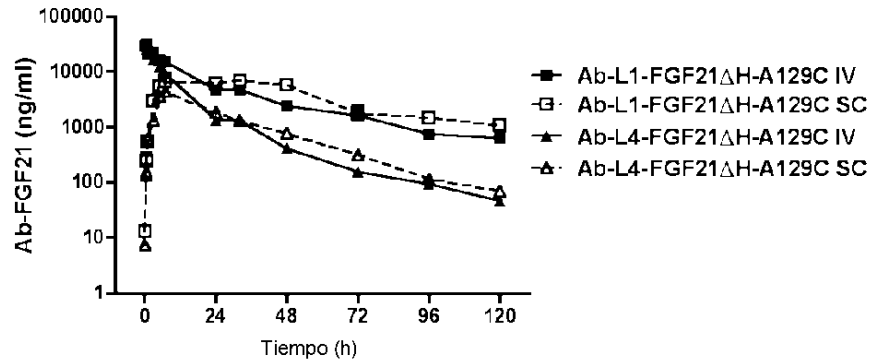


Figura 3A

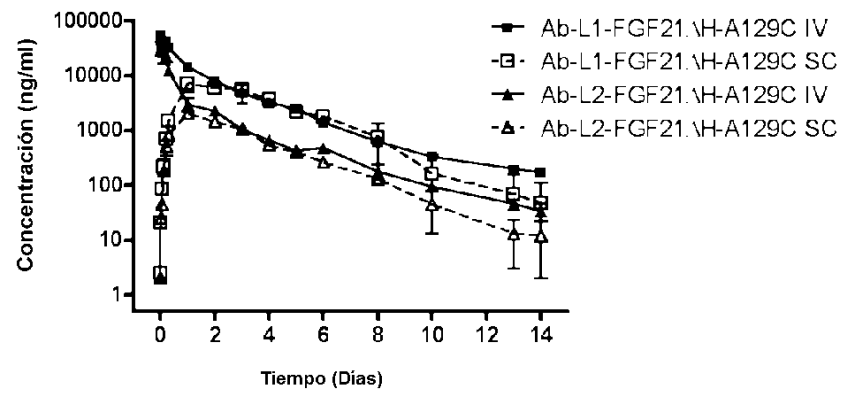


Figura 3B

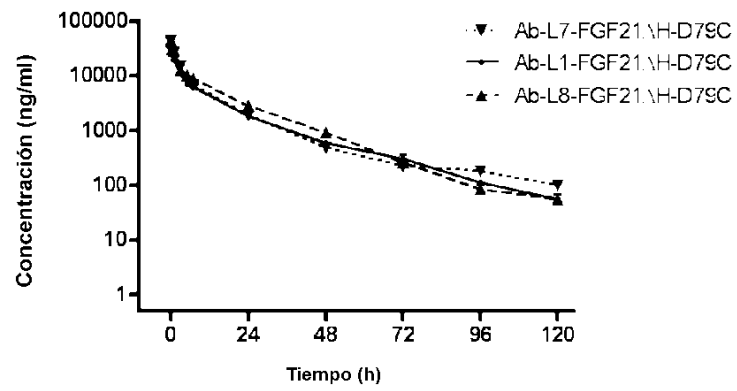


Figura 4A

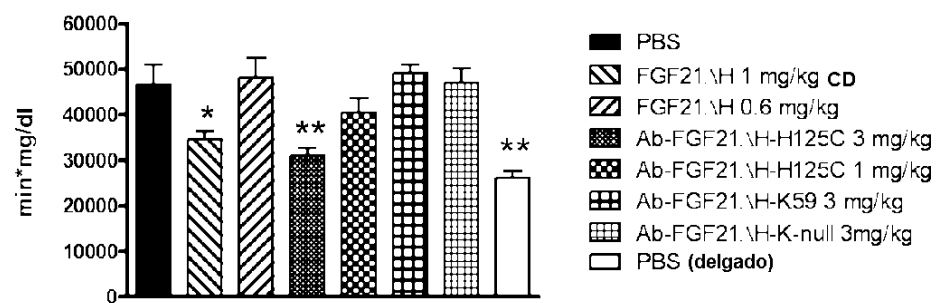


Figura 4B

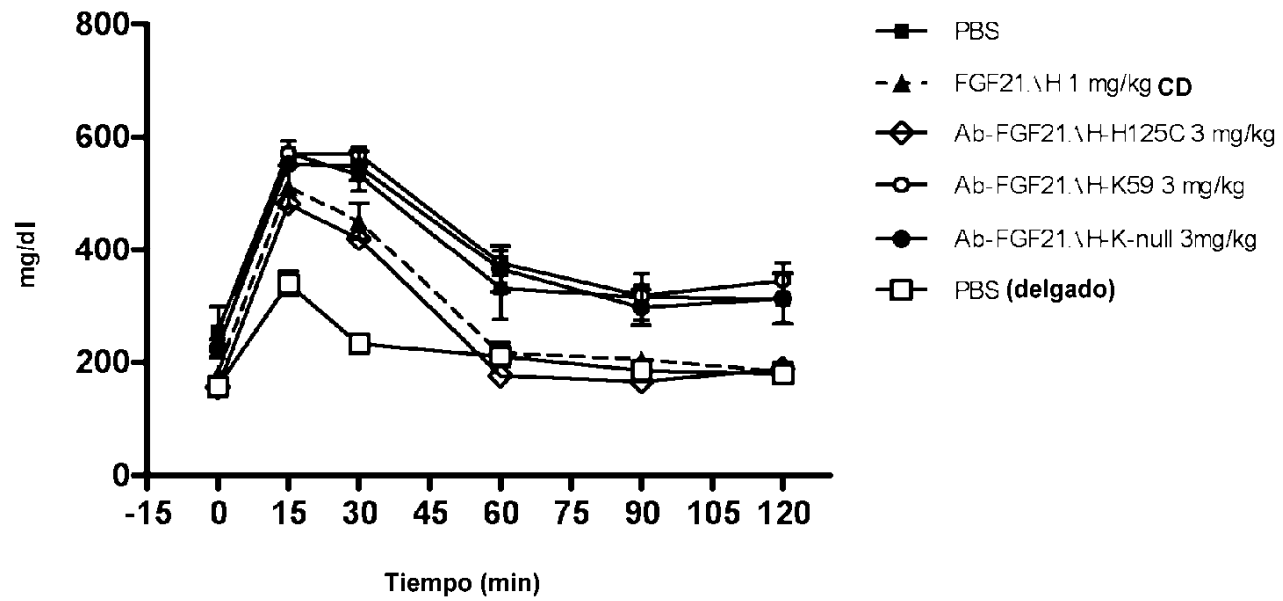


Figura 5A

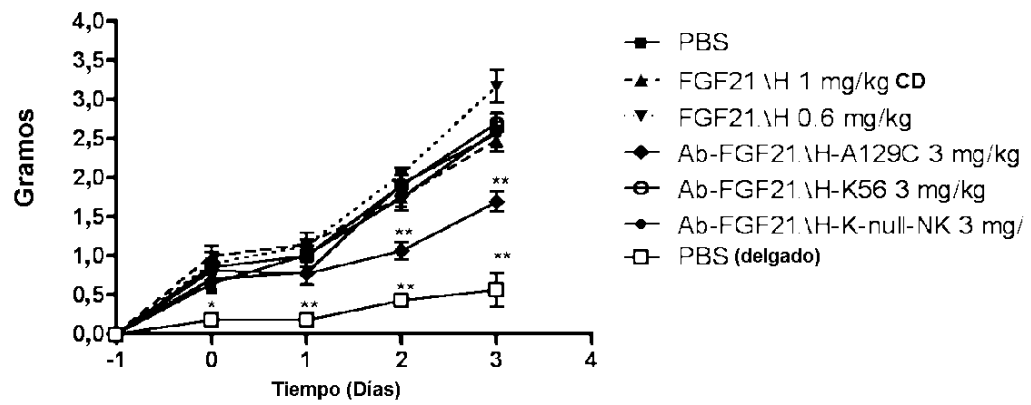


Figura 5B

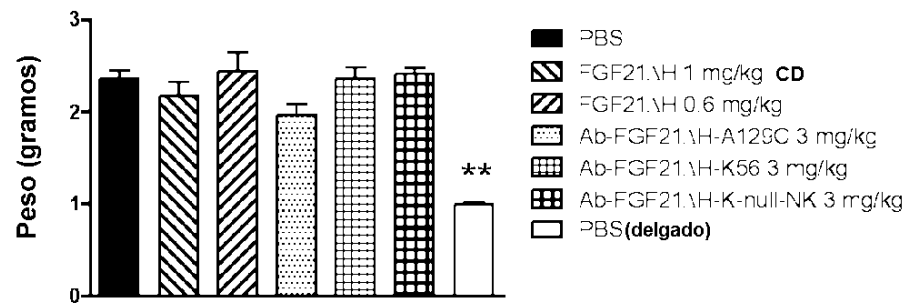


Figura 6A

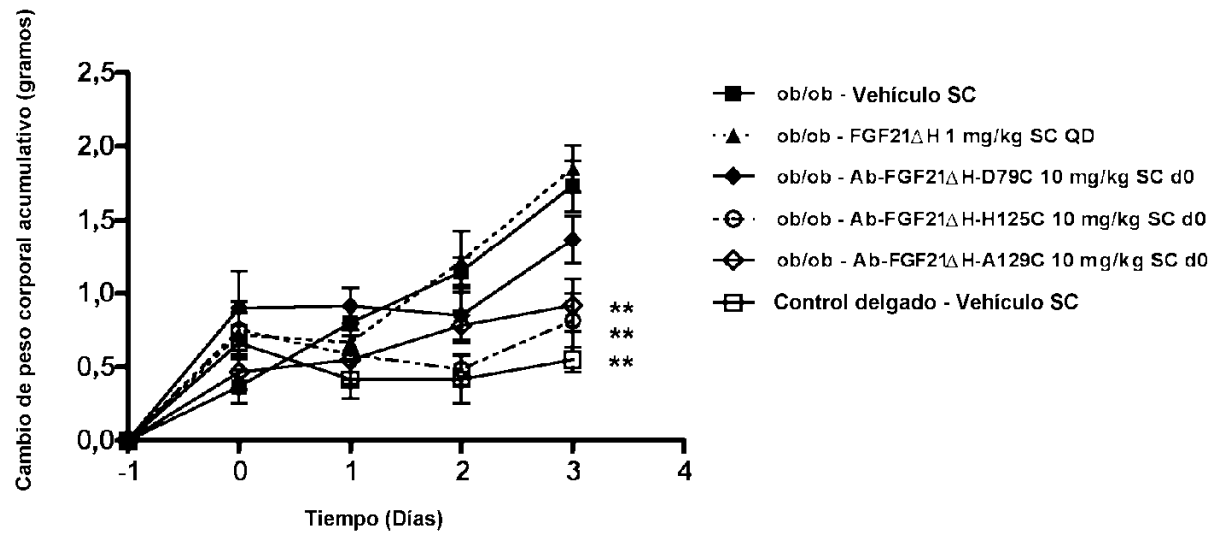


Figura 6B

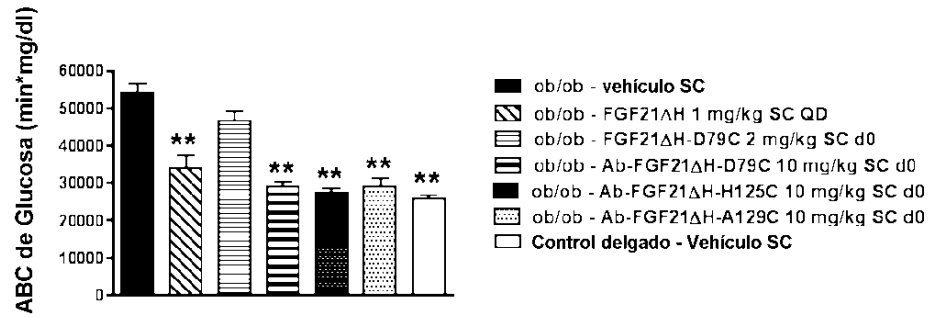


Figura 6C

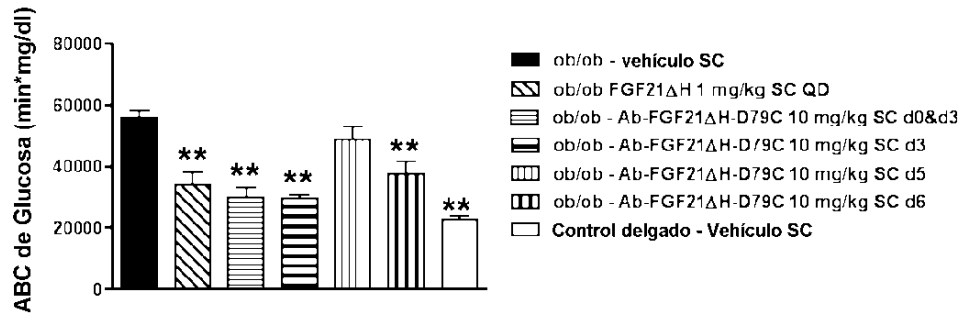


Figura 6D

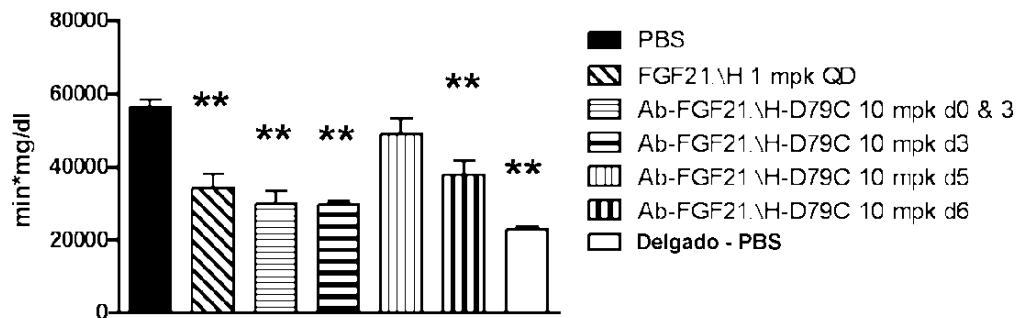


Figura 6E

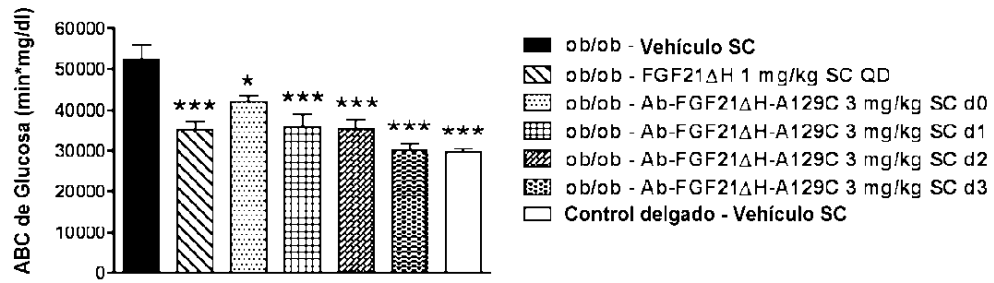


Figura 6F

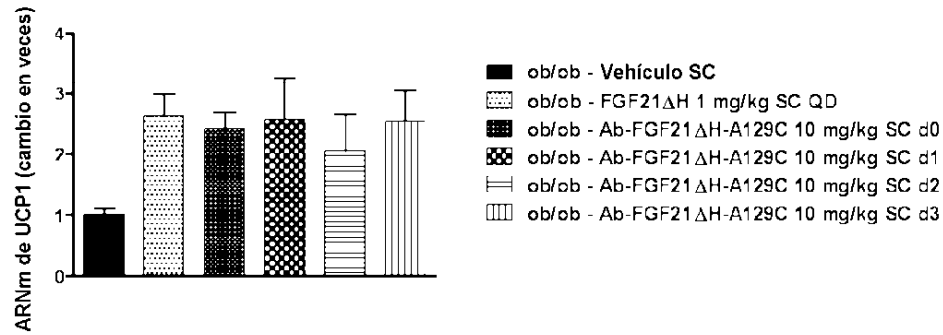


Figura 6G

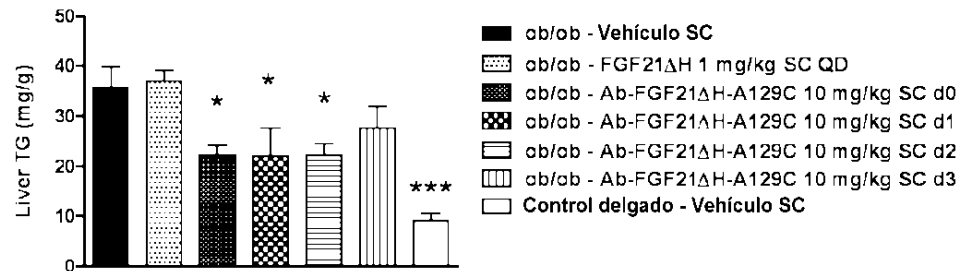


Figura 6H

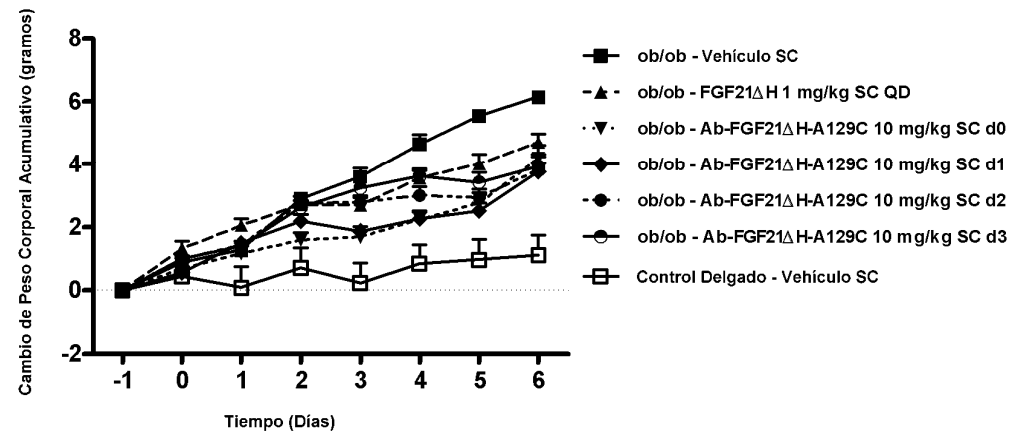


Figura 7A

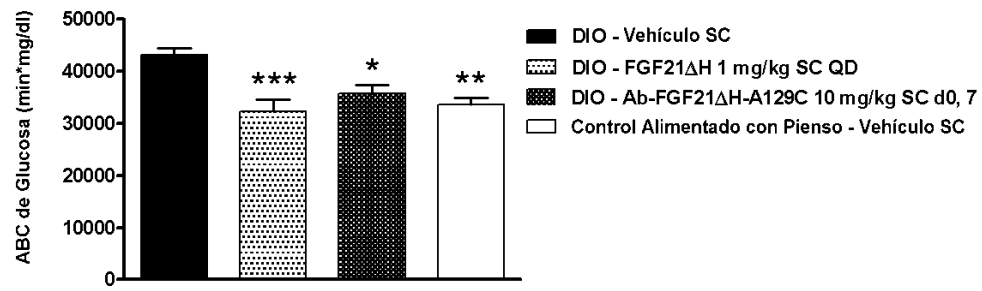


Figura 7B

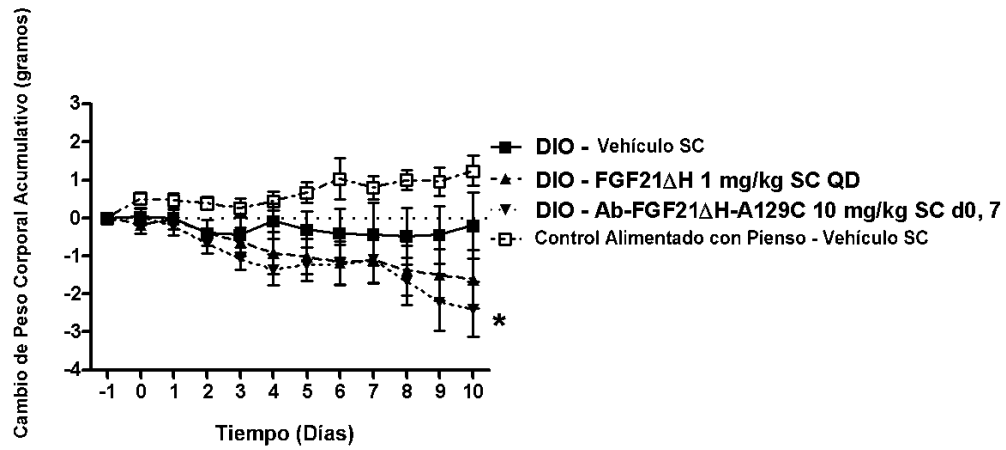


Figura 7C

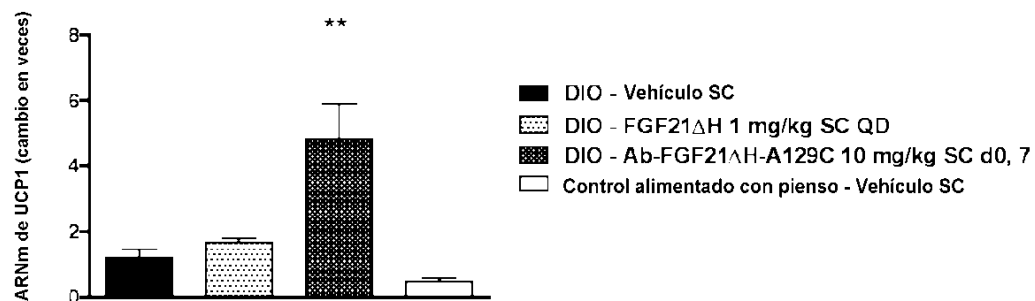


Figura 7D

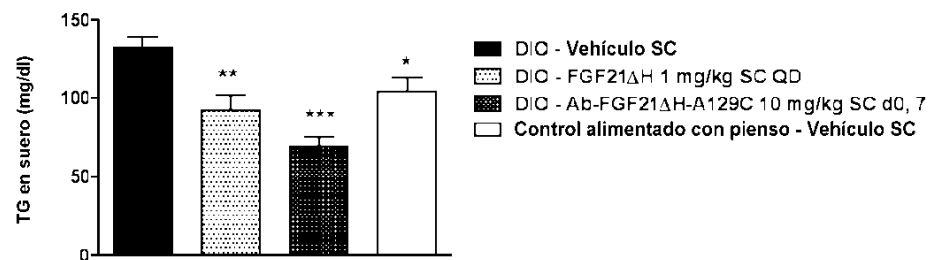


Figura 7E

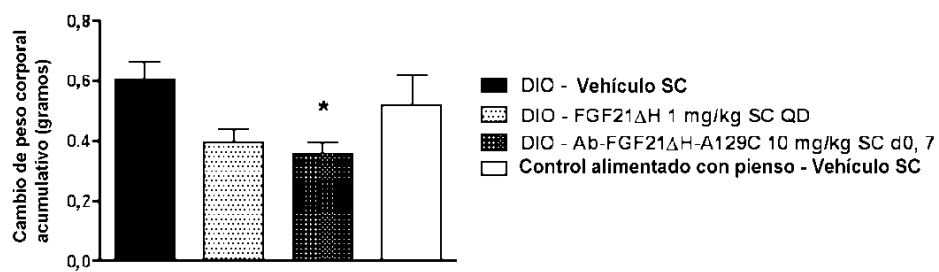


Figura 7F

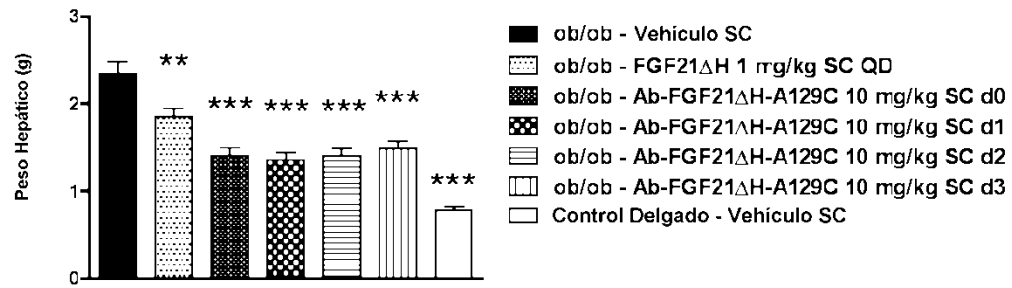


Figura 7G

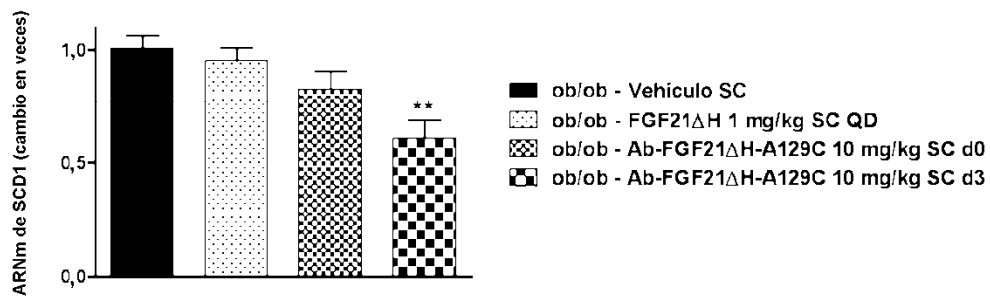


Figura 7H

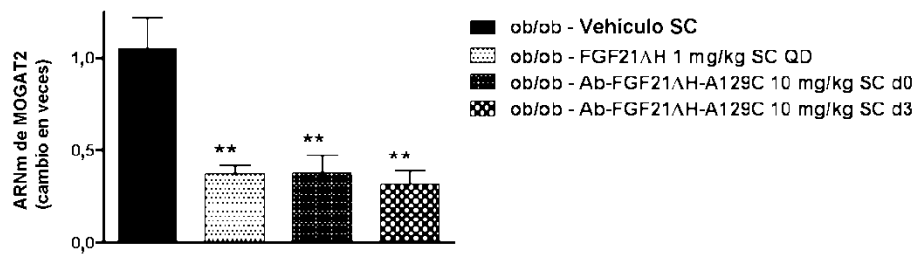


Figura 7I

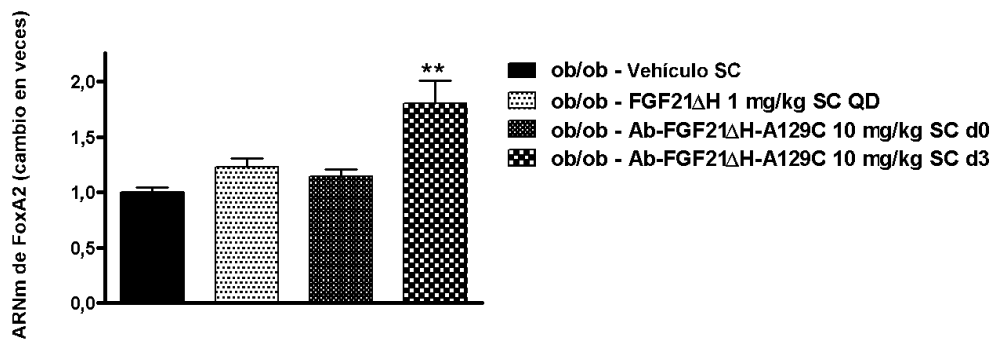


Figura 7J

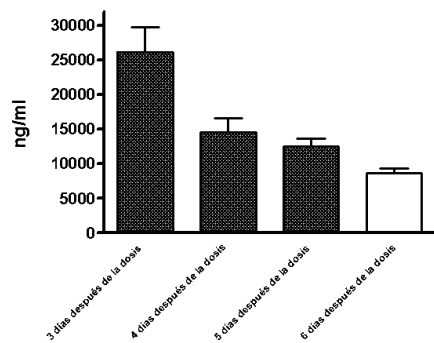


