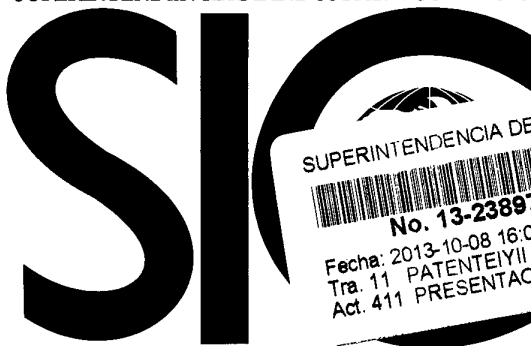




DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO

54. TITULO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL \_\_\_\_\_

71. SOLICITANTE \_\_\_\_\_ GENENTECH, INC.

DOMICILIO \_\_\_\_\_ SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO \_\_\_\_\_ JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

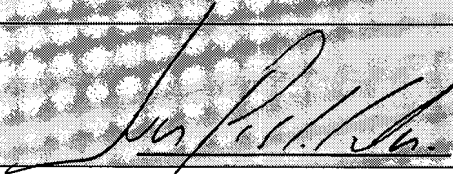
22. BOGOTÁ, D.C. \_\_\_\_\_

|                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <div>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</div> <div>de radicación</div> <div></div> <div>No. 13-238976- -00000-0000</div> <div>Fecha: 2013-10-08 16:06:46    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR<br/>Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 379 FASENACIONALI<br/>Act. 411 PRESENTACION    Folios: 125</div> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