Figura 7K

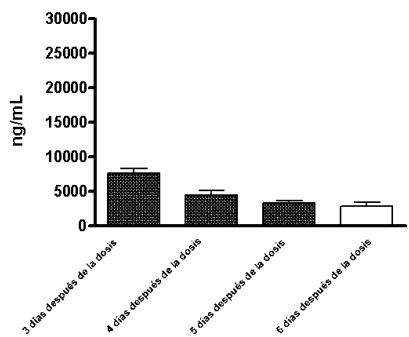


Figura 8A

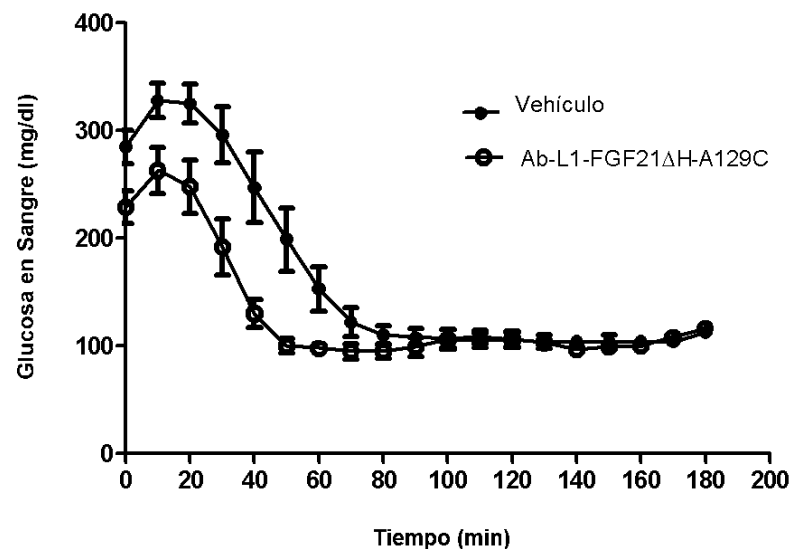


Figura 8B

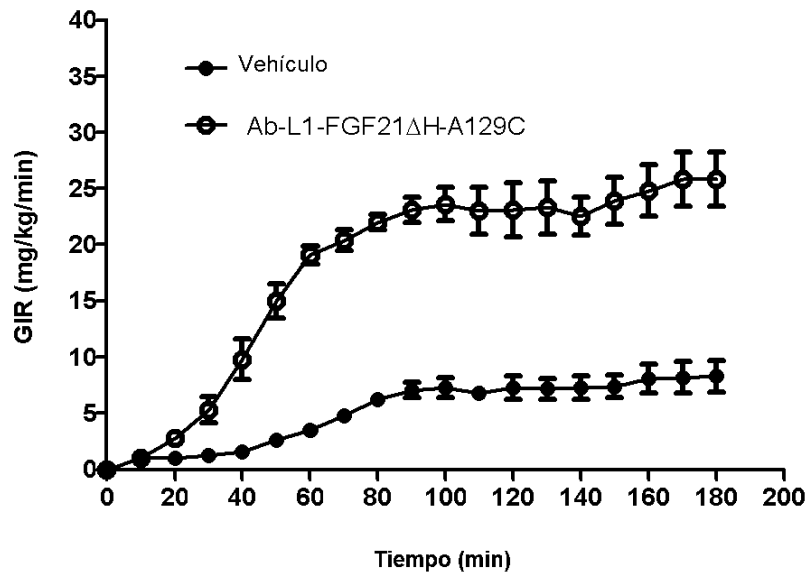


Figura 8C

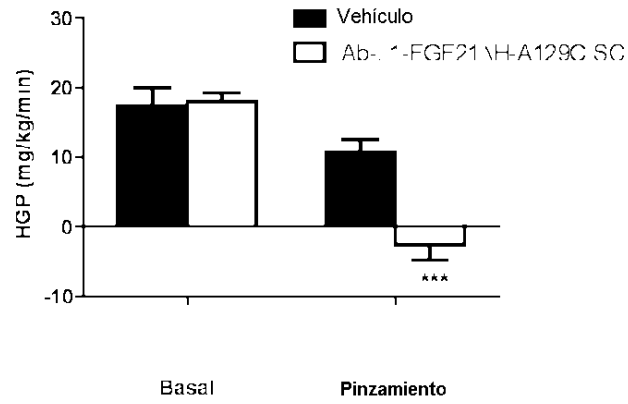


Figura 9A

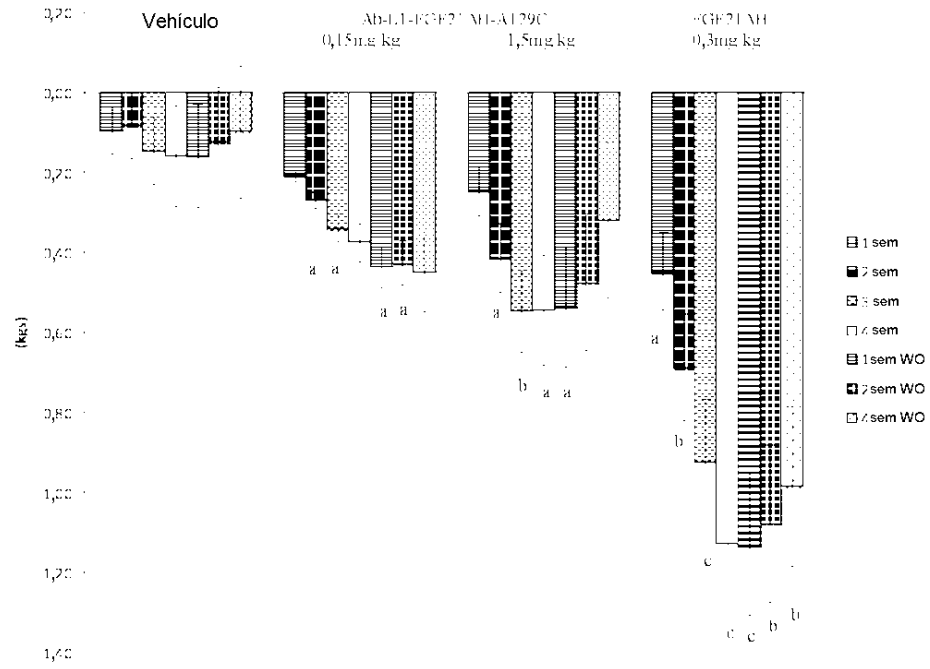


Figura 9B

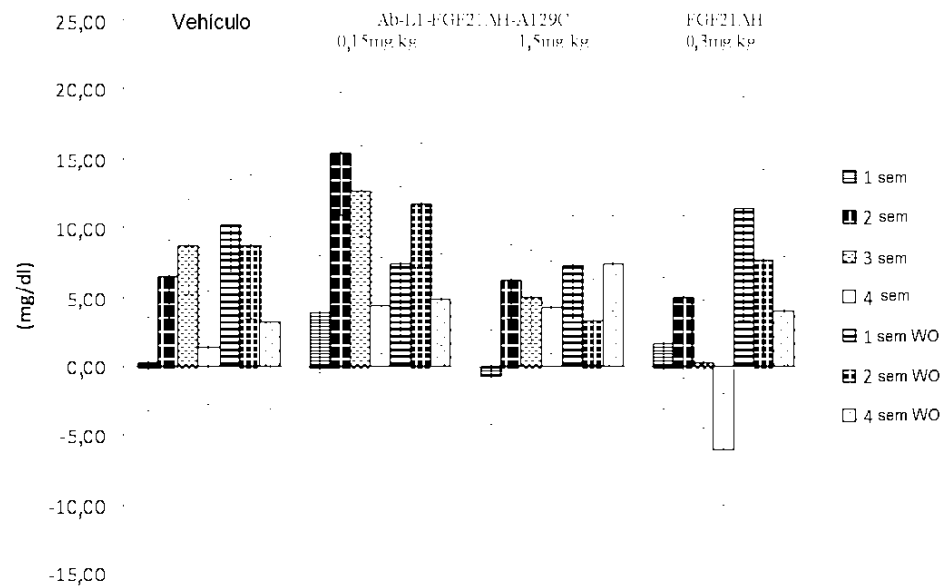


Figura 9C

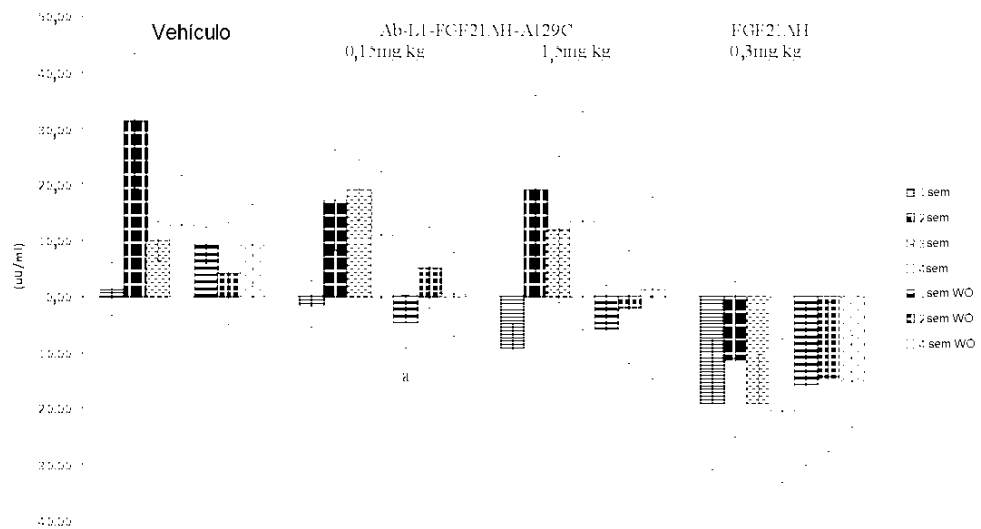


Figura 9D

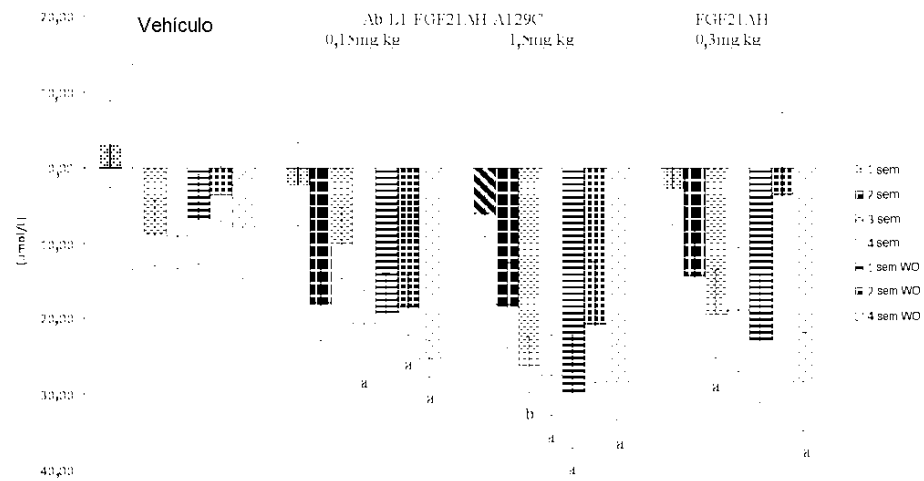


Figura 9E

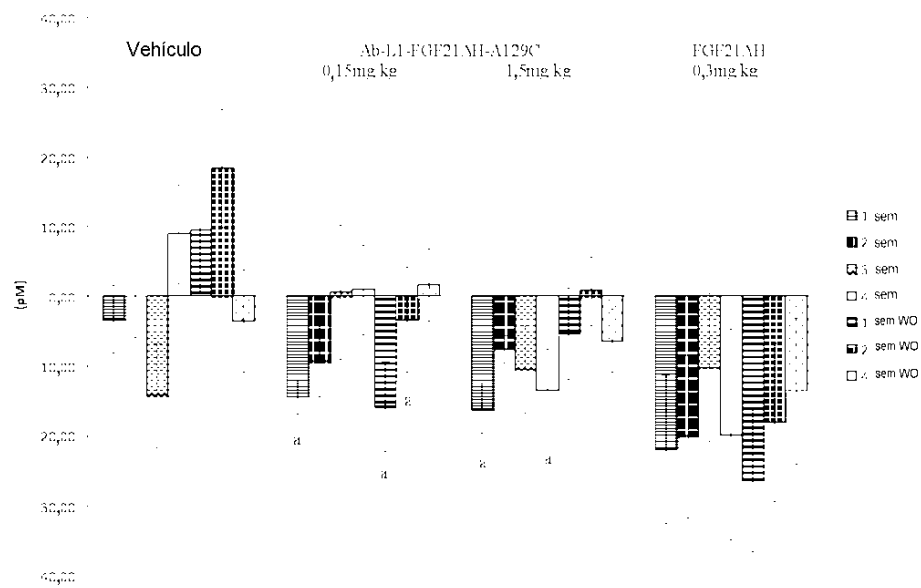


Figura 9F

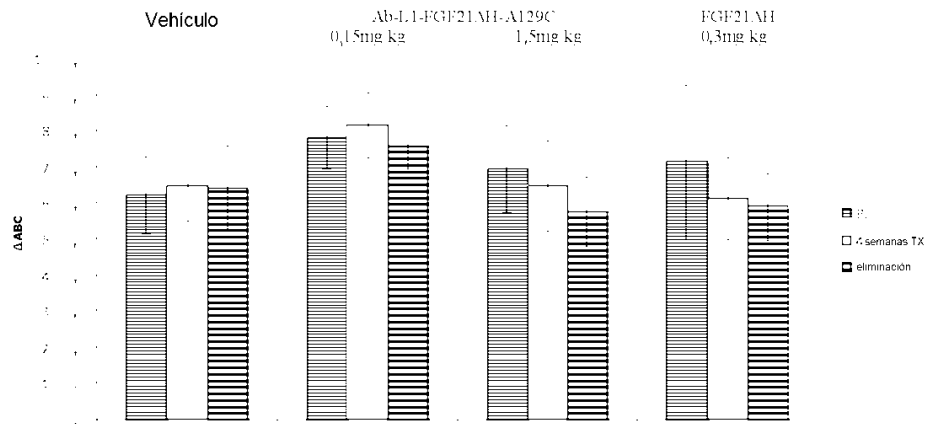


Figura 9G

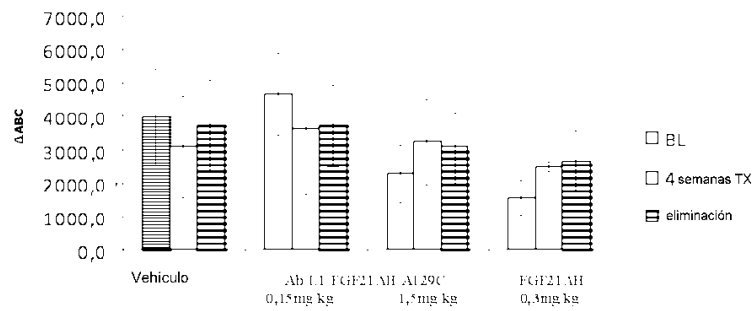


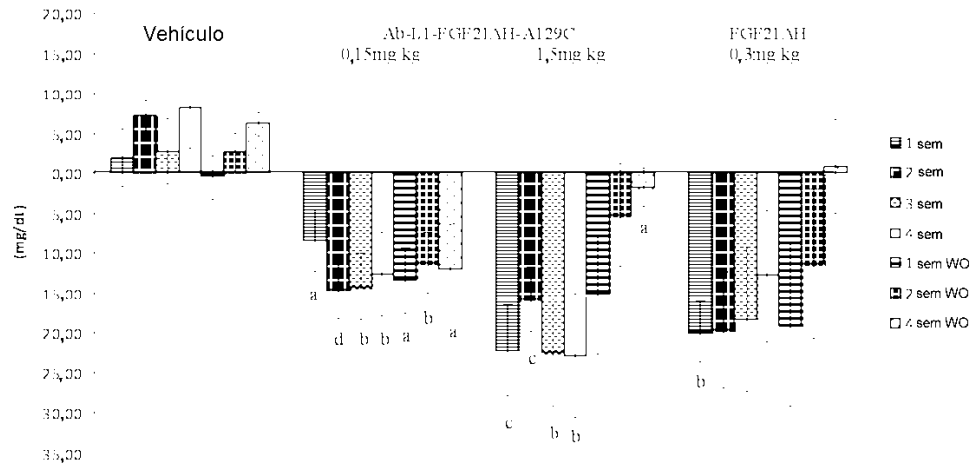
Figura 9H

Figura 9l

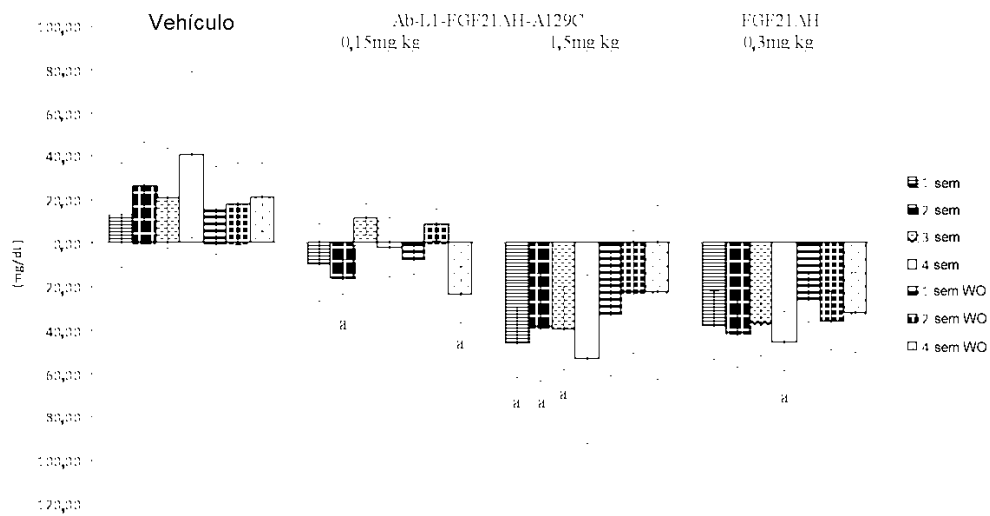


Figura 9J

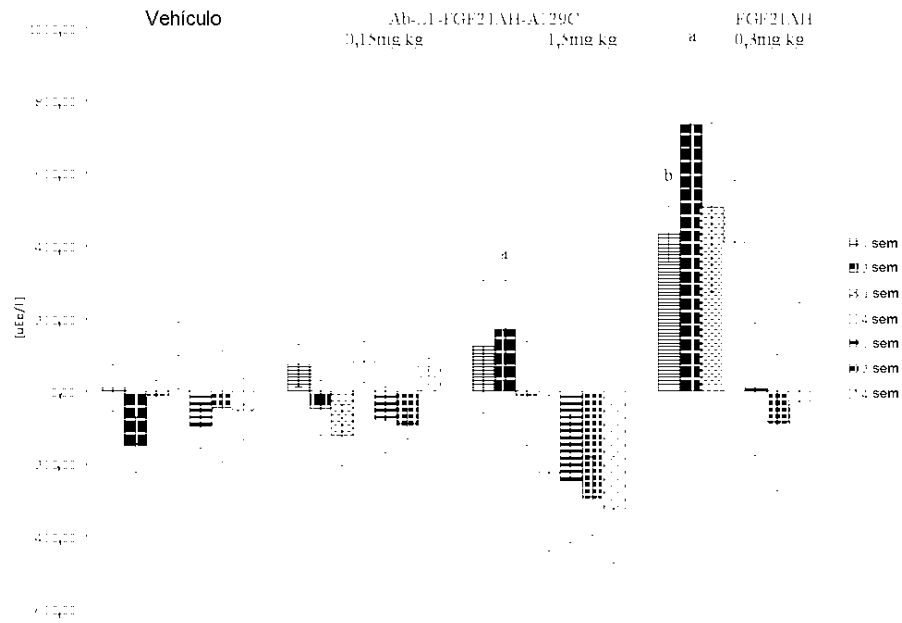


Figura 9K

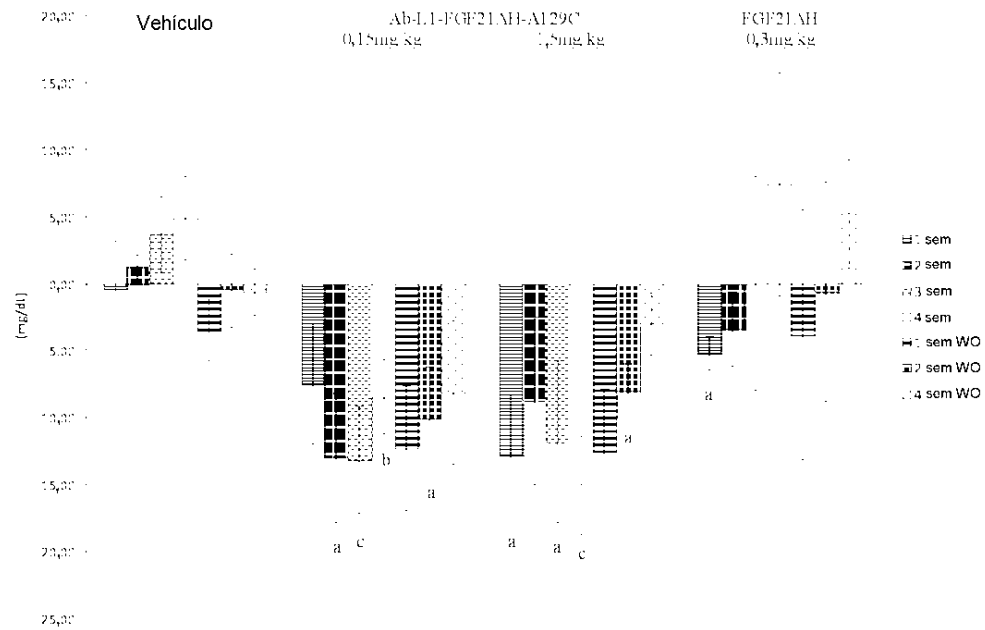


Figura 9L

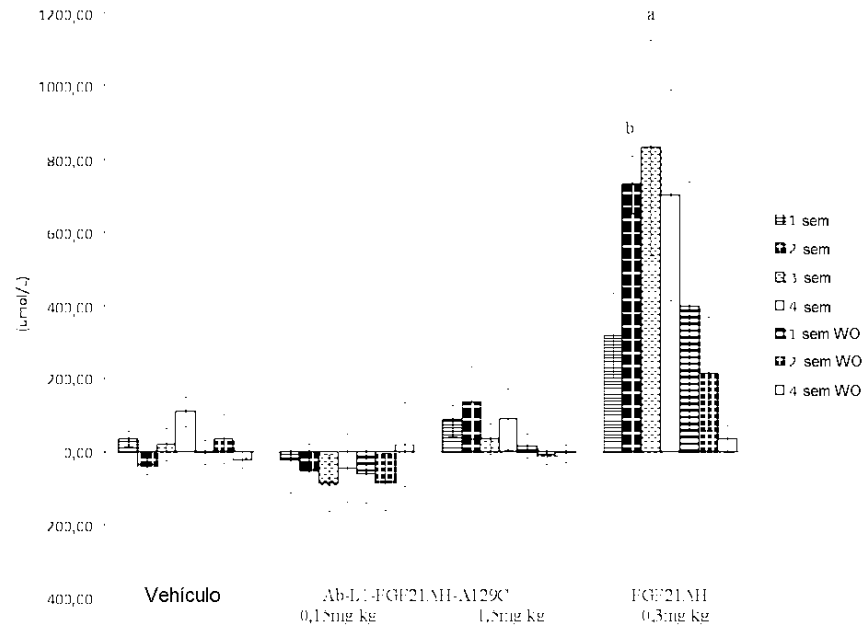


Figura 9M

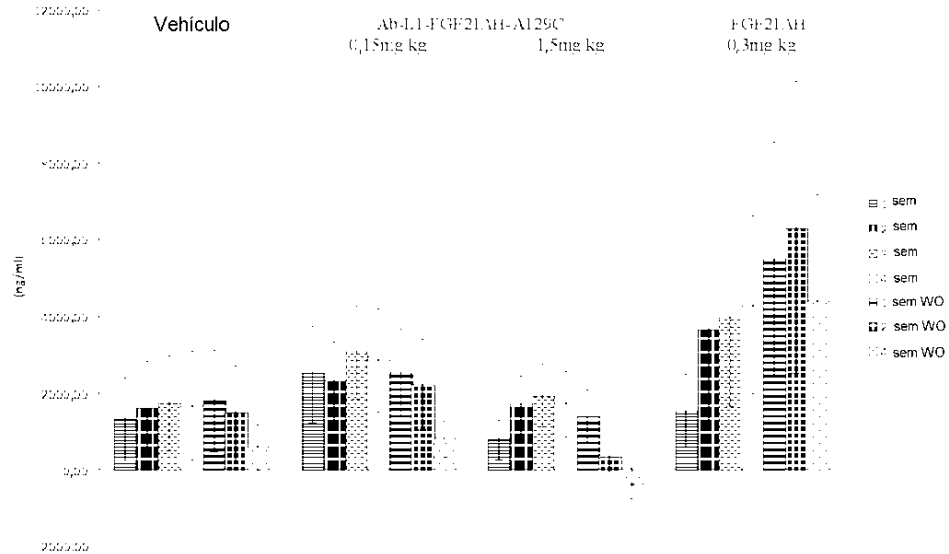


Figura 9N

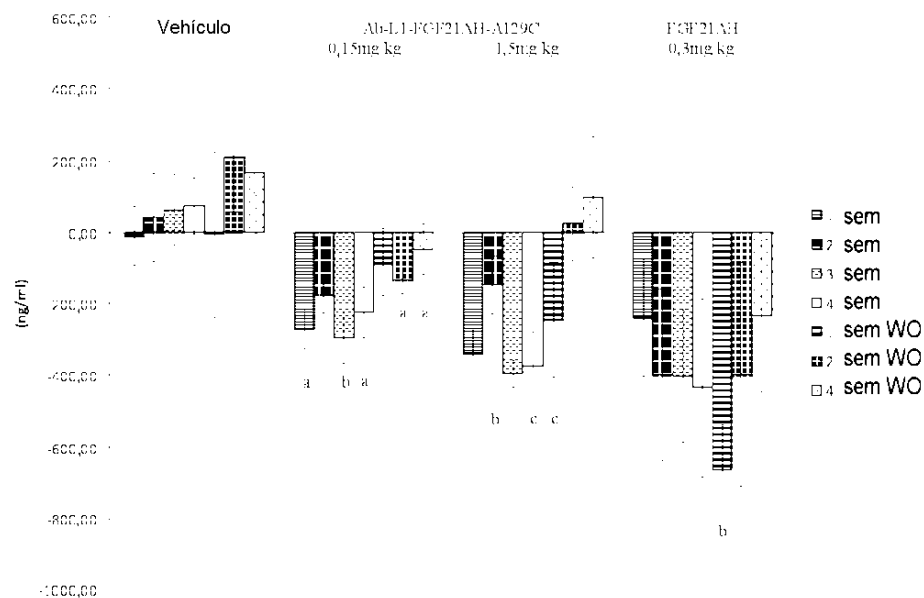


Figura 9O

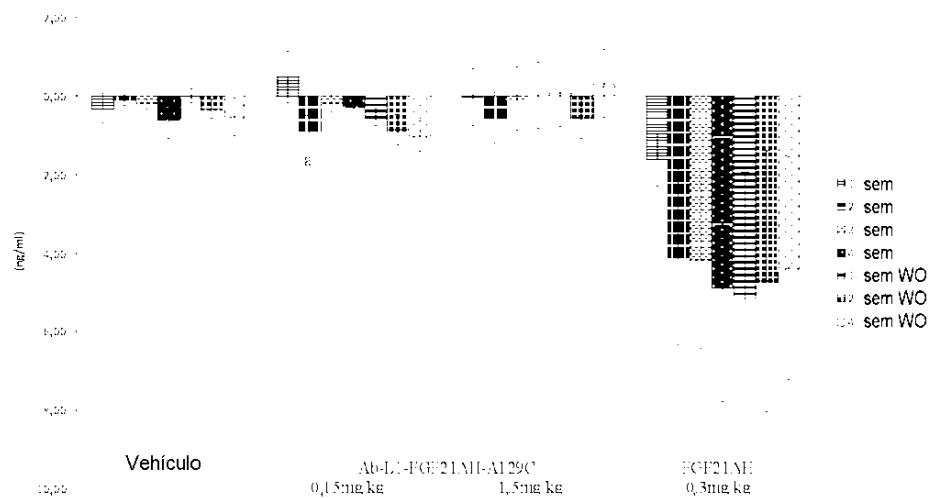


Figura 9P

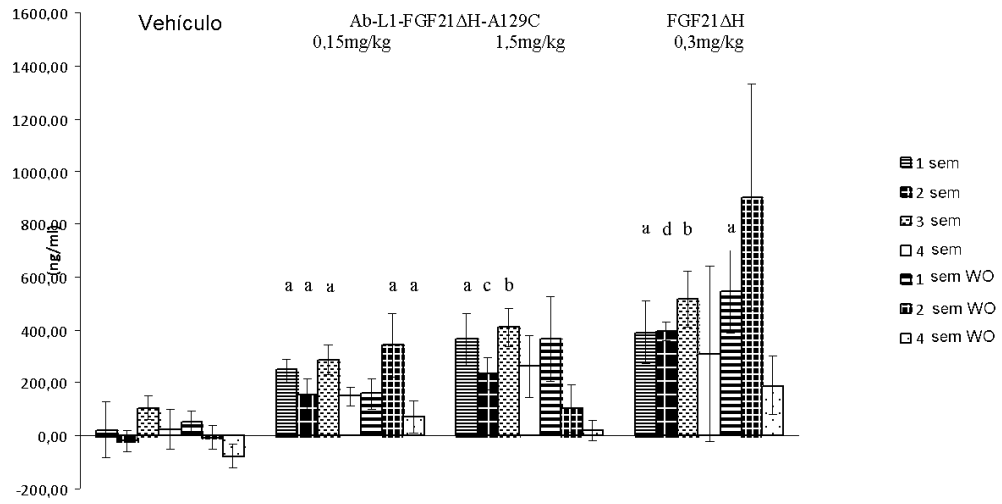


Figure 1
VL

	Fr1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
	12345678901234567890123	45678901abcde234	567890123456789	0123456	789012345678901234567890123456789012345678	901234567	8901234567			
m38c2	DVVMTQTPLSLPVRIGDQASISC	RSSQSLHLYGSPYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPSRFGSGSGTDFTLRISRV	AEADLG	VYFC	SQGTHLPYT	FGGGTKLEIK	
	*** * * **** * *				*		*	**** *		*
h38c2	ELQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RSSQSLHLYGSPYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPSRFGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFAVYFC		SQGTHLPYT	FGGGTKVEIK	
	**	*	*****	*	**	*** **		* *	* **** *	
DPK-9	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISS-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC		QQSYSTP		
JK4									LT	FGGGTKVEIK

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1
	123456789012345678901234567890	1ab2345	67890123456789	012abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234	56789012	34567890123				
m38c2	EVQLVESGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTFR	N--YWMS	WVRQSPEKGLEWVA	EIRLRSDNYATHYAESVKG	KFTISRDDSKSRLYLQMNSLR	TEDTGIYYCKY	YFY-SFSY	WGQGT	LVTVSA		
	*	*** ** *	*		*	*	**	*			*
h38c2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	N--YWMS	WVRQSPEKGLEWVS	EIRLRSDNYATHYAESVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT	GIYYCKT	YFY-SFSY	WGQGT	LVTVSS		
	*	*	*	*	*	*** ** *	** **	*	*		
DP-47	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISG--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT	AVYYCAK					
JH4									YFDY	WGQGT	LVTVSS