AS. 125.956

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

|                                                                                                                              |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                            | TIPO DE SOLICITUD                                                                                                                             | <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención<br><input type="checkbox"/> Capítulo I | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad<br><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo II |
| 2                                                                                                                            | DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)                                                                                                        |                                                                                                 |                                                                                                           |
| Solicitud Internacional No.                                                                                                  |                                                                                                                                               | PCT/US2012/037964                                                                               | Fecha 15.05.2012                                                                                          |
| Publicación Internacional No.                                                                                                |                                                                                                                                               | WO 2012/158704                                                                                  | Fecha 22.11.2012                                                                                          |
| 3                                                                                                                            | TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)                                                                                    |                                                                                                 |                                                                                                           |
| AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO                                                                                      |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |
| 4                                                                                                                            | CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)                                                                                                             |                                                                                                 |                                                                                                           |
| 5                                                                                                                            | SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria |                                                                                                 |                                                                                                           |
| APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL                                                                                                     |                                                                                                                                               | NOMBRE                                                                                          | IDENTIFICACIÓN TIPO                                                                                       |
| GENENTECH, INC.                                                                                                              |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |
| 6                                                                                                                            | DATOS DEL SOLICITANTE                                                                                                                         |                                                                                                 |                                                                                                           |
| DIRECCIÓN 1 DNA Way, 94080                                                                                                   |                                                                                                                                               | No. TELÉFONO                                                                                    |                                                                                                           |
| CIUDAD South San Francisco                                                                                                   |                                                                                                                                               | CORREO ELECTRÓNICO                                                                              |                                                                                                           |
| DEPARTAMENTO/ESTADO CA                                                                                                       |                                                                                                                                               | NACIONALIDAD O CA                                                                               |                                                                                                           |
| PAÍS DE RESIDENCIA US                                                                                                        |                                                                                                                                               | LUGAR DE CONSTITUCIÓN                                                                           |                                                                                                           |
| 7                                                                                                                            | INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria                                                              |                                                                                                 |                                                                                                           |
| APELLIDOS                                                                                                                    |                                                                                                                                               | NOMBRES                                                                                         | NACIONALIDAD                                                                                              |
| 1. SONODA                                                                                                                    |                                                                                                                                               | Junichiro                                                                                       | JP                                                                                                        |
| 2. WU                                                                                                                        |                                                                                                                                               | Yan                                                                                             | US                                                                                                        |
| DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:                                                                                             |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |
| 8                                                                                                                            | DATOS INVENTOR (ES)                                                                                                                           |                                                                                                 |                                                                                                           |
| PAÍS RESIDENCIA                                                                                                              |                                                                                                                                               | DEPARTAMENTO/ESTADO                                                                             | CIUDAD DIRECCIÓN                                                                                          |
| 1. US                                                                                                                        |                                                                                                                                               | CA                                                                                              | South San Francisco c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080                                                 |
| 2. US                                                                                                                        |                                                                                                                                               | CA                                                                                              | South San Francisco c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080                                                 |
| OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)                                                                            |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |
| <input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria. |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |
| 9                                                                                                                            | <input type="checkbox"/> REPRESENTANTE LEGAL <input checked="" type="checkbox"/> APODERADO                                                    |                                                                                                 |                                                                                                           |
| APELLIDOS                                                                                                                    |                                                                                                                                               | NOMBRES                                                                                         | IDENTIFICACIÓN                                                                                            |
| CADENA SARMIENTO                                                                                                             |                                                                                                                                               | JUAN PABLO                                                                                      | C.C . 80.410.337 T.P . 57492                                                                              |
| DIRECCIÓN Calle 70A 4 41                                                                                                     |                                                                                                                                               | No. TELÉFONO 7442200                                                                            |                                                                                                           |
| CIUDAD Bogotá, D.C.                                                                                                          |                                                                                                                                               | CORREO ELECTRÓNICO                                                                              |                                                                                                           |
| PAÍS CO                                                                                                                      |                                                                                                                                               | No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL                                                     |                                                                                                           |
| 10                                                                                                                           | DECLARACIONES DE PRIORIDAD <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                 |                                                                                                 |                                                                                                           |
| (33) PAÍS DE ORIGEN                                                                                                          |                                                                                                                                               | CÓDIGO PAÍS                                                                                     | (31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)                                                                       |
| 1. US                                                                                                                        |                                                                                                                                               | US                                                                                              | 61/486,731 2011/05/16                                                                                     |
| 2. US                                                                                                                        |                                                                                                                                               | US                                                                                              | 61/536,936 2011/09/20                                                                                     |
| 3.                                                                                                                           |                                                                                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS</b>                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| <i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| 12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES</b>                                                                                                                                       |                                                                                                                                                            |                   |
| <i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| 13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>REDUCCIÓN DE TASAS</b>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                            |                   |
| <i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Micro, pequeñas y medianas empresas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Universidades públicas o privadas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Entidades sin ánimo de lucro <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| 14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA</b> <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet. |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO</b>                                                                                                                                                     | No. 13-77817, 13-90713, 13-86238                                                                                                                           | Fecha: 04.10.2013 |
| 16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL</b><br><i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i> |                                                                                                                                                            |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                            |                   |
| 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>ANEXOS</b>                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                            |                   |
| <b>Documentación Técnica</b><br><b>Solicitud Internacional en castellano</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                   | <b>Documentación Jurídica</b>                                                                                                                              |                   |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Descripción      N° de folios: 4-62                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                   | 9. <input checked="" type="checkbox"/> Poderes, si fuera el caso.                                                                                          |                   |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones      N° Reivindicaciones: 36                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                   | 10. <input checked="" type="checkbox"/> Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.                             |                   |
| 3. <input checked="" type="checkbox"/> Dibujos y/o figuras      N° folios: 68-96                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                   | 11. <input type="checkbox"/> Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. |                   |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/> Resumen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | 12. <input type="checkbox"/> Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.       |                   |
| 5. <input type="checkbox"/> Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                   | 13. <b>Reducción de tasas</b>                                                                                                                              |                   |
| 6. <input checked="" type="checkbox"/> Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                   | <b>Micro, pequeñas o medianas empresas</b>                                                                                                                 |                   |
| 7. <input type="checkbox"/> Arte final 12 x 12.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.                |                   |
| 8. <input type="checkbox"/> Anexo formato digital.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.                                                 |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <b>Universidades públicas o privadas</b>                                                                                                                   |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación                                                 |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <b>Entidades sin ánimo de lucro</b>                                                                                                                        |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> Copia de registro vigente en Cámara de comercio.                                                                                  |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> Hoja de información complementaria.                                                                                               |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> Otros, especificar: IPRP                                                                                               |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | 14. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.                                                    |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | 15. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.                                                                          |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | 16. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.                                       |                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                   | 17. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.                                                             |                   |

- (51) International Patent Classification:  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2012/037964

(22) International Filing Date:  
15 May 2012 (15.05.2012)