Figure 2A

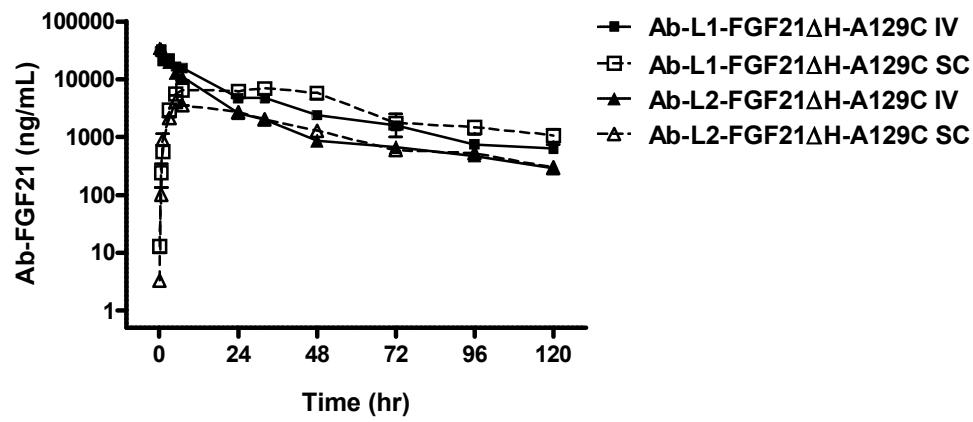


Figure 2B

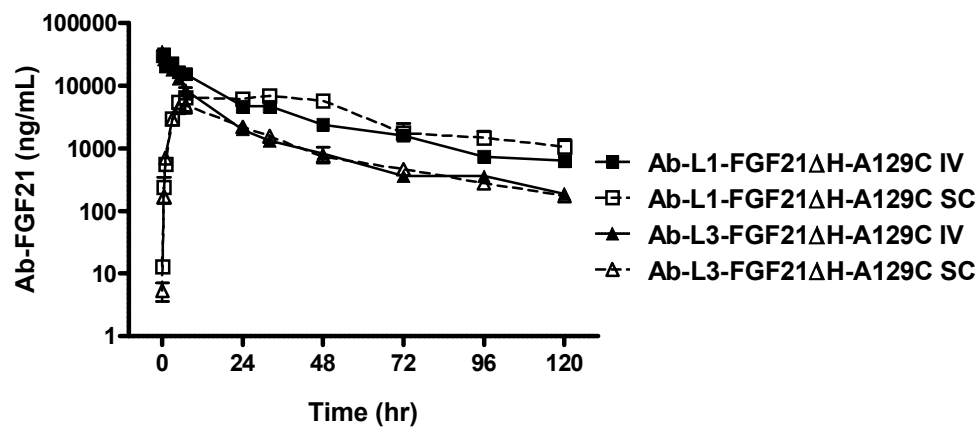


Figure 2C

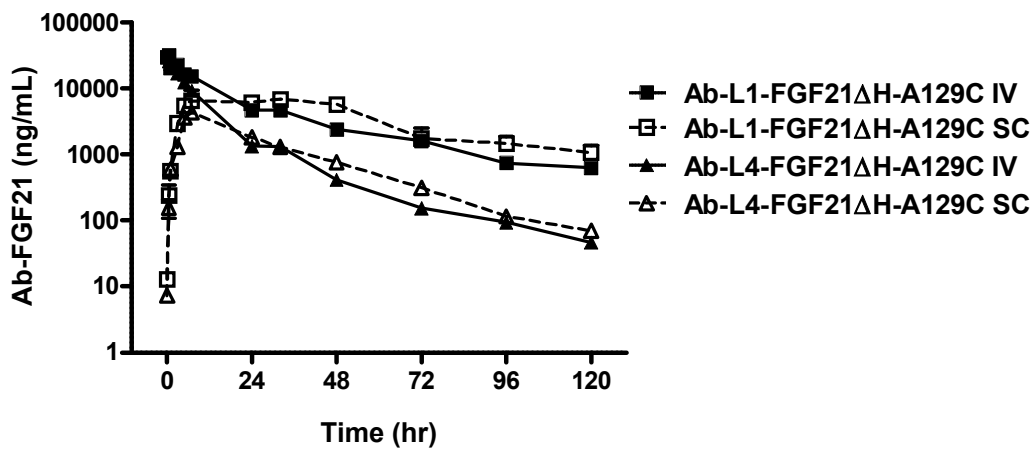


Figure 3A

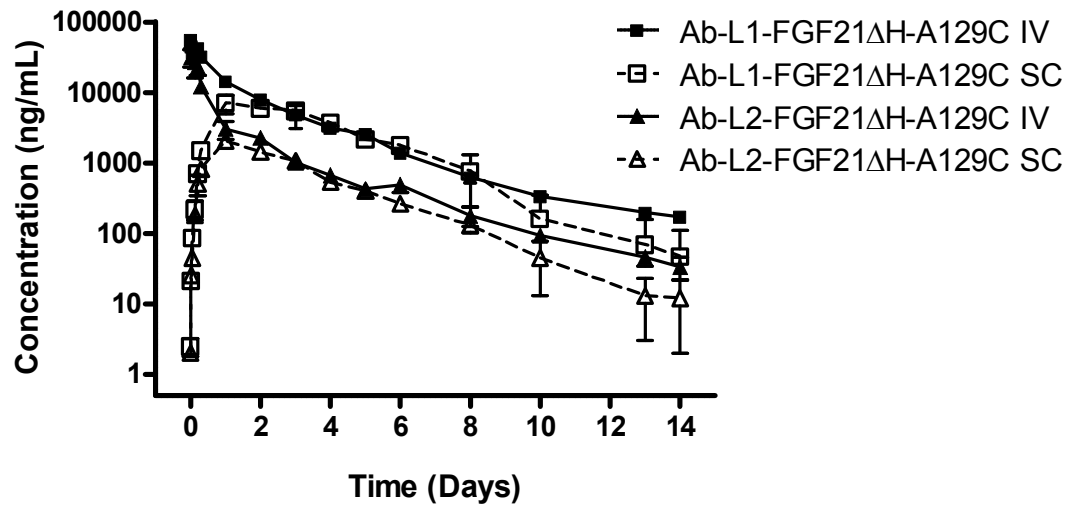


Figure 3B

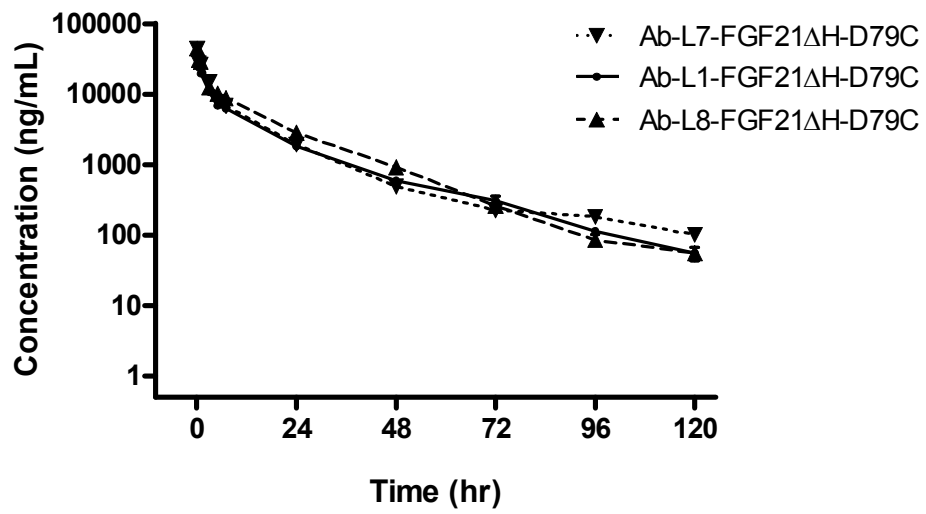


Figure 4A

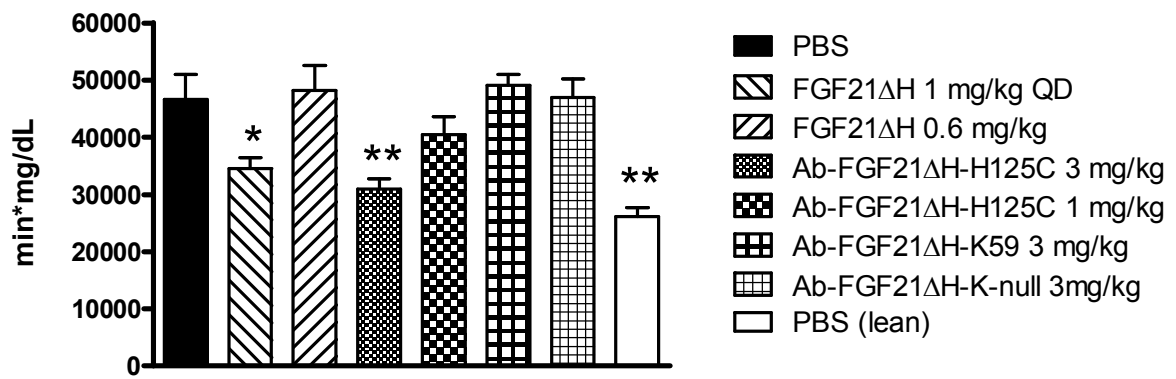


Figure 4B

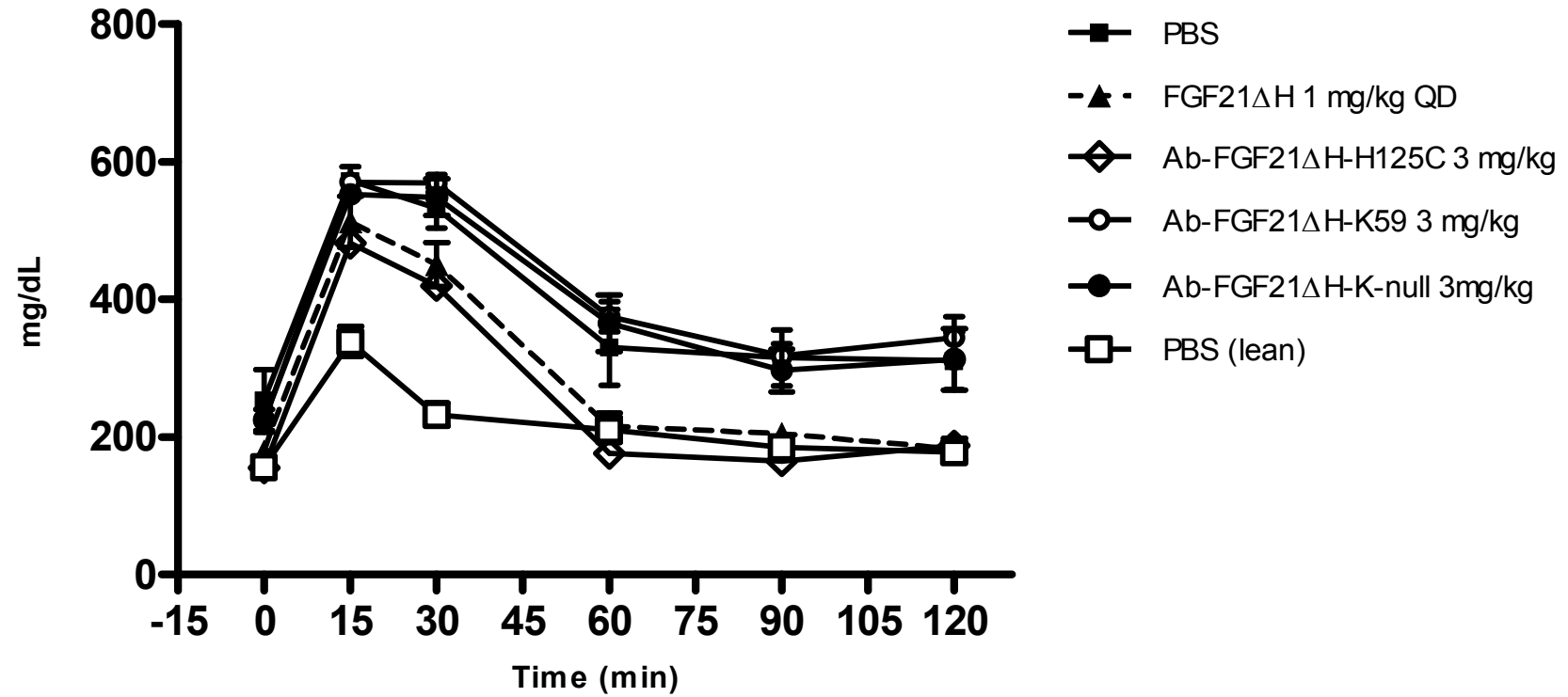


Figure 5A

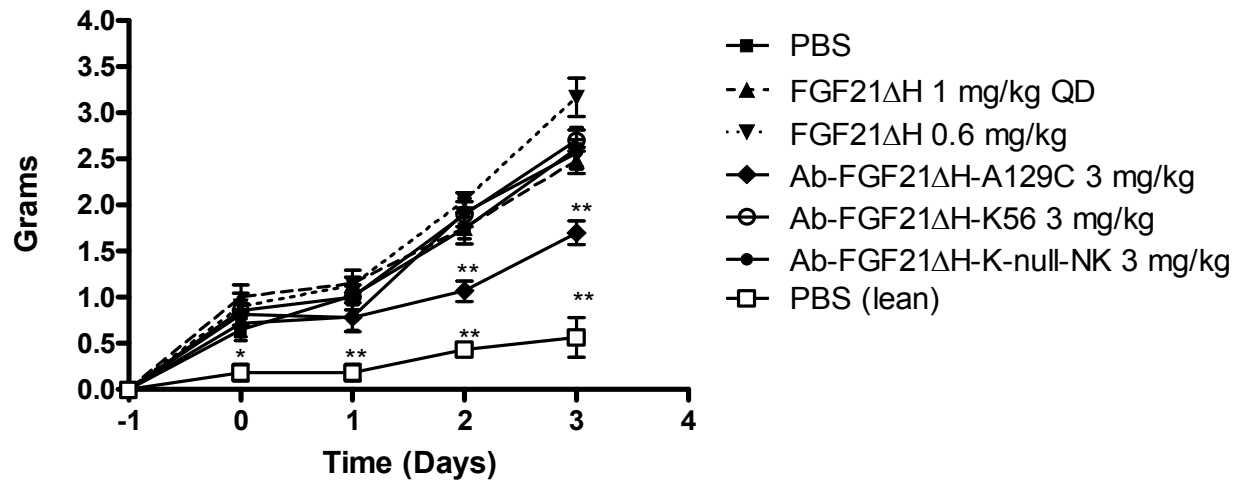


Figure 5B

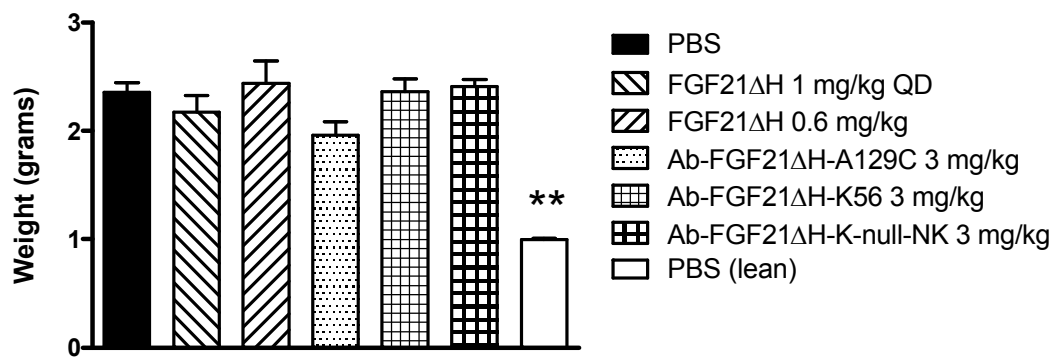


Figure 6A

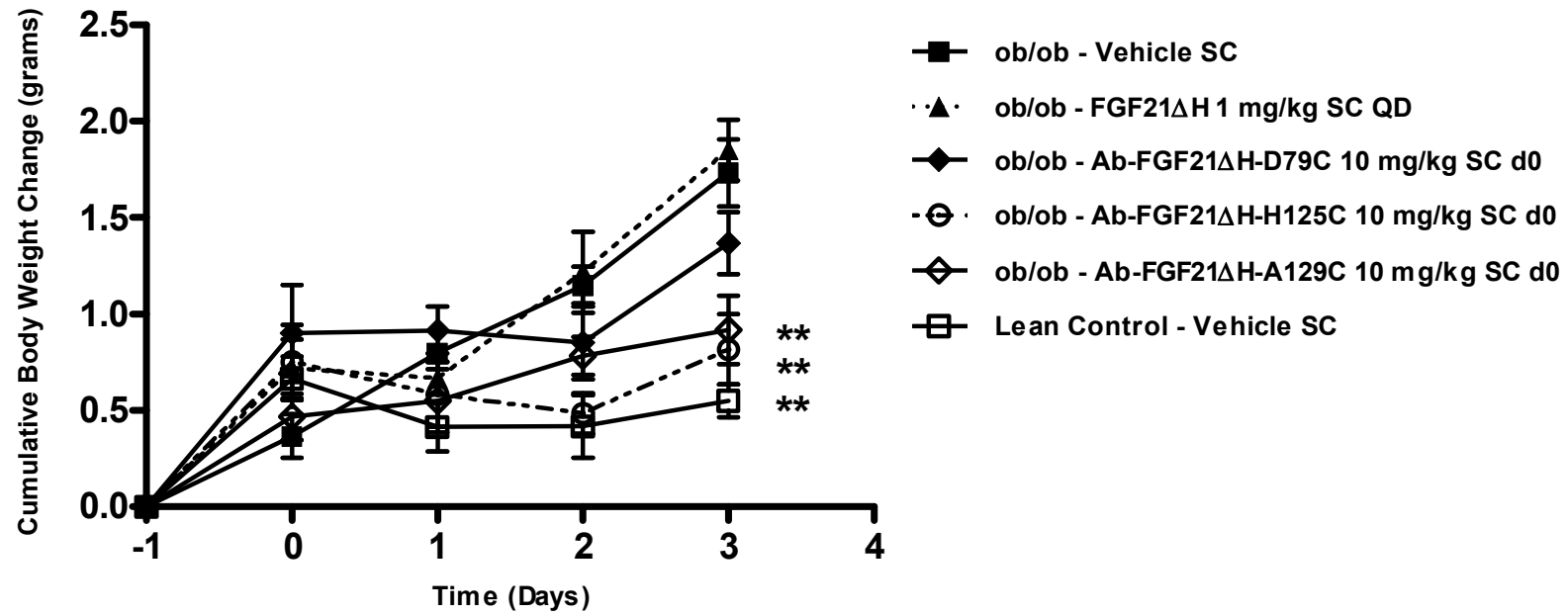


Figure 6B

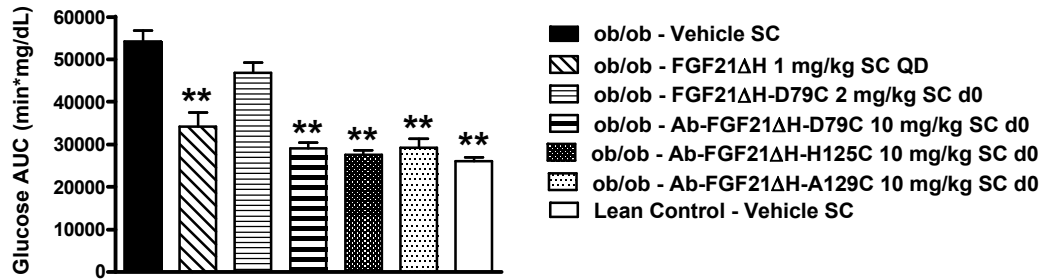


Figure 6C

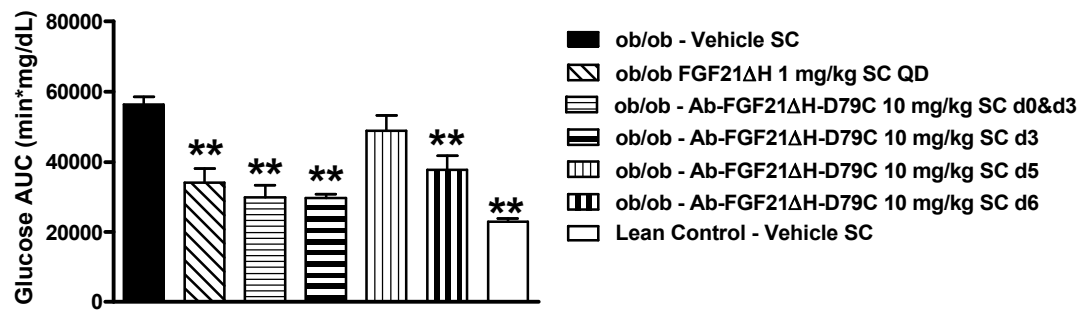


Figure 6D

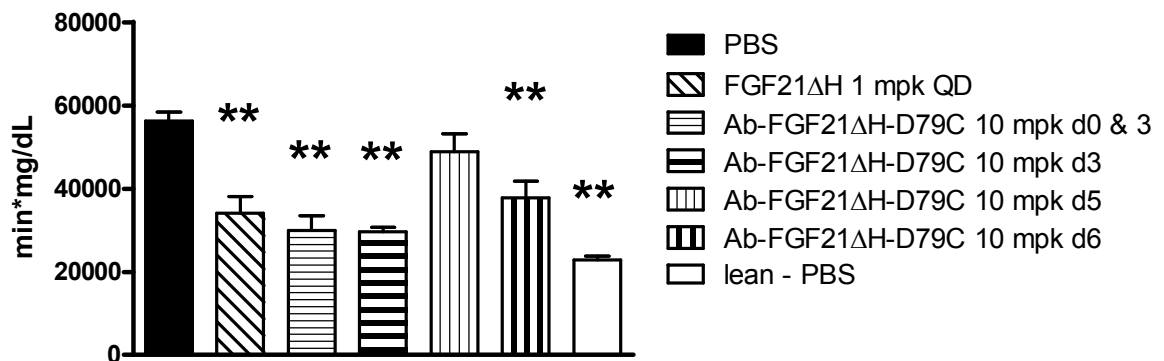


Figure 6E

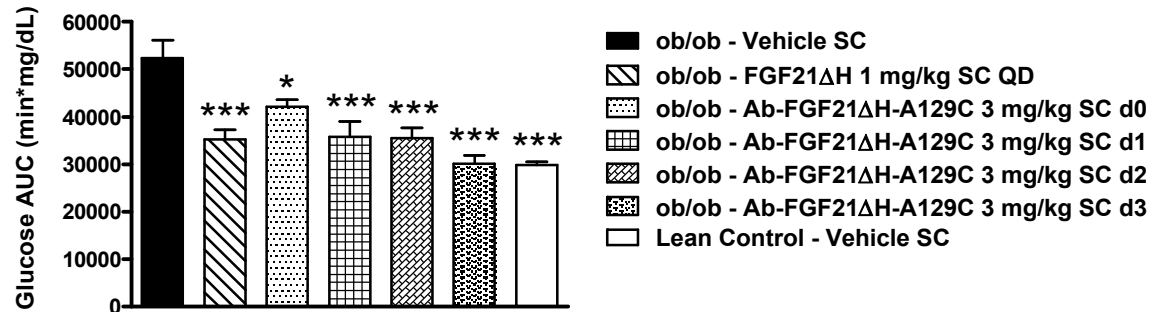


Figure 6F

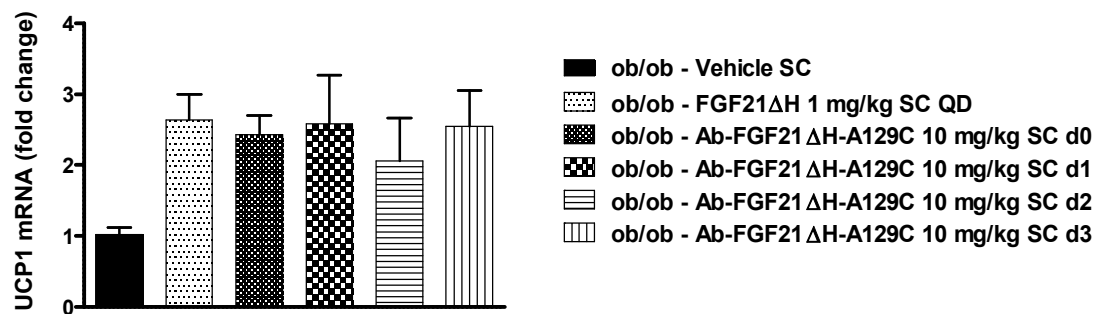


Figure 6G

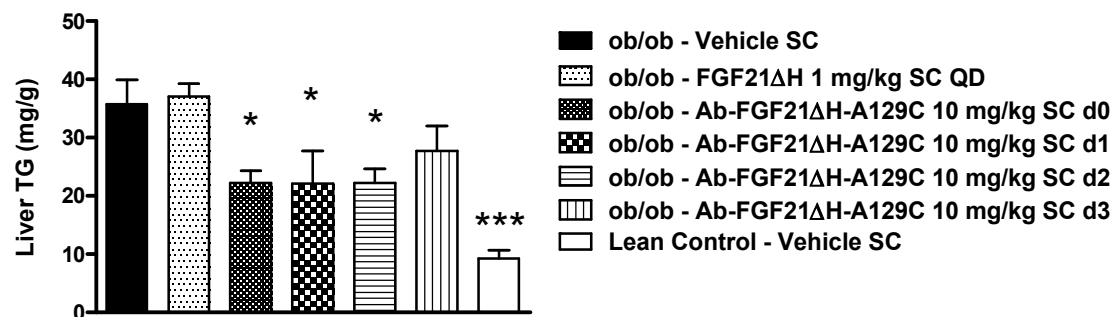


Figure 6H

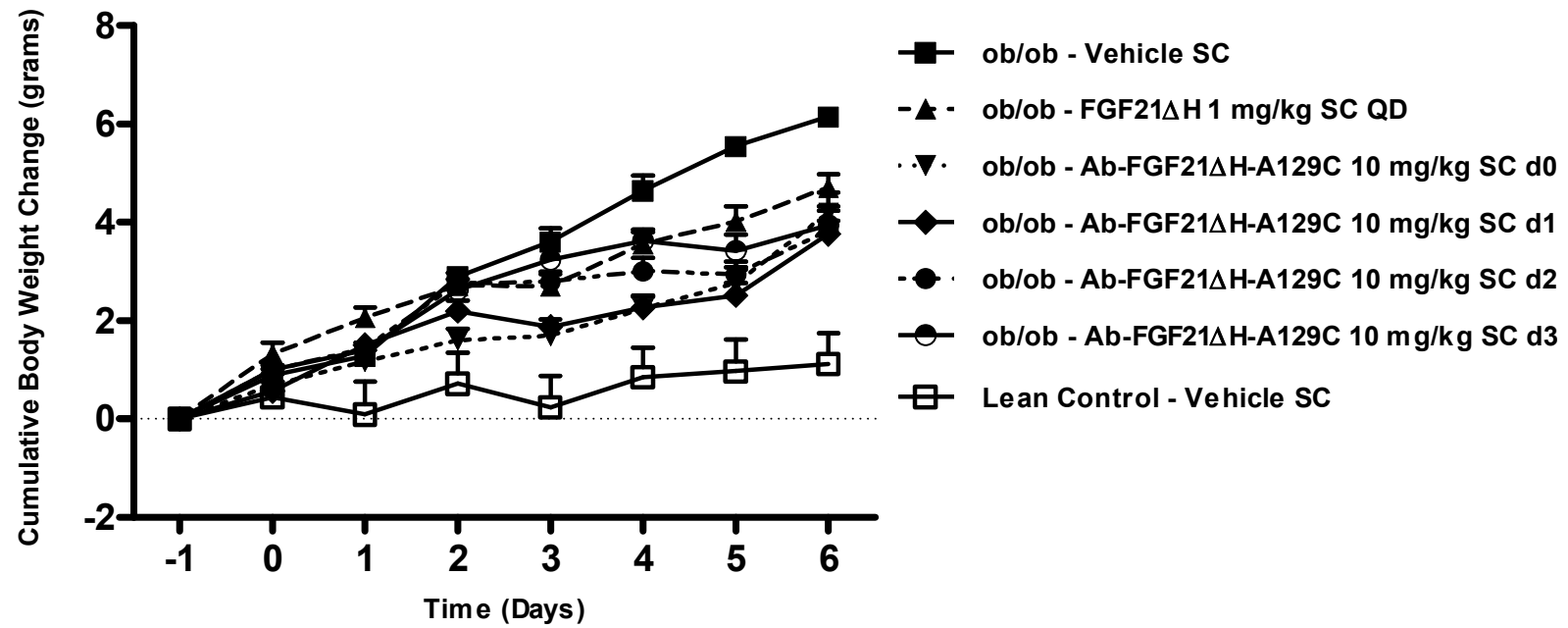


Figure 7A

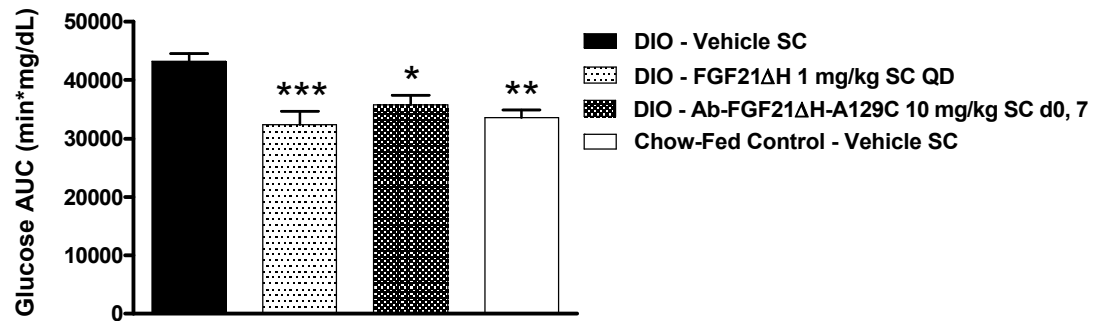


Figure 7B

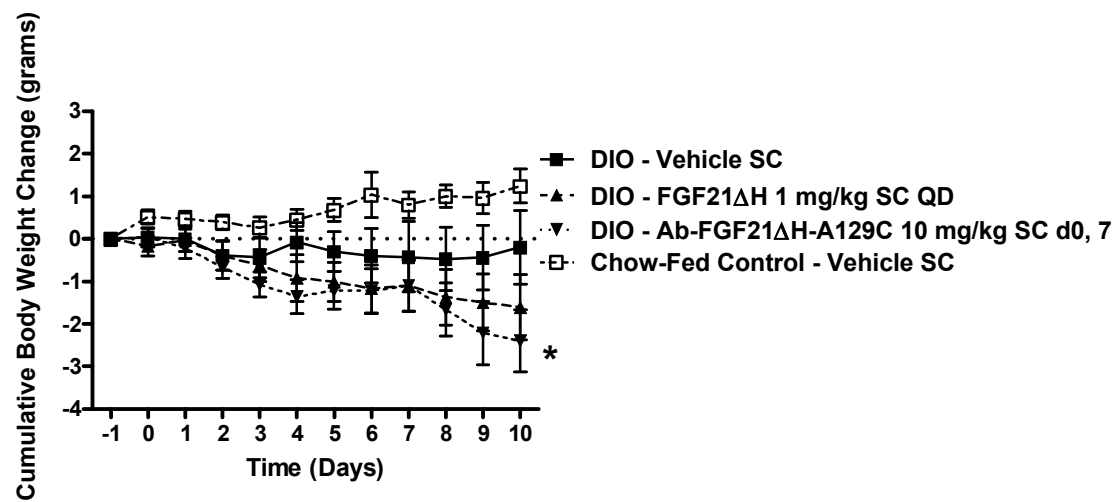


Figure 7C



Figure 7D

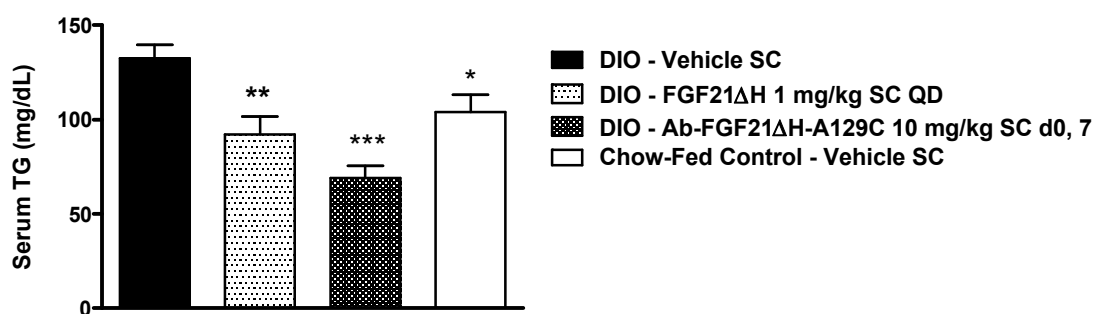


Figure 7E

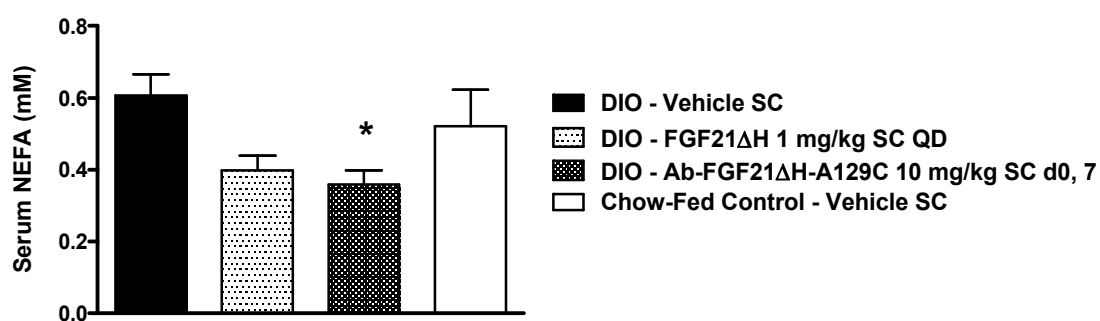


Figure 7F

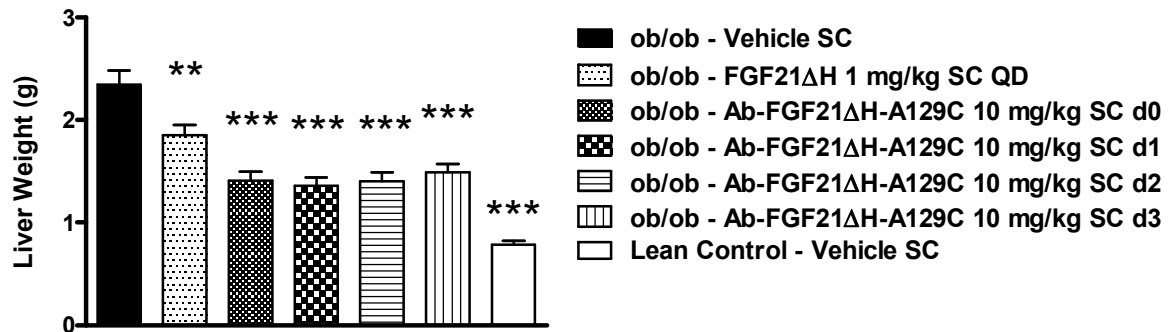


Figure 7G

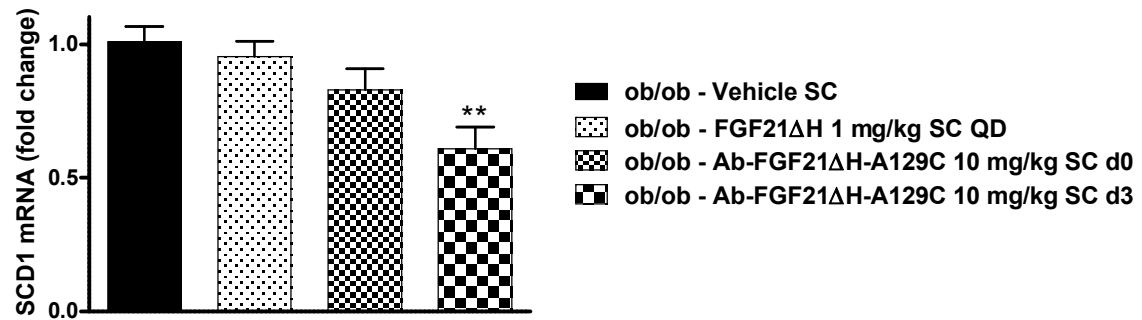


Figure 7H

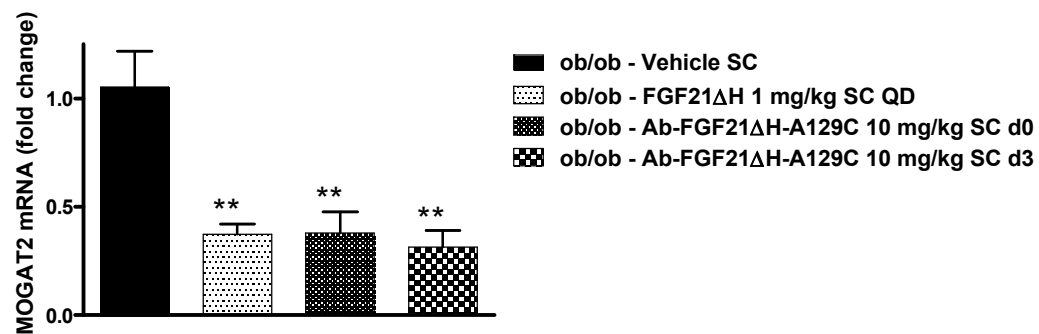


Figure 7i

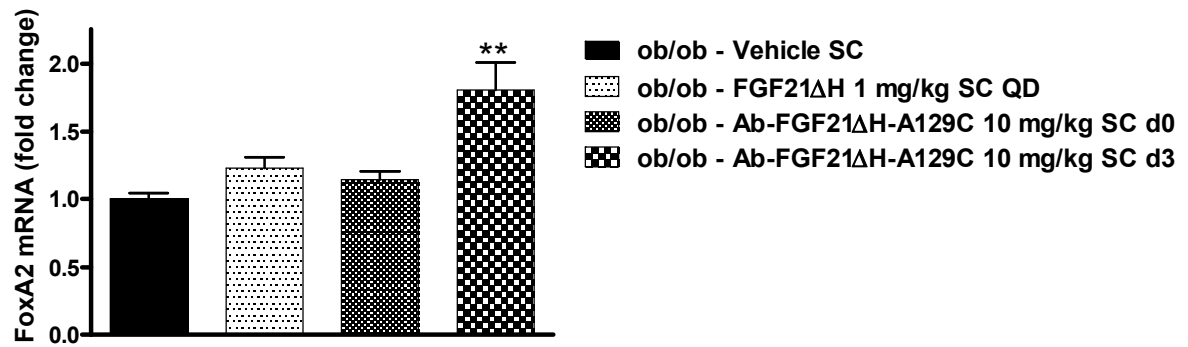


Figure 7J

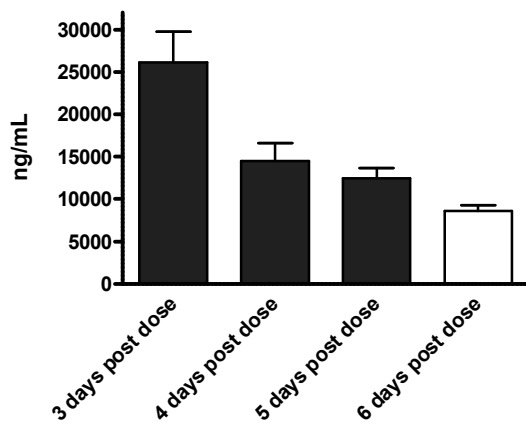


Figure 7K

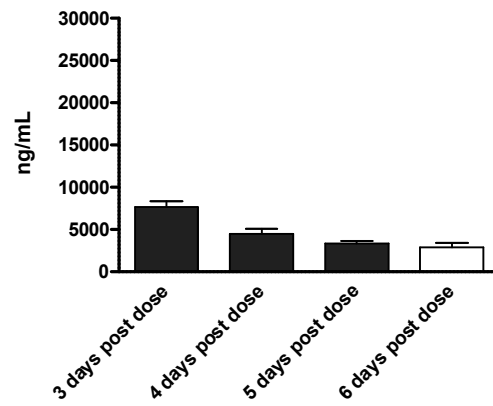


Figure 8A