(25) Filing Language:  
English

(26) Publication Language:  
English

(30) Priority Data:  
61/486,731 16 May 2011 (16.05.2011) US  
61/536,936 20 September 2011 (20.09.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR, US): GEN-ENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(71) Applicant (for AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR only): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SONODA, Junichiro [JP/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). WU, Yan [US/US]; c/o

Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

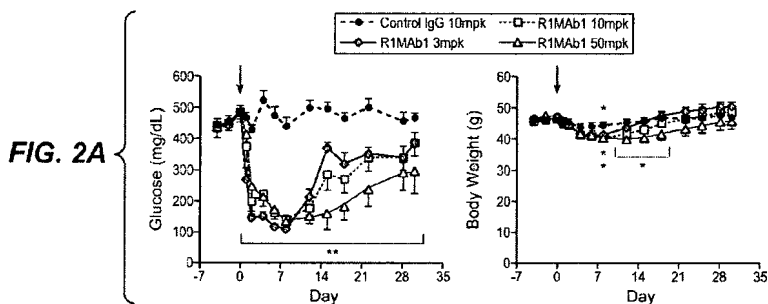
(74) Agents: KALINOWSKI, Grant et al.; Genentech, INC., 1 DNA Way, MS 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(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, 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).
- Published:

— with international search report (Art. 21(3))  
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: FGFR1 AGONISTS AND METHODS OF USE



(57) Abstract: The disclosure provides FGFR1 agonists, including agonistic anti-FGFR1 antibodies, and methods of using the same.

## AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO

### REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio a la prioridad de las solicitudes de patente de los Estados Unidos 61/486.731, presentada el 16 de mayo de 2011 y 61/536.936, presentada el 20 de septiembre de 2011, cuyos contenidos totales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a agonistas de FGFR1 y sus métodos de uso.

### ANTECEDENTES

La incapacidad de controlar niveles de glucosa en sangre subyace a una variedad de condiciones metabólicas. La diabetes es un síndrome hiperglucémico que resulta de un defecto en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (diabetes de tipo 1 y de tipo 2) y menor efectividad a insulina en estimular la captación de glucosa del músculo esquelético y restricción de la producción de glucosa hepática (diabetes de tipo 2). La diabetes es una enfermedad muy prevalente y, a pesar de las opciones terapéuticas disponibles para algunos diabéticos, hay una necesidad urgente para terapias adicionales.

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es un miembro de la subfamilia de FGF endocrina, que incluye FGF19 y FGF23 y se identificó como un agente potencial modificador de enfermedades para revertir la obesidad y la hepatosteatois inducida por obesidad y por hiperglucemia (ver, por ejemplo, Kharitononkov y Larsen, *Trends Endocrinol. Metab.* 22(3):81–6 (2011); Kharitononkov et al., *J. Clin. Invest.* 115: 1627–35 (2005); WO 2010/042747). La proteína endocrina FGF21 se une con tres receptores FGF (FGFRs 1–3) y mejora la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2 por estos receptores junto con su correceptor beta-Kloto unido a membrana. Sin embargo, su desarrollo se ha visto obstaculizada por su pobre farmacocinética y baja comprensión del mecanismo biológico de acción. Los anticuerpos antagonistas de anti-FGFR1 también fueron propuestos para el tratamiento de diabetes (documento WO 2005/037235). Sin embargo, no se ha descubierto la identidad de cuál de los tres FGFR media la actividad metabólica beneficiosa de FGF21.

## SÍNTESIS

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la activación de FGFR1 mejora la diabetes. La invención proporciona agonistas de FGFR1, incluyendo anticuerpos agonistas de anti-FGFR1 y sus métodos de uso.