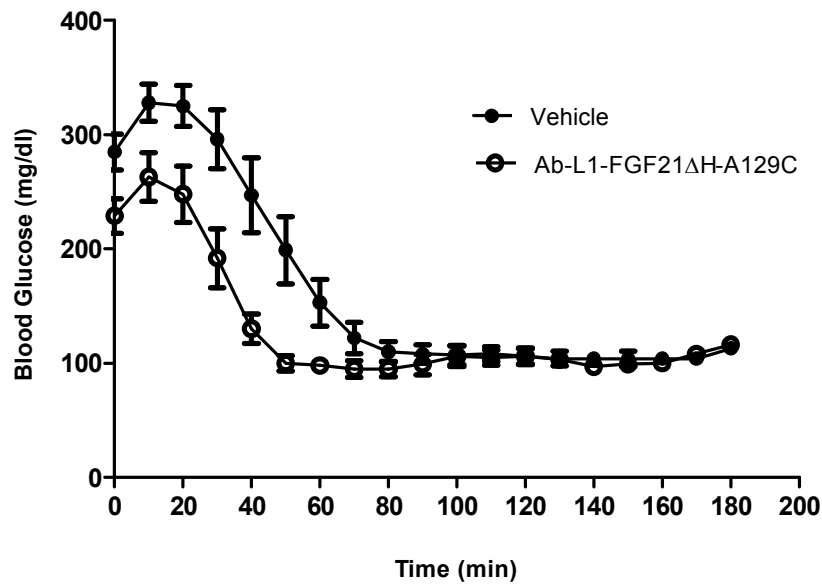


Figure 8B

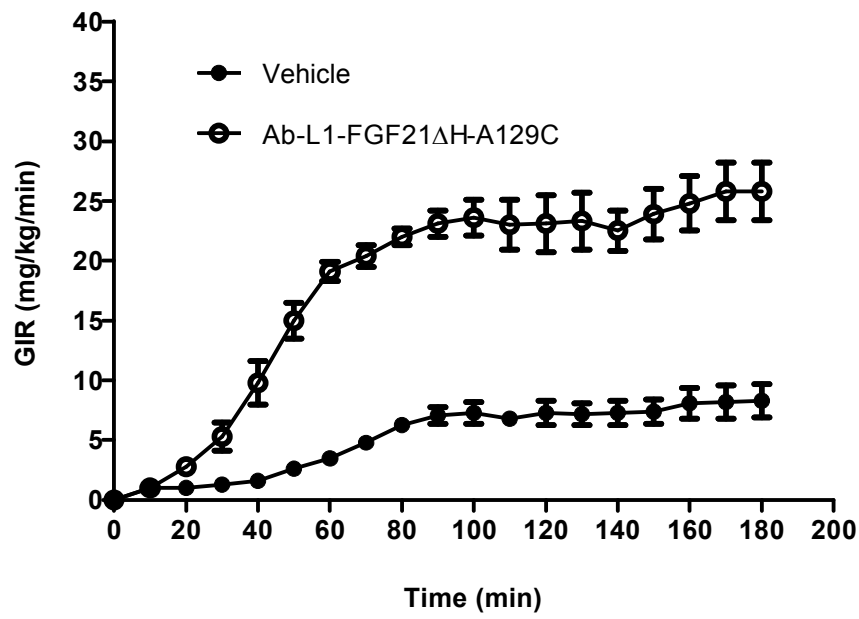


Figure 8C

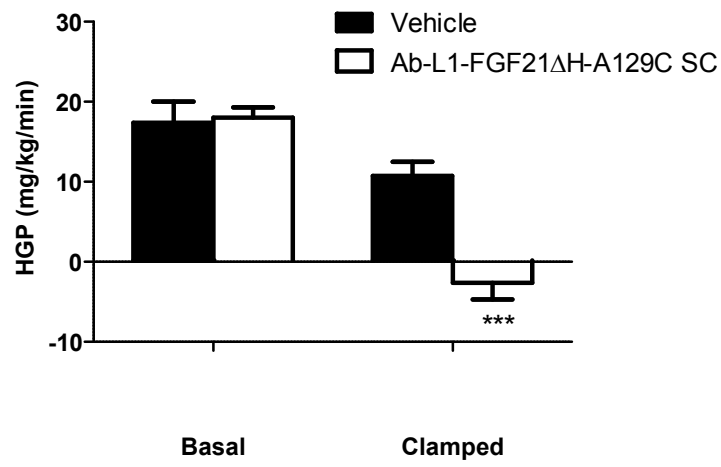


Figure 9A

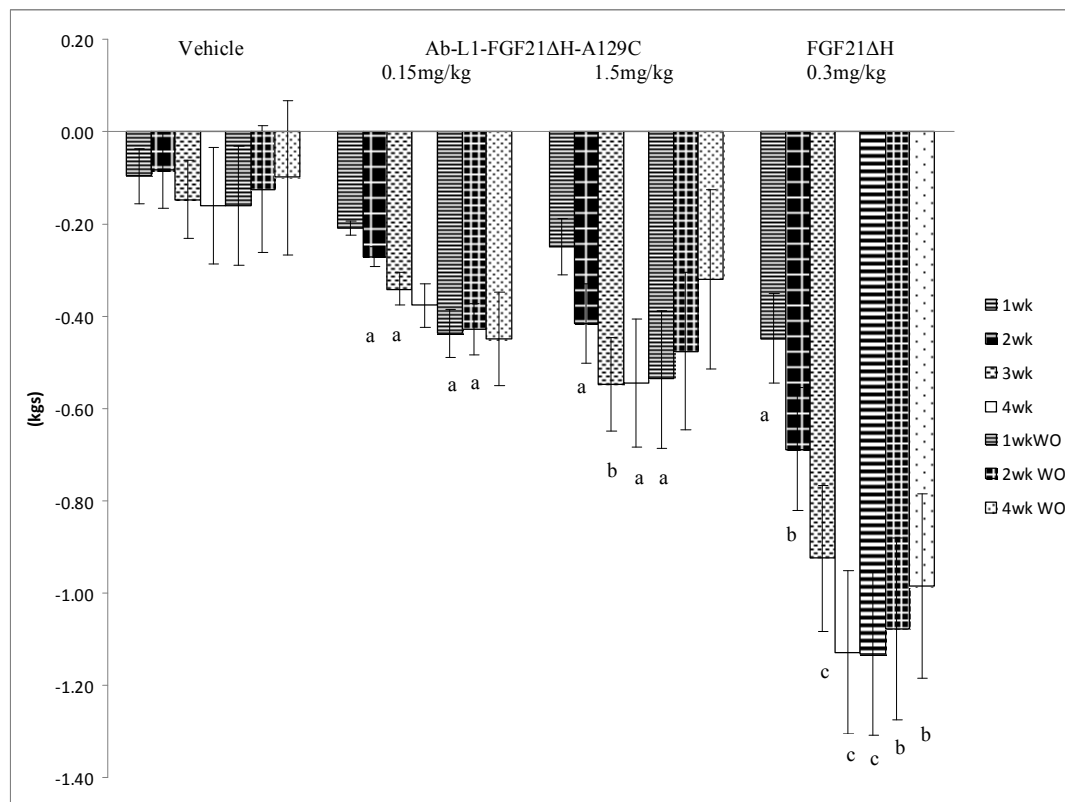


Figure 9B

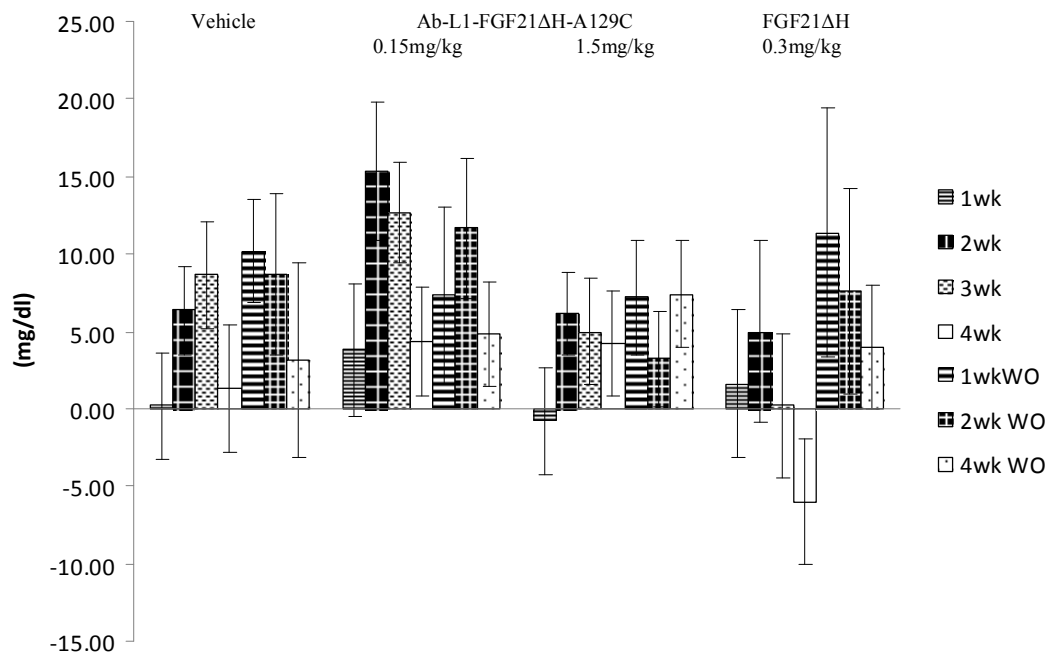


Figure 9C

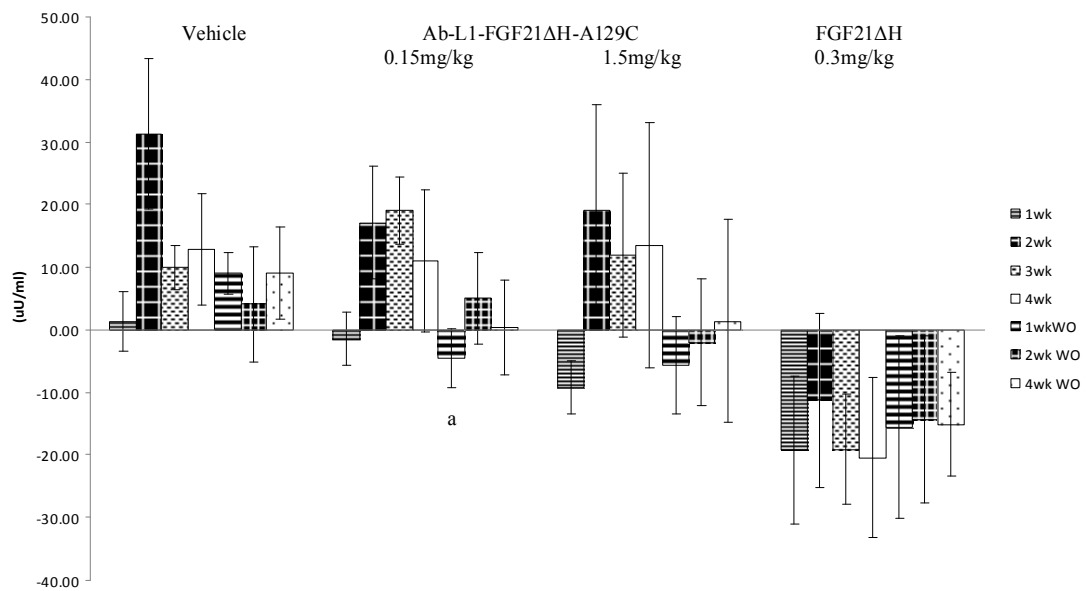


Figure 9D

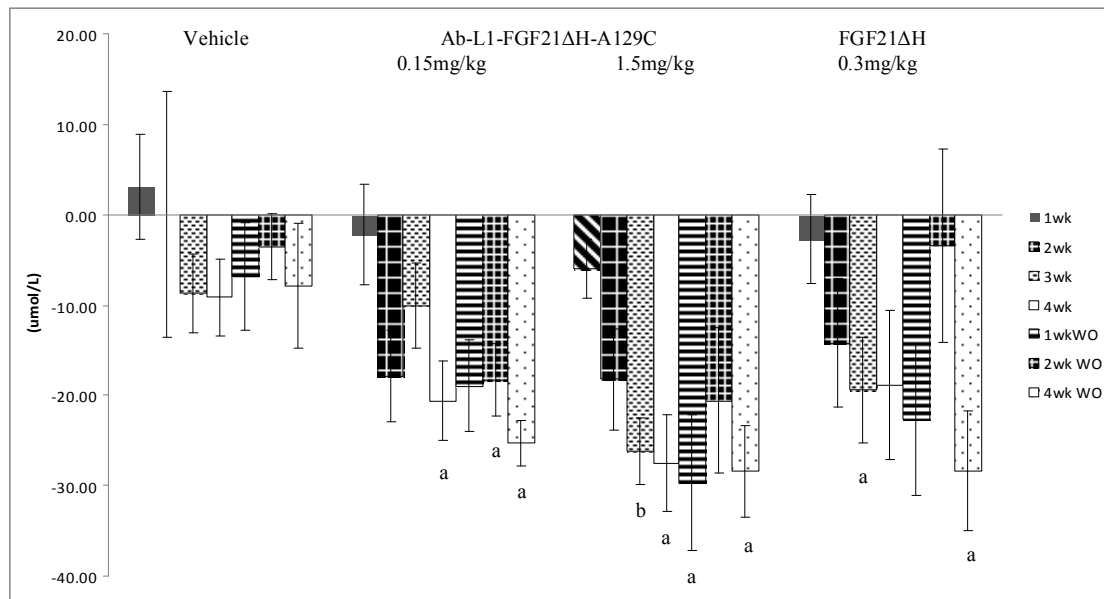


Figure 9E

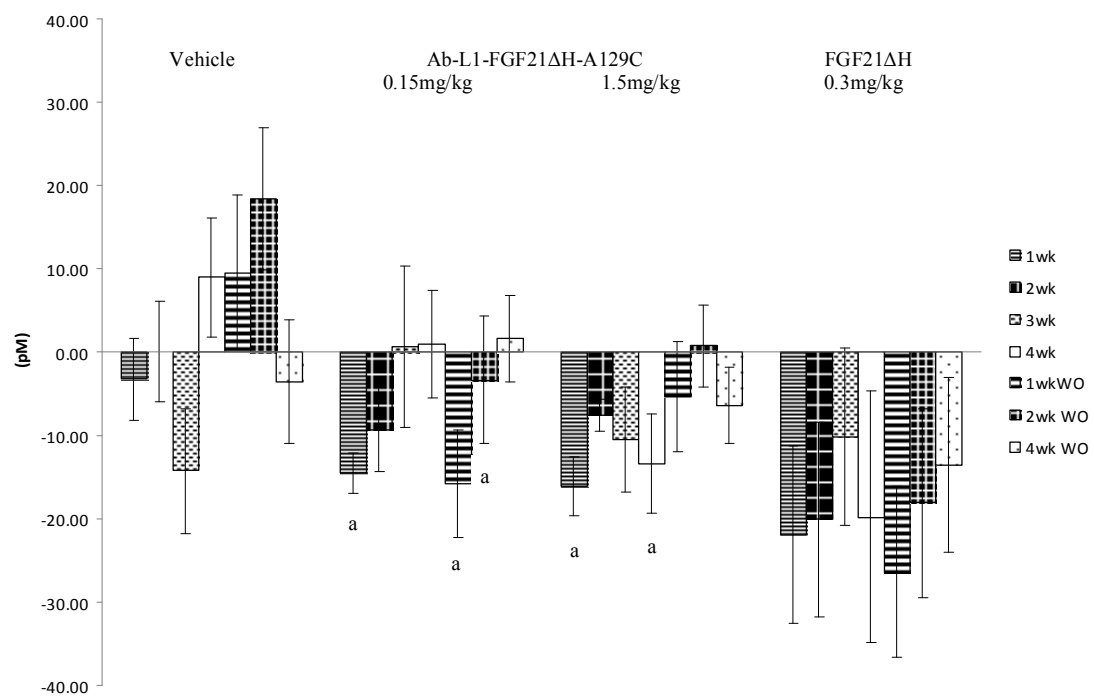


Figure 9F

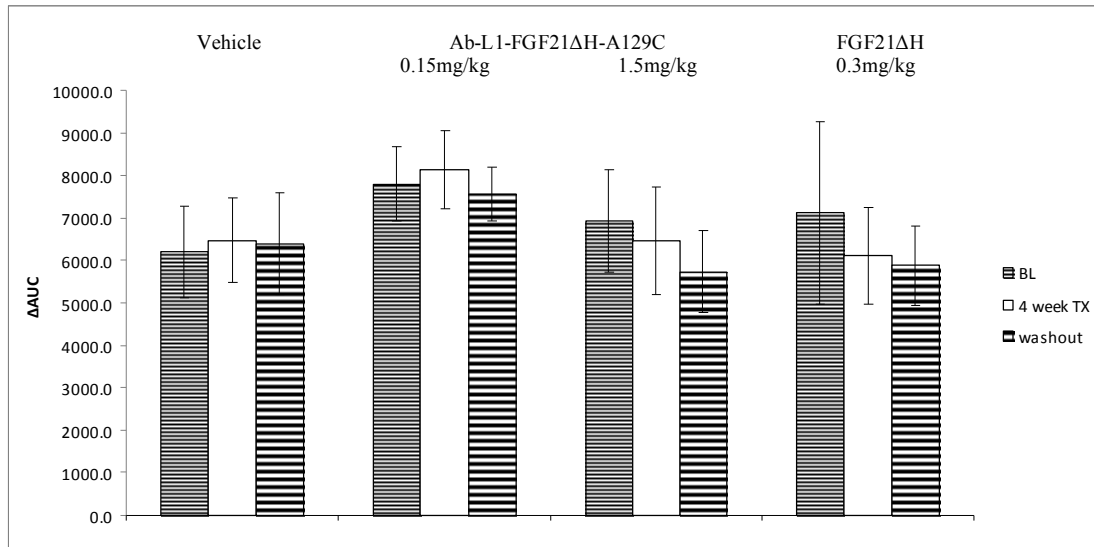


Figure 9G

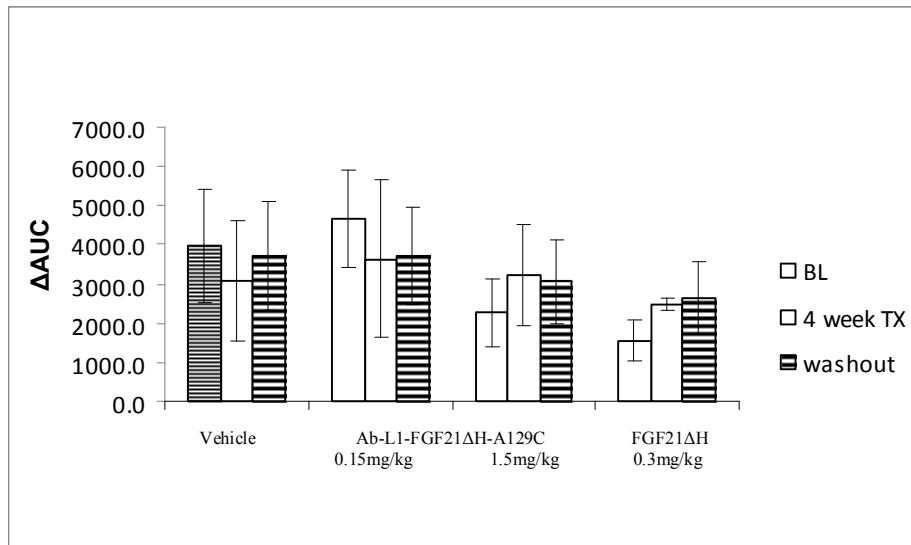


Figure 9H

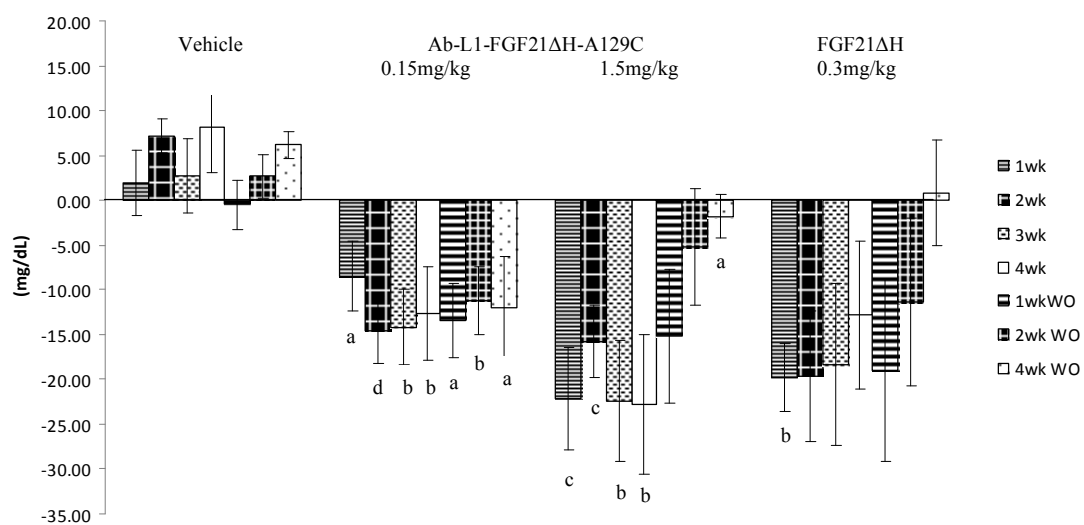


Figure 9i

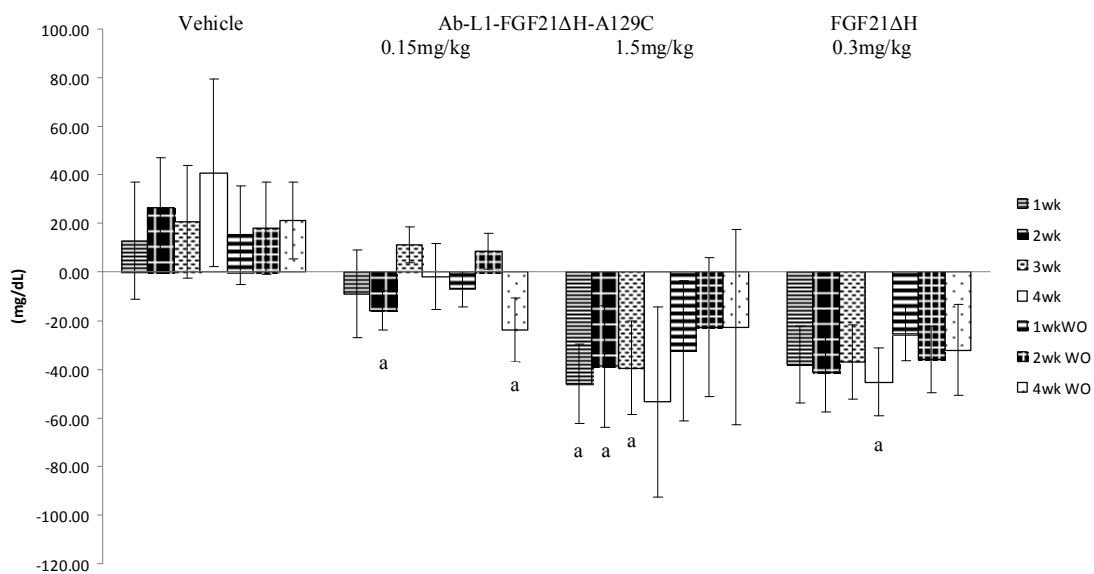


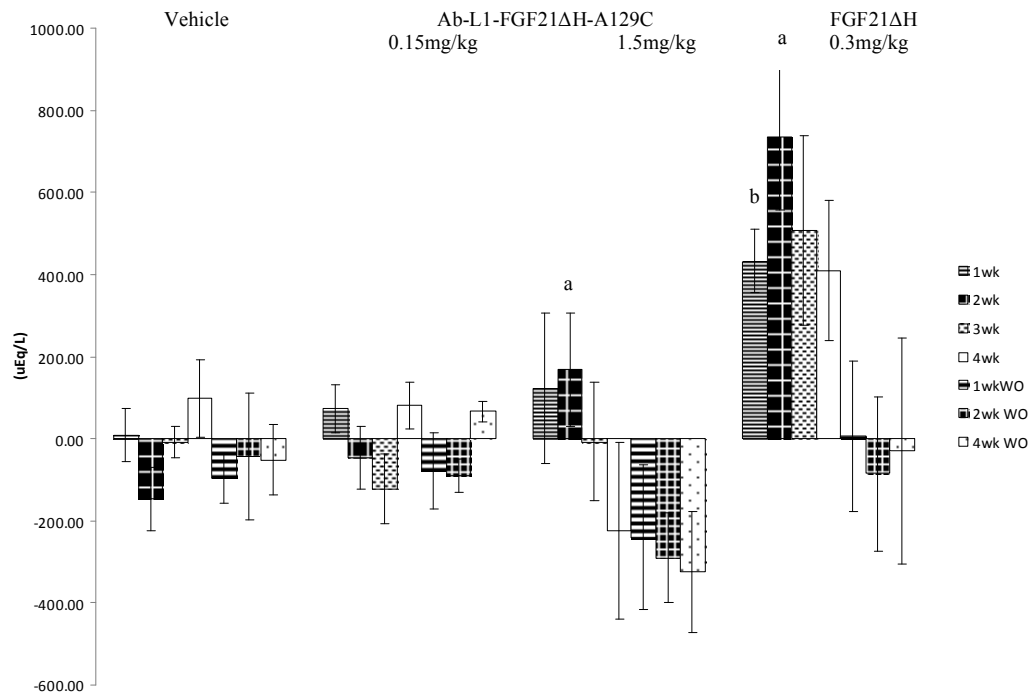
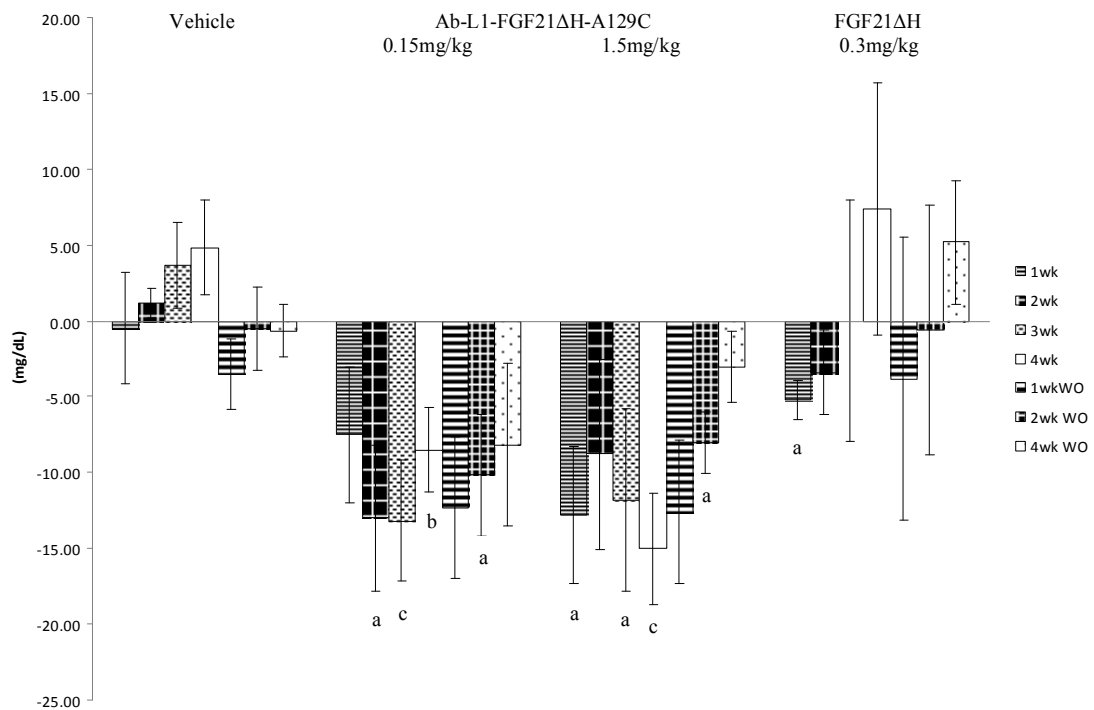
Figure 9J**Figure 9K**