En un aspecto, la invención proporciona método de tratamiento de una enfermedad o condición metabólica en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un agonista del receptor 1 del factor de crecimiento anti-fibroblastos (FDFR1), en donde la enfermedad metabólica está seleccionada del grupo que consiste en: síndrome de ovario poliquístico (PCOS), síndrome metabólico (MetS), obesidad, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado hepático no alcohólica (NAFLD), hiperlipidemia, hipertensión, diabetes de tipo 2, no diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmune latente (LAD) y diabetes de inicio en la madurez para los jóvenes (MODY). En algunas formas de realización, el agonista de FGFR1 no activa FGFR2 o FGFR3. En algunas formas de realización, el agonista de FGFR1 es un anticuerpo anti-FGFR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-FGFR1 tiene dos sitios de unión con FGFR1, por ejemplo, un anticuerpo de longitud total o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une con péptido N.º 26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) o péptido N.º 28 FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29). En algunas formas de realización, el anticuerpo se une tanto con el péptido N.º 26 como con el péptido N.º 28. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-FGFR1 se une tanto con FGFR1b como con FGFR1c. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico también se une con beta-Kloto.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une con FGFR1, en donde el anticuerpo es un agonista de la actividad de FGFR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo no es un agonista de FGFR2 o FGFR3. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDAWVHYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20), (b) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23) y (c)

HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en  $X_1X_2IX_3PX_4DGX_5TX_6YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es A o G,  $X_2$  es D o E,  $X_3$  es D o Y,  $X_4$  es N o Y,  $X_5$  es A o D y  $X_6$  es D o Y (SEQ ID NO: 24) y  $X_1IX_2PX_3DGX_4TX_5YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es D o E,  $X_2$  es D o Y,  $X_3$  es N o Y,  $X_4$  es A o D y  $X_5$  es D o Y (SEQ ID NO: 25). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos  $GFTFX_1X_2X_3X_4IX_5$ , en donde  $X_1$  es S o T,  $X_2$  es N o S,  $X_3$  es N o T,  $X_4$  es W o Y,  $X_5$  es H o S (SEQ ID NO: 26), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en  $X_1X_2IX_3PX_4DGX_5TX_6YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es A o G,  $X_2$  es D o E,  $X_3$  es D o Y,  $X_4$  es N o Y,  $X_5$  es A o D y  $X_6$  es D o Y (SEQ ID NO: 24) y  $X_1IX_2PX_3DGX_4TX_5YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es D o E,  $X_2$  es D o Y,  $X_3$  es N o Y,  $X_4$  es A o D y  $X_5$  es D o Y (SEQ ID NO: 25) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDWWHYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSTWIS (SEQ ID NO: 7), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GEIDPYDGDITYADSVKG (SEQ ID NO: 10) y EIDPYDGDITYADSVKG (SEQ ID NO: 11) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16) y SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSNNYIH (SEQ ID NO: 8), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ADIYPNDGDTDYADSVKG (SEQ ID NO: 12) y DIYPNDGDTDYADSVKG (SEQ ID NO: 13) y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos EHFDWWHYVMDY (SEQ ID NO: 18). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSNWIS (SEQ ID NO: 9), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AEIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 14) y EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 15) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20). En algunas formas de realización, el anticuerpo

también comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 21); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 22); y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3 y 4. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 6.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-FGFR1 tiene dos sitios de unión con FGFR1, por ejemplo, un anticuerpo de longitud total o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo multiespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo también se une con beta-Kloto. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunas formas de realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención. En algunas formas de realización, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 21. En algunas formas de realización, la invención proporciona un método de producción de un anticuerpo que comprende el cultivo de la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 22 de modo de producir el anticuerpo. En algunas formas de realización, el método también comprende la recuperación del anticuerpo de la célula huésped.

En algunas formas de realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para usar como un medicamento. En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención es para usar en el tratamiento de una enfermedad o condición metabólica seleccionada del grupo que consiste en: síndrome de ovario poliquístico (PCOS), síndrome metabólico (MetS), obesidad, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado hepático no alcohólica (NAFLD), hiperlipidemia, hipertensión, diabetes de tipo 2, no diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmune latente (LAD) y diabetes de inicio en la madurez para los jóvenes (MODY). En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención es para usar en la sensibilización de un individuo a la insulina.



En algunas formas de realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento. En algunas formas de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o condición metabólica seleccionada del grupo que consiste en: síndrome de ovario poliquístico (PCOS), síndrome metabólico (MetS), obesidad, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado hepático no alcohólica (NAFLD), hiperlipidemia, hipertensión, diabetes de tipo 2, no diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmune latente (LAD) y diabetes de inicio en la madurez para los jóvenes (MODY). En algunas formas de realización, el medicamento es para sensibilizar a un individuo a la insulina.