Figure 9L

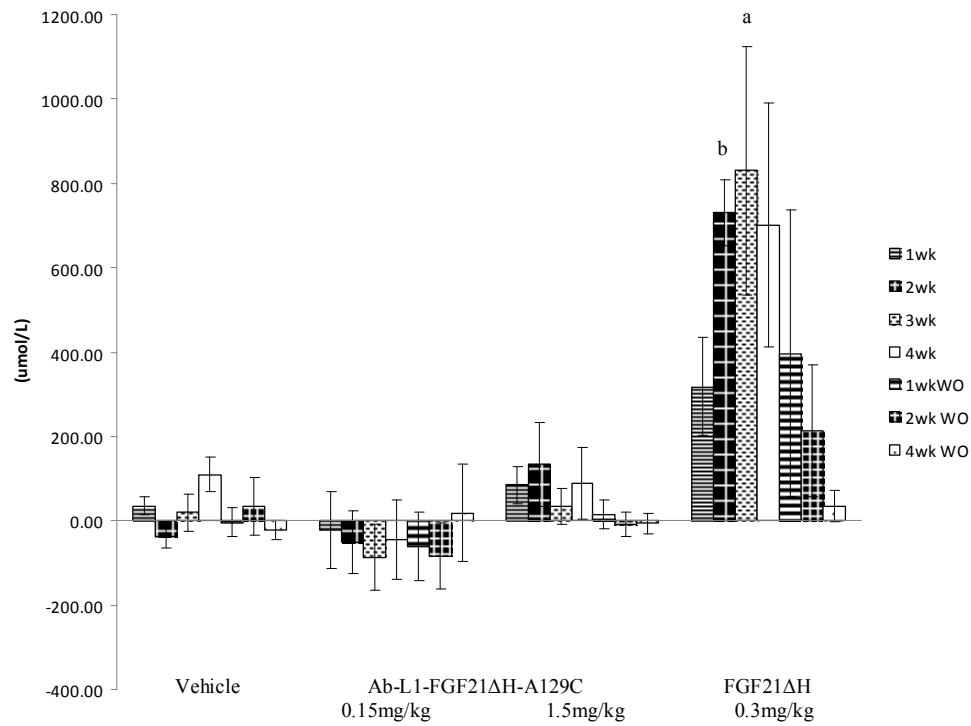


Figure 9M

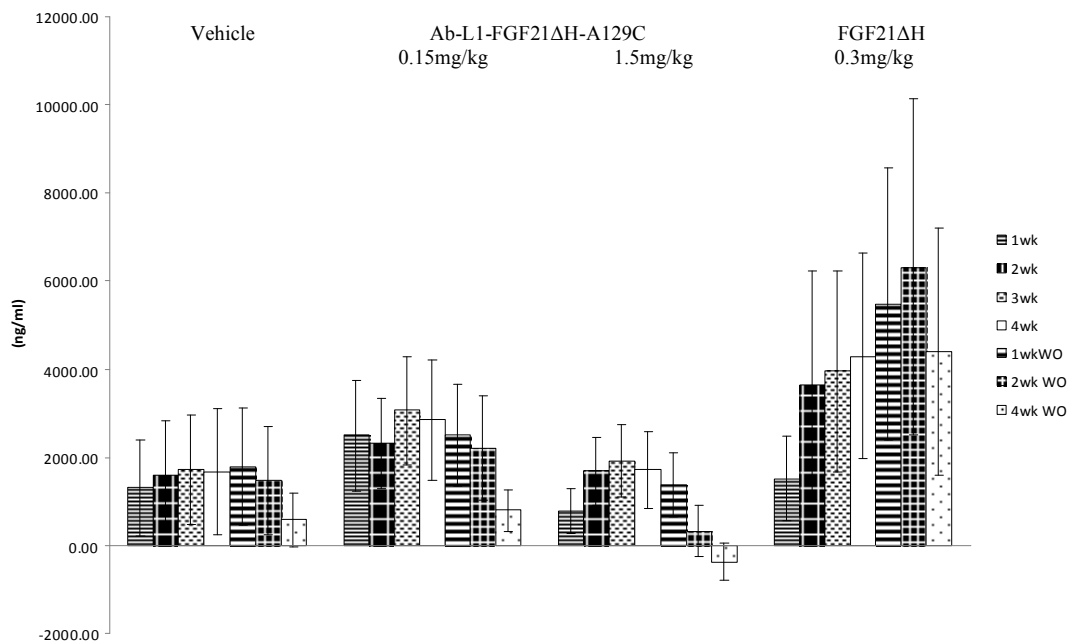


Figure 9N

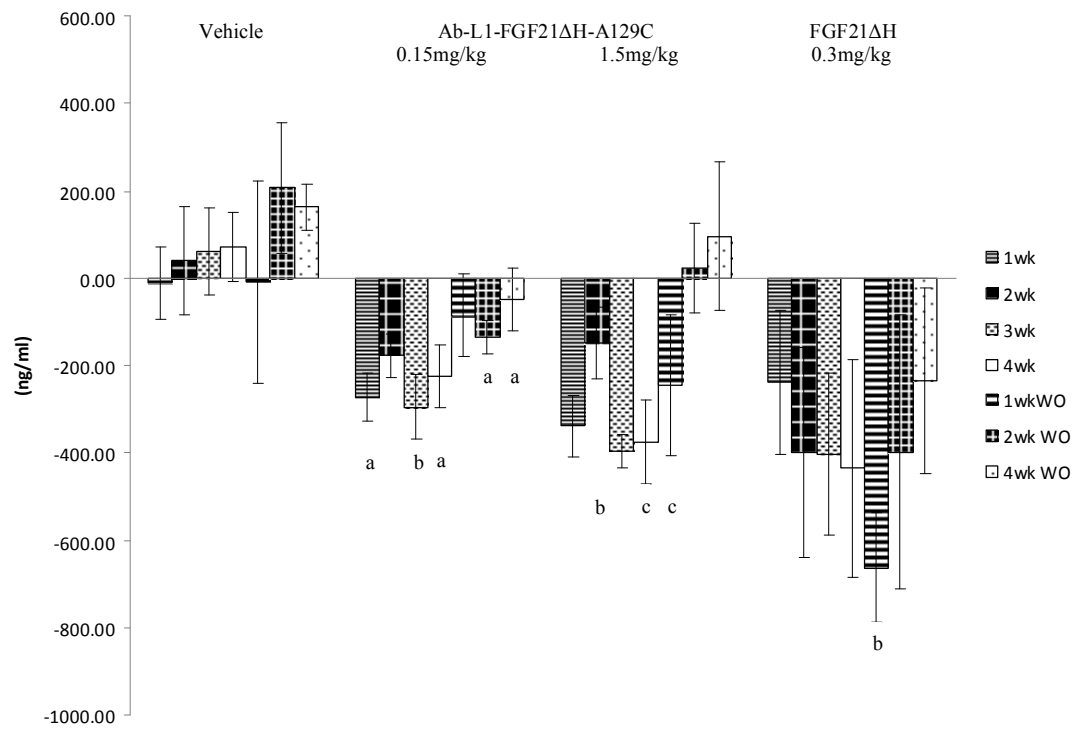


Figure 9o

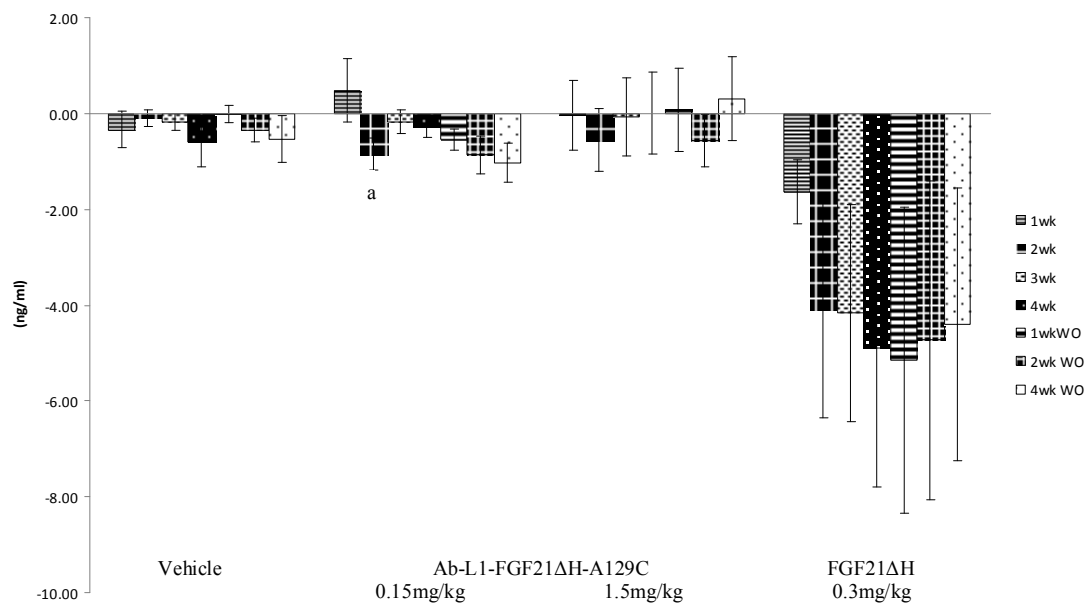
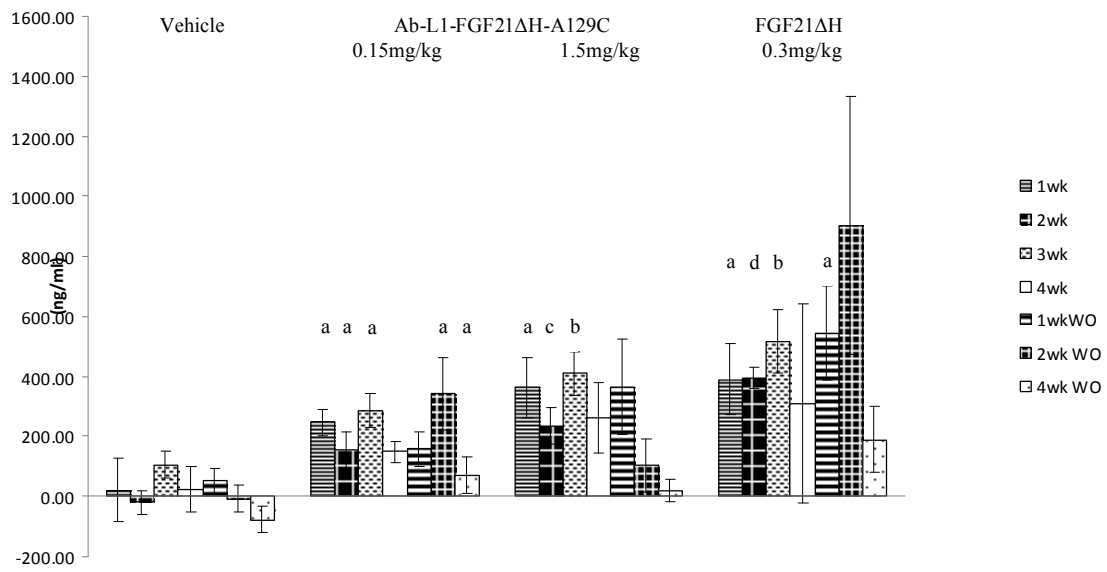


Figure 9P

PC71671A Seq Listing
SEQUENCE LISTING

<110> CovX Technologies Ireland Limited
Pfizer Inc

<120> Anti-Diabetic Compounds

<130> PC71671

<150> US61/410,715

<151> 2010-11-05

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = H or absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(146)

<223> X = L or P

<400> 1

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

PC71671A Seq Listing

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 2
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

PC71671A Seq Listing
155

145 150 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 3
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = H or Absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> X = D or C

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (125)..(125)
<223> X = H or C

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (129)..(129)
<223> X = A or C

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (146)..(146)
<223> X = P or L

<400> 3

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Xaa Gly
65 70 75 80

PC71671A Seq Listing

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Xaa Arg Asp Pro
115 120 125

Xaa Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 4
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = H or Absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (125)..(125)
<223> X = C or H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (129)..(129)
<223> X = A or C

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (146)..(146)
<223> X = L or P

<400> 4

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

PC71671A Seq Listing

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Xaa Arg Asp Pro
115 120 125

Xaa Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 5
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = H or Absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (146)..(146)
<223> X = L or P

<400> 5

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

PC71671A Seq Listing

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 6
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

PC71671A Seq Listing

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 7
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

PC71671A Seq Listing

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro Cys Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 8
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = H or Absent

<220>
<221> misc_feature
<222> (146)..(146)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 8

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

PC71671A Seq Listing

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Cys Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 9
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

PC71671A Seq Listing

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Cys
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 10
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Cys
115 120 125

PC71671A Seq Listing

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 11
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = H or Absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (146)..(146)
<223> X = P or L

<400> 11

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
Página 11

PC71671A Seq Listing

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 12
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly

PC71671A Seq Listing
155

145 150 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 13
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Cys Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser

PC71671A Seq Listing

180

<210> 14
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
 20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
 50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Cys His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
 85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
 100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
 115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
 130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
 165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 15
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

PC71671A Seq Listing

<400> 15

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Cys Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 16

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Cys Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

PC71671A Seq Listing

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 17
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = H or Absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> X = K or R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> X = K or R

PC71671A Seq Listing

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (122)..(122)
 <223> X = K or R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (146)..(146)
 <223> X = L or P

<400> 17

Xaa Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Xaa Ala Leu Xaa Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Xaa Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140

Ala Xaa Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 18
 <211> 180
 <212> PRT

PC71671A Seq Listing

<213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 19

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

PC71671A Seq Listing

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 20
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

PC71671A Seq Listing

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 21
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

PC71671A Seq Listing

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 22
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

PC71671A Seq Listing

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 23
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Lys Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

PC71671A Seq Listing

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 24
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Glu Ser Leu Leu Gln Leu Arg Ala Leu Arg Pro Gly Val Ile Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Val Arg Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu
85 90 95

Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly
100 105 110

Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Arg Asp Pro Ala
115 120 125

Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala
130 135 140

Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly
145 150 155 160

Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro
165 170 175

PC71671A Seq Listing

Ser Tyr Ala Lys
180

<210> 25
<211> 219
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25

Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

PC71671A Seq Listing
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 26
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

PC71671A Seq Listing

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 27
<211> 112
<212> PRT

PC71671A Seq Listing

<213> Homo sapiens

<400> 27

Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

PC71671A Seq Listing

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

PC71671A Seq Listing
60

50

55

Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Lys Tyr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino Acid Linker

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 32
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Asn Ser Asn Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala
20 25

<210> 33
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Asn Ser Asn Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30

PC71671A Seq Listing

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BENSON, Gregg C.
Pfizer Inc. Eastern Point Road MS9114
Groton, Connecticut 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 25 April 2013 (25.04.2013)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC 71671A	
International application No. PCT/IB2011/054874	International filing date (<i>day/month/year</i>) 02 November 2011 (02.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address COVX TECHNOLOGIES IRELAND, LTD. Pottery Road Dun Laoghaire County Dublin Ireland	State of Nationality IE	State of Residence IE
	Telephone No. 973 660 6628	
	Facsimile No. 646.563.9528	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☒ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address COVX TECHNOLOGIES IRELAND LIMITED Operations Support Group Ringaskiddy Co. Cork Ireland	State of Nationality IE	State of Residence IE
	Telephone No. 973 660 6628	
	Facsimile No. 646.563.9528	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Diot Sylvie
Facsimile No. +41 22 910 06 10	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 9608

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BENSON, Gregg C.
Pfizer Inc. Eastern Point Road MS9114
Groton, Connecticut 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 19 January 2012 (19.01.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC 71671A	
International application No. PCT/IB2011/054874	International filing date (<i>day/month/year</i>) 02 November 2011 (02.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address DAS, Tapan, Kanti Pfizer Global Research and Development 700 Chesterfield Parkway West Chesterfield, MO 63017 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as applicant for US only and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☒ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Seymany Malathib e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8473
Facsimile No. +41 22 910 06 10	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BENSON, Gregg C.
Pfizer Inc. Eastern Point Road MS9114
Groton, Connecticut 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 19 January 2012 (19.01.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC 71671A	
International application No. PCT/IB2011/054874	International filing date (<i>day/month/year</i>) 02 November 2011 (02.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address HODGE, Tamara, Shafer 700 Chesterfield Parkway West Chesterfield, MO 63017 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as applicant for US only and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☒ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Seymany Malathib e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8473
Facsimile No. +41 22 910 06 10	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BENSON, Gregg C.
Pfizer Inc. Eastern Point Road MS9114
Groton, Connecticut 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 19 January 2012 (19.01.2012)	
Applicant's or agent's file reference PC 71671A	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB2011/054874	International filing date (<i>day/month/year</i>) 02 November 2011 (02.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address LEVIN, Nancy, Jane CovX Research LLC 9381 Judicial Drive, Suite 200 San Diego, CA 92121 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as applicant for US only and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☒ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Seymany Malathib e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8473
---	--

Facsimile No. +41 22 910 06 10

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BENSON, Gregg C.
Pfizer Inc. Eastern Point Road MS9114
Groton, Connecticut 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 19 January 2012 (19.01.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC 71671A	
International application No. PCT/IB2011/054874	International filing date (<i>day/month/year</i>) 02 November 2011 (02.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address PARSONS, Erin, Kristen Pfizer Global Research and Development 700 Chesterfield Parkway West Chesterfield, MO 63017 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as applicant for US only and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☒ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Seymany Malathib e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8473
Facsimile No. +41 22 910 06 10	

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/IB2011/054874

International filing date (day/month/year)
02.11.2011

Priority date (day/month/year)
05.11.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/48 C07K14/50 C07K16/40

Applicant
COVX TECHNOLOGIES IRELAND, LTD.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Valcárcel, Rafael

Telephone No. +49 89 2399-0



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 32, 33, 36-38(all partially)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 32, 33, 36-38(all partially)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13~~ter~~.1(a) or (b).
- ☒ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☒ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-31, 34, 35(completely); 32, 33, 36-38(partially)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-31, 34, 35(completely); 33(partially)</u>
	No: Claims	<u>32, 36-38(all partially)</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>33(partially)</u>
	No: Claims	<u>1-31, 34, 35(completely); 32, 36-38(partially)</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-31, 34, 35(completely); 32, 33, 36-38(partially)</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Cited documents

The document numbering corresponds to the order of citation in the International search report.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

According to Rule 66.1(e) PCT, claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of international preliminary examination. As the subject-matter of inventions 2, 3, 5-9 and 13-15 has not been searched (see BOX I of the International Search Report), no preliminary examination has been carried out for these claims.

Re Item IV

Lack of unity of invention

- 1 The application lacks unity as contravening the requirements of Rule 13 PCT. Rule 13.1 PCT states that for unity of invention to be present, all subject-matter should be linked by a single general inventive concept. Rule 13.2 PCT stipulates that where a group of inventions is claimed the requirement of unity shall be fulfilled only where there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. "Special" technical features are those features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.
- 2 Fifteen different (groups of) potential inventions have been recognised (see list).
- 3 The common concept (technical relationship) linking these Groups together and covering the whole of the claimed subject - matter, with due consideration paid to the content of the description section, **is that all relate to FGF21 molecules**. This feature was known from the prior art (see section 4 below) and thus cannot define a contribution over the prior art. No "corresponding" special technical features could be identified either.

- 4 D1 discloses a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the Fc portion **or** (emphasis added) an immunoglobulin to provide a fusion protein with long circulating half-life (see page 1, last paragraph). D1 does not explicitly disclose that the FGF21 molecule is covalently attached to the combining site of an antibody. Several embodiments refer to the use of the Fc portion of an immunoglobulin fused to FGF21 via a linker (see page 2, lines 13-21, or see Table 5, on page 30).

D1 also discloses a fusion protein of a FGF21 molecule and human albumin (or fragments thereof (see paragraph bridging pages 2 and 3 of D1).

D2 and D3 also disclose a FGF21-Fc fusion protein (see e.g. example 8 of D3 or page 31 of D2). D2 further discloses fusion proteins of FGF21 mutants (designed to modulate stability and solubility) and Fc, (see e.g. example 20).

D5 discloses several FGF21 mutants, as for example the D79C mutant (which is identical to SEQ ID NO: 13 of the present application (referred to in claim 33 of the present application) which is PEGylated to increase the half life. The D at position 79 is modified to C to allow the PEGylation (see page 10, lines 9-12, or claims 3 and 4 of D5).

D6 also discloses FGF-21 mutants aimed to increase the half-life and also the PEGylation of said mutants (see e.g. claim 93).

In the light of the above discussed prior art, said common concept cannot be regarded as the "single general inventive concept" required by Rule 13 PCT because **it is not novel**.

- 5 In view of the prior art, there are different technical problems for the different inventions:
- for the subject-matter of invention 1, the technical problem in view of D1 to D3 could be considered to provide alternative FGF21-antibody conjugates;
 - for the subject-matter of inventions 2-4, the technical problem in view of D5 could be considered to provide alternative FGF21 mutants that allow conjugation at different FGF21 positions;
 - for the subject matter of inventions 5-15, the technical problem in view of D5 could be considered to be the provision of a alternative FGF21 mutants.

From the analysis just discussed, it is apparent that there is lack of unity, since different technical problems have to be defined. Furthermore, among inventions 1-4 there is also lack of unity since no "special technical feature" or "single inventive concept" is linking said solutions. The only common feature among inventions 1-4 is the provision of FGF21 conjugates to increase half-life, and said common concept is also known (see e.g. FGF21 fused to albumin of PEG, e.g. FGF21-PEG at position 79, see details in section 4 above).

It is noted that the common concept among inventions 4-15 (the provision of alternative FGF21 mutants) is also not novel: see e.g. the FGF21 mutant D79C of D5 (e.g. in claim 4) which is identical to SEQ ID NO: 13 of the present application (invention 15 of the present application).

- 6 Since no other feature could be identified neither in the description nor in the claims that could be considered a "special" technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT, each listed subject must be regarded as a separate group of inventions.
- 7 Consequently, the different inventions lacking a common inventive concept are formulated as different subjects (the Applicant's attention is drawn to the fact that the use of the term "invention" here in no way implies recognition of an inventive step for the subject-matter of any group).
- 8 A complete search could not be performed with relatively little effort: due to the lack of common technical features independent searches have to be carried out for each of the inventions. The search thus has been limited to the first-claimed invention and additional fees must be paid for each additional subject to be searched.
- 9 **The applicant elected to pay four additional search fees for inventions 4 and 10-12 to be searched. He paid these four fees under protest** stating these four inventions refer to the technical feature of position 129 as a surprising advantageous position for conjugation to a half-life increasing moiety.

- 10 Said concept is not novel since mutants at position 129 for conjugation to a half-life increasing moiety were known for example from D5. D5 discloses muteins of FGF-21 which enhanced pharmaceutical stability and thus increased half-life comprising at least two substitutions to cysteine, one of them being alanine 129 (see e.g. page 8, lines 14 to 24). The incorporation of the 2 Cys residues provides thiol groups to which PEG can be attached resulting in PEGylated FGF-21 having increased half-life (see page 7, lines 15-21). In view of the wording of present claim 32 ("comprising"), a FGF21 mutant comprising Ala129Cys and other mutation to Cys is considered prejudicial to the novelty of claim 32 of the present application.

The FGF21 mutant comprising at least two modifications to cysteine, one of the possibilities being at alanine 129 is also disclosed in D1 (see section bridging pages 8 and 9), D2 (see claim 1) or D6 (see e.g. paragraph [33] which also cited D5).

Since the feature of position 129 for conjugation to a half-life increasing moiety is not novel, it is not an special technical feature linking inventions 4, 10, 11 and 12. Thus, the protest is not entirely justified.

- 11 However, since inventions 10-12 (corresponding to the particular SEQ ID NOs: 8, 9 and 10) have the technical feature of having a single cysteine substitution being A129C (Ala129Cys) which on its own has surprising properties (see section bridging pages 68 and 69 of the present application), the present authority **has decided to group these three sequences (SEQ ID NOs: 8, 9 and 10) under one invention and to refund two search fees.** However, for the sake of clarity, the original invention numbering is not changed.

Further non-unity within group 1 of potential inventions

- 12 It is again noted that further non unity is present within group 1 of potential inventions since any particular combination of a particular FGF21 molecule, a particular linker and a particular antibody (thousands of possibilities) could be considered a separate potential invention **which is not linked by a single**

general inventive concept to the other thousands of possibilities. However, for the sake of efficiency, a preliminary opinion will be given for the complete group 1 of potential inventions.

Re Item V (For inventions 1, 4, 10, 11 and 12)

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Invention 1

Lack of inventive step

- 13 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because **the subject-matter of claims 1-31 and 34-38 does not involve an inventive step** in the sense of Article 33(3) PCT.

Starting from FGF21-Fc fusions as closest prior art

- 13.1 D1 discloses a composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the Fc portion **or** (emphasis added) an immunoglobulin to provide a fusion protein with long circulating half-life (see page 1, last paragraph). D1 does not explicitly disclose that the FGF21 molecule is covalently attached to the combining site of an antibody. Several embodiments refer to the use of the Fc portion of an immunoglobulin fused to FGF21 via a linker (see page 2, lines 13-21, or see Table 5, on page 30). Thus, even if D1 would cover attachment to any part of the antibody, the subject-matter of claim 1 it is considered novel over D1.

D2 and D3 also disclose a FGF-21-Fc fusion protein (see e.g. example 8 of D3 or page 31 of D2). D2 further discloses fusion proteins of FGF21 mutants (designed to modulate stability and solubility) and Fc, (see e.g. example 20).

- 13.2 Each of D1, D2 or D3 could be considered as the closest prior art. The technical problem in view of any of D1-D3 can be considered as the provision of alternative FGF21-antibody conjugates.

- 13.3 The solution of claim 1 is to covalently attach an FGF21 molecule to the combining site of an antibody or antigen binding portion thereof via a linker.
- 13.4 Said solution is not considered inventive for the following reasons:
- 13.5 The concept of covalently attaching a protein to the combining site of an antibody was well known. D4 (co-authored by the Applicant of the present application) discloses compositions comprising a peptide bound by a linker to the combining site of an antibody (see abstract or see e.g. claim 7). This type of conjugate was later on denominated CovX-Body™ and examples of said conjugates are disclosed in other documents (see e.g. figure 1 of D7, or abstracts of D8, D9, D10, D11, D12 or D13).
- 13.6 The present authority considers the fusion of a protein or peptide of interest (in claim 1 of the present application an FGF21 molecule) to the combining site of an antibody obvious to the skilled person, as the advantages of said "CovX-Bodies" were known to the skilled person. Thus, claim 1 of the present application is not considered inventive.
- 13.7 **Dependent claims 2-31 and 34-38 are also not considered inventive.** Attaching a moiety to prolonge the half-life to residue 79 of SEQ ID NO: 1 (present claim 2) is e.g. disclosed in D5. Modifications at FGF21 residues 125 and 129 are also disclosed in e.g. claims 103 and 105 of D6. The linkers also appear standard in the art: documents D4, D11, D12 or D13 disclose thousands of possible linkers overlapping with the linkers claimed in claims 4-31 of the present application (see e.g. pages 63 to 139 of D4). Even the use of the aldolase antibody, and in particular the humanized version of mouse 38C2 antibody was known (see e.g. D14) even in the context of CovX-Bodies (see e.g. SEQ ID NO: 11 of D12, corresponding to the light chain of humanized 38C2 antibody, is identical to SEQ ID NO: 25 of the present application; SEQ ID NO: 1 of D11 is identical to SEQ ID NO: 25 of the present application; SEQ ID NO: 40 of D4 is identical to SEQ ID NO: 25 of the present application). Hundreds of mutants of FGF21 have been disclosed in the prior art: see D5, D6 or D15. For example, D5 even discloses the FGF21 D79C mutant which is identical to SEQ ID NO: 13 of the present application.

Starting from CovX-Body format as closest prior art

- 13.8 For the sake of completeness it is here noted that alternatively the closest art could be considered a document disclosing a CovX-Body format, e.g. D4, D7, D8, D9, D10, D11, D12 or D13. Starting from any of said documents, the technical problem would have been to provide alternative CovX-Bodies targeted to different factors. In view of the known functions of FGF21 and of the fact that FGF21-Fc were disclosed in D1, D2 and D3 to show increased half life, it would have been obvious to the skilled person to generate CovX-bodies targeting FGF21 and he would have had a very high expectation of success since it was a standard methodology.

Only a particular conjugate which provided an unexpected effect could be considered inventive

- 13.9 The present authority is unable to find evidence in the present application for any unexpected effect for any particular conjugate, i.e. any effect which goes beyond what the skilled person would expect of a CovX-Body. **If a particular combination of a particular FGF21 mutant, a particular linker and a particular antibody all linked at particular positions would provide an unexpected effect, said particular conjugate could be considered inventive.**

Remark on method of treatment

- 14 Claim 37 refers to a method of treating diabetes, claim 38 refers to the use of a composition in the preparation of a medicament to treat diabetes. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step, of claims 37 and 38 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.

Re Item VI

Certain documents cited

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (<i>valid claim</i>) (day/month/year)
WO2012/007896	19/01/2012	11/07/2011	12/07/2010

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 15 The incredibly broad claims referring to the linkers (amounting to thousands of possibilities) are not meeting the conciseness requirements of Article 6 PCT.

Invention 4

Lack of novelty

- 16 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because **the subject-matter of claim 32 and 36-38 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.**
- 16.1 Claim 32 (with regard to invention 4) refers to a composition **comprising** a FGF21 molecule covalently connected to a half-life-increasing moiety at a linking residue located at residue number 129 according to the numbering of SEQ ID NO: 1.
- 16.2 **D17** discloses the mutants A129T and A129S (see page 138, lines 1 and 2, referring to SEQ ID NOs: 259 and 260). The aim of said mutations is to introduce new glycosylation sites not present in the wild type FGF (see e.g. [0115] and [0119]). Thus, D17 discloses the introduction of mutants having SEQ ID NO: 259 and 260 into FGF21 to produce the FGF21 mutants having said additional glycosylation sites (see last lines of [0037], [0038] or [0039]).

One embodiment disclosed is to link via said additional glycosylation a modifying group such as PEG (see [0040]). The addition of PEG does increase the half-life (see [0418]). **Said PEG-glycoconjugated FGF21 mutant comprising A129T and A129S and the use thereof renders present claims 32 and 36-38 not novel.**

Furthermore, on paragraph [0321] it is disclosed how said additional glycosylation is used for preparing a FGF conjugate comprising a polymer which increases the circulatory half-life of the FGF protein. Though scheme 3 on page 90 is exemplified for a FGF20 mutant, it is said to be valid for FGF-21 (see page 90, lines 16-18). **Said polymer-glycoconjugated FGF21 mutant comprising A129T and A129S and the use thereof renders also present claims 32 and 36-38 not novel.**

- 16.3 **D5** discloses muteins of FGF-21 which enhanced pharmaceutical stability and thus increased half-life comprising at least two substitutions to cysteine, one of them being alanine 129 (see e.g. page 8, lines 14 to 24). The incorporation of the 2 Cys residues provides thiol groups to which PEG can be attached resulting in PEGylated FGF-21 having increased half-life (see page 7, lines 15-21). In view of the wording of present claim 32 ("comprising") a FGF21 mutant comprising Ala129Cys and other mutation to Cys is considered prejudicial to the novelty of claim 32 of the present application. The same applies to pharmaceutical compositions and uses thereof. Thus, **D5 also renders not novel present claims 32 and 36-38.**
- 16.4 The FGF21 mutant comprising at least two modifications to cysteine, one of the possibilities being at alanine 129 is also disclosed in D1 (see section bridging pages 8 and 9), D2 (see claim 1) or D6 (see e.g. paragraph [33] which also cited D5). Thus **D1, D2 and D6 are also prejudicial to the novelty of claims 32 and 36-38** for the same reasons as discussed in section 16.3 above.

Remark on method of treatment

- 17 Claim 37 refers to a method of treating diabetes, claim 38 refers to the use of a composition in the preparation of a medicament to treat diabetes. See remark on section 14 of invention 1 (above).

Inventions 10, 11 and 12, grouped now under one single invention

- 18 The prior art disclosed mutants comprising A129C but not in isolation, said mutants A129C were combined with other mutations to Cysteine at at least a second FGF21 position (see D5, page 8, lines 14,15 and 24, and see D18, claim 15). **The subject-matter of inventions 10-12 (claims 33 and 36-38, all partially) is therefore novel (Article 33(2) PCT).**
- 19 In view of D5 or D18 (each could be considered as the closest prior art), the problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of alternative FGF21 mutants.
- 20 The solution to this problem proposed in inventions 10-12 of the present application (claims 33 and 36-38, all partially) is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:
- 20.1 The present application discloses that **"FGF21 Δ H-A129C was surprisingly one of the most stable mutants and the best position tested for antibody conjugation"** (see lines bridging pages 68 and 69)". This effect is disclosed to be unexpected and a putative explanation is given for the advantageous properties of A129C (see page 69, lines 1 to 16). Although said mutant also comprises the Δ H mutation, the effect in conjugation and stability is due to the A129C mutation since the conjugation is at that residue (see page 69, lines 14-16).

Since SEQ ID NO: 8, 9 and 10 of the present application comprise said A129C and not other cysteine substitutions, **said three particular SEQ ID NOs: 8, 9 and 10 are considered inventive in view of the unexpected effects just discussed.** A pharmaceutical composition (claim 36) and the medical use of said compositions (claims 37 and 38) are also considered inventive since they depend on SEQ ID NOs: 8, 9 and 10.

Remark on method of treatment

- 21 Claim 37 refers to a method of treating diabetes, claim 38 refers to the use of a composition in the preparation of a medicament to treat diabetes. See remark on section 14 of invention 1 (above).

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-bravets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC 71671A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2011/054874	International filing date (<i>day/month/year</i>) 02/11/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 05/11/2010
Applicant COVX TECHNOLOGIES IRELAND, LTD.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 11 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2011/054874

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2011/054874

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-31, 34, 35(completely); 32, 33, 36-38(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/054874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K14/50 C07K16/40
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/113606 A2 (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; MILLICAN ROHN LEE JUNIOR [U] 1 December 2005 (2005-12-01)	32,36-38
Y	the whole document	1-31, 34-38
X	WO 2009/149171 A2 (AMGEN INC [US]; BELOUSKI EDWARD JOHN [US]; ELLISON MURIELLE MARIE [US]) 10 December 2009 (2009-12-10)	26-38
Y	the whole document	1-31, 34-38
Y	WO 2004/110472 A2 (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; MILLICAN ROHN LEE JR [US];) 23 December 2004 (2004-12-23)	1-31, 34-38
	the whole document	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 May 2012

Date of mailing of the international search report

08/05/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/054874

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/094269 A2 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; BRADSHAW CURT W [US]; DOPPALAPUDI) 8 September 2006 (2006-09-08) the whole document	1-31, 34-38
X	----- WO 2005/091944 A2 (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; RATHNACHALAM RADHAKRISHNAN) 6 October 2005 (2005-10-06) the whole document	32,36-38
Y	----- WO 2008/121563 A2 (AMBRX INC [US]; CUJEC THOMAS P [US]; MARIANI ROBERTO [US]; HAYS PUTNAM) 9 October 2008 (2008-10-09) the whole document	1-31, 34-38
Y	----- DOPPALAPUDI ET AL: "Chemically programmed antibodies: Endothelin receptor targeting CovX-Bodies(TM)", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 17, no. 2, 11 January 2007 (2007-01-11), pages 501-506, XP005827262, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2006.10.009 the whole document	1-31, 34-38
Y	----- MURPHY R E ET AL: "Combined use of immunoassay and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry for the detection and identification of metabolites from biotherapeutic pharmacokinetic samples", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, NEW YORK, NY, US, vol. 53, no. 3, 2 November 2010 (2010-11-02), pages 221-227, XP027147778, ISSN: 0731-7085 [retrieved on 2010-05-23] the whole document	1-31, 34-38
Y	----- HUANG HANHUA ET AL: "Angiopoietin-2 antagonistic CovX-Body TM inhibits tumor growth and reduces microvessel density", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 48, 1 April 2007 (2007-04-01), page 509, XP001536926, ISSN: 0197-016X the whole document	1-31, 34-38
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/054874

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROSEN L S ET AL: "First-in-human dose-escalation safety and PK trial of a novel intravenous humanized monoclonal CovX body inhibiting angiopoietin 2. Abstract 2524", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US , vol. 28, no. 15 20 May 2010 (2010-05-20), page 1, XP002663786, ISSN: 0732-183X Retrieved from the Internet: URL:http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/28/15_suppl/2524?sid=e726c48d-a861-4011-b449-b0f58a4956ba [retrieved on 2011-11-17] the whole document	1-31, 34-38
Y	----- WO 2009/136352 A1 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; DOPPAPALUDI VENKATA RAMANA [US]; L) 12 November 2009 (2009-11-12) the whole document	1-31, 34-38
X	----- WO 2008/056346 A2 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; BRADSHAW CURT [US]; BHAT ABHIJIT []) 15 May 2008 (2008-05-15) the whole document	1-31, 34-38
Y	----- WO 2008/081418 A1 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; BRADSHAW CURT [US]; SAKAMURI SUKUM) 10 July 2008 (2008-07-10) the whole document	1-31, 34-38
Y	----- RADER C ET AL: "A Humanized Aldolase Antibody for Selective Chemotherapy and Adaptor Immunotherapy", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 332, no. 4, 26 September 2003 (2003-09-26), pages 889-899, XP004454300, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00992-6 the whole document	1-31, 34-38
Y	----- WO 2010/065439 A1 (LILLY CO ELI [US]; BALDWIN DAVID BRUCE [US]; DICKINSON CRAIG DUANE [US]) 10 June 2010 (2010-06-10) the whole document -----	1-31, 34-38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/054874

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2012/007896 A1 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; BHAT ABHIJIT SURESH [US]; BRADSHAW) 19 January 2012 (2012-01-19) the whole document -----	1-31, 34-38
X	WO 2006/050247 A2 (NEOSE TECHNOLOGIES INC [US]; DEFREES SHAWN [US]) 11 May 2006 (2006-05-11) the whole document -----	32,36-38
A	WO 2005/061712 A1 (LILLY CO ELI [US]; BEALS JOHN MICHAEL [US]; FRYE CHRISTOPHER CARL [US]) 7 July 2005 (2005-07-07) the whole document -----	32,33
X,P	WO 2010/129600 A2 (AMGEN INC [US]; BELOUSKI EDWARD JOHN [US]; ELLISON MURIELLE MARIE [US]) 11 November 2010 (2010-11-11) the whole document -----	32,36-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/054874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005113606	A2	01-12-2005	AT 444306 T 15-10-2009
		CA 2565300 A1 01-12-2005	
		DK 1751184 T3 23-11-2009	
		EP 1751184 A2 14-02-2007	
		EP 2194064 A1 09-06-2010	
		ES 2332100 T3 26-01-2010	
		JP 2008506635 A 06-03-2008	
		PT 1751184 E 10-11-2009	
		SI 1751184 T1 29-01-2010	
		US 2007237768 A1 11-10-2007	
		WO 2005113606 A2 01-12-2005	
WO 2009149171	A2	10-12-2009	AR 072009 A1 28-07-2010
		AU 2009256232 A1 10-12-2009	
		CA 2726589 A1 10-12-2009	
		CN 102143758 A 03-08-2011	
		CO 6341566 A2 21-11-2011	
		EA 201001883 A1 30-06-2011	
		EP 2296690 A2 23-03-2011	
		JP 2011523561 A 18-08-2011	
		KR 20110025810 A 11-03-2011	
		MA 33142 B1 01-03-2012	
		PE 02532010 A1 10-04-2010	
		TW 201010715 A 16-03-2010	
		US 2009305986 A1 10-12-2009	
		US 2012003216 A1 05-01-2012	
		US 2012087920 A1 12-04-2012	
		US 2012093815 A1 19-04-2012	
		WO 2009149171 A2 10-12-2009	
WO 2004110472	A2	23-12-2004	AT 385806 T 15-03-2008
		AU 2004247042 A1 23-12-2004	
		BR PI0411112 A 18-07-2006	
		CA 2526169 A1 23-12-2004	
		CN 1802167 A 12-07-2006	
		DE 602004011770 T2 05-02-2009	
		DK 1641483 T3 02-06-2008	
		EP 1641483 A2 05-04-2006	
		ES 2298785 T3 16-05-2008	
		JP 2007505643 A 15-03-2007	
		MX PA05013564 A 09-03-2006	
		PT 1641483 E 29-04-2008	
		SI 1641483 T1 31-08-2008	
		WO 2004110472 A2 23-12-2004	
WO 2006094269	A2	08-09-2006	AU 2006218437 A1 08-09-2006
		CA 2598833 A1 08-09-2006	
		EP 1853294 A2 14-11-2007	
		EP 2292248 A2 09-03-2011	
		JP 2008531734 A 14-08-2008	
		KR 20070108958 A 14-11-2007	
		US 2008152660 A1 26-06-2008	
		US 2011087010 A1 14-04-2011	
		WO 2006094269 A2 08-09-2006	
WO 2005091944	A2	06-10-2005	CA 2557782 A1 06-10-2005
		EP 1735340 A2 27-12-2006	
		JP 2007531715 A 08-11-2007	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/054874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2007265200 A1	15-11-2007
		WO 2005091944 A2	06-10-2005
WO 2008121563 A2	09-10-2008	AU 2008232937 A1	09-10-2008
		CA 2682147 A1	09-10-2008
		EP 2068909 A2	17-06-2009
		JP 2010523084 A	15-07-2010
		KR 20100016014 A	12-02-2010
		US 2008255045 A1	16-10-2008
		US 2011172401 A1	14-07-2011
		WO 2008121563 A2	09-10-2008
WO 2009136352 A1	12-11-2009	AR 077522 A1	07-09-2011
		AU 2009245324 A1	12-11-2009
		CA 2722474 A1	12-11-2009
		CN 102164616 A	24-08-2011
		CO 6382178 A2	15-02-2012
		EP 2285415 A1	23-02-2011
		JP 2011522794 A	04-08-2011
		KR 20110004471 A	13-01-2011
		TW 201006496 A	16-02-2010
		US 2010003267 A1	07-01-2010
		WO 2009136352 A1	12-11-2009
WO 2008056346 A2	15-05-2008	AT 520712 T	15-09-2011
		AU 2007318912 A1	15-05-2008
		CA 2669207 A1	15-05-2008
		CN 101611053 A	23-12-2009
		DK 2089425 T3	10-10-2011
		EP 2089425 A2	19-08-2009
		EP 2368908 A2	28-09-2011
		JP 4897050 B2	14-03-2012
		JP 2010509315 A	25-03-2010
		KR 20090090331 A	25-08-2009
		NZ 576751 A	28-10-2011
		PT 2089425 E	17-10-2011
		US 2008166364 A1	10-07-2008
		WO 2008056346 A2	15-05-2008
WO 2008081418 A1	10-07-2008	AU 2008203641 A1	10-07-2008
		BR PI0806308 A2	06-09-2011
		CA 2674112 A1	10-07-2008
		EP 2118131 A1	18-11-2009
		JP 2010514835 A	06-05-2010
		KR 20090096498 A	10-09-2009
		NZ 577686 A	25-11-2011
		US 2009098130 A1	16-04-2009
		WO 2008081418 A1	10-07-2008
WO 2010065439 A1	10-06-2010	NONE	
WO 2012007896 A1	19-01-2012	NONE	
WO 2006050247 A2	11-05-2006	CA 2585758 A1	11-05-2006
		EP 1814573 A2	08-08-2007
		JP 2008518601 A	05-06-2008
		US 2008176790 A1	24-07-2008
		WO 2006050247 A2	11-05-2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/054874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date

WO 2005061712	A1	07-07-2005	AR 046877 A1 28-12-2005
			AU 2004303783 A1 07-07-2005
			BR PI0416683 A 30-01-2007
			CA 2549249 A1 07-07-2005
			CN 1890371 A 03-01-2007
			EA 200601121 A1 27-10-2006
			EP 1702067 A1 20-09-2006
			EP 2270163 A1 05-01-2011
			JP 4477013 B2 09-06-2010
			JP 2007535306 A 06-12-2007
			KR 20060135648 A 29-12-2006
			US 2007142278 A1 21-06-2007
			US 2009118190 A1 07-05-2009
			WO 2005061712 A1 07-07-2005

WO 2010129600	A2	11-11-2010	AU 2010246038 A1 01-12-2011
			CA 2760674 A1 11-11-2010
			EP 2427207 A2 14-03-2012
			US 2012052069 A1 01-03-2012
			WO 2010129600 A2 11-11-2010

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-31, 34, 35(completely); 36-38(partially)

A composition comprising a FGF21 molecule covalently attached to the combining site of an antibody or antigen binding portion thereof via a linker.

It is noted that further non unity is present within group 1 of potential inventions since any particular combination of a particular FGF21 molecule, a particular linker and a particular antibody (thousands of possibilities) could be considered a separate potential invention which is not linked by a single general inventive concept to the other thousands of possibilities. However, for the sake of efficiency, a preliminary opinion will be given for the complete group 1 of potential inventions.

2. claims: 32, 36-38(all partially)

A composition comprising a FGF21 molecule covalently connected to a half-life-increasing moiety at a linking residue number 79 according to the numbering of SEQ ID NO: 1.

3. claims: 32, 36-38(all partially)

A composition comprising a FGF21 molecule covalently connected to a half-life-increasing moiety at a linking residue number 125 according to the numbering of SEQ ID NO: 1.

4. claims: 32, 36-38(all partially)

A composition comprising a FGF21 molecule covalently connected to a half-life-increasing moiety at a linking residue number 129 according to the numbering of SEQ ID NO: 1.

5-15. claims: 33, 36-38(all partially)

A composition selected from SEQ ID NOs: 3 to 13, each of these FGF21 mutants being a potential separate invention.