En algunas formas de realización, la invención proporciona a método de tratamiento de diabetes en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención. En algunas formas de realización, el método también comprende la administración al individuo de otro agente para tratar diabetes, siempre que el otro agente no sea insulina. En algunas formas de realización, el método también comprende la administración al individuo de un agente para tratar enfermedad cardiovascular.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A muestra una medición de ELISA de la unión de anticuerpos anti-FGFR1 con fragmentos ECD de FGFR purificado.

La Figura 1B muestra constantes de unión por resonancia de plasmón en la superficie para R1MAb1 y R1MAb2.

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

La Figura 1D muestra un experimento similar a 1C excepto por células L6 que expresan tanto FGFR1c como KLB.

La Figura 1E muestra un experimento similar a 1C excepto porque se usaron células HEK293.

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

La Figura 1G muestra WAT recolectado de ratones C57BL/6 delgados en el tiempo indicado después de una inyección i.p. a 1 mpk de R1Mab (+) o IgG (-) de control y se sometió a análisis de western blot.

La Figura 2A muestra glucosa en sangre (izquierda) y peso corporal (derecha) de ratones db/db después de una inyección única i.p. (flecha) de R1Mab1 o IgG de control en las dosis indicadas. La significancia se observó en glucosa (vs IgG de control) entre el día 1-30 para todos los grupos y en peso (vs IgG de control) el día 8 para todos los grupos y entre el día 12-18 para el grupo 50. N = 6~14, \*p<0,05, \*\*p<0,01.

La Figura 2B muestra glucosa en sangre en ratones alimentados al azar y que ayunaron durante la noche (superior) y niveles séricos de insulina después de un ayuno durante la noche y 30 minutos después de la inyección i.p. de 1 g/kg de glucosa (inferior). N = 6~14, \*p<0,05, \*\*p<0,01.

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

La Figura 2D muestra la ingesta de comida (izquierda), glucosa en sangre (centro) y peso corporal (derecha) de ratones db/db después de una inyección única i.p. de R1Mab1 o IgG de control en dosis 1 mpk. PF: alimentados de a pares en el grupo tratado con R1Mab. N = 7. N.º p<0001 (vs IgG), \*p<0,001 (vs PF-IgG).

La Figura 2E muestra la cuantificación del área insulinopositiva en secciones de páncreas fijadas. Los tejidos se recolectaron el día 7 después de la inyección única i.p. de 3 mpk (izquierda) o 1 mpk (derecha) R1Mab1 y se tiñeron respecto de insulina y glucagón. N = 4~7. \*\*p<0,002. \*\*\*p<0,001.

La Figura 3A muestra activación de la señalización de MAPK en tejidos de ratón. Los tejidos indicados se recolectaron a los 15 minutos (25 µg/ratón FGF21: arriba) o 1 hora (1 mpk R1Mab1: abajo) después de la inyección i.p. de ratones C57BL/6 delgados y se sometieron a análisis de Western blot. Se usaron PBS (arriba) e IgG de control (abajo) como un control negativo.

Las Figuras 3B-D muestran tinción representativa de H&E de hígado (B), lípidos hepáticos (C) y lípidos séricos (D). Las muestras se recolectaron el día 7 después de la inyección i.p. única de 1 mpk de R1Mab1. Los ratones de control se alimentaron de a pares para normalizar el peso corporal. N = 7, \*p<0,05, \*\*p<0,001.

La Figura 3E muestra parámetros metabólicos de ratones ob/ob o ap2-SREBP1c (srebp) transgénicos inyectados con 1 mpk de Ab. Los grupos de control se alimentaron de a pares para normalizar el peso corporal (Fig. S7). La glucosa y la insulina para el cálculo de HOMA-IR se midieron el día 3 después de 3 horas de ayuno. GTT se realizó con 1 g/kg de inyección i.p. de glucosa el día 4 después de ayuno durante la noche. El peso del tejido se midió el día 5. N = 7, \*p<0,05, \*\*\*p<0,01.

La Figura 3F muestra parámetros metabólicos de ratones ap2-SREBP implantados por vía subcutánea con una bomba osmótica para infundir FGF21 (12 ng/día). ITT con 1 U/kg de inyección i.p. de insulina se realizó el día 4. Se recolectó suero el día 6. N = 6~8.

La Figura 4A muestra expresión de mRNA (rojo: mayor expresión y azul: menor expresión) en BAT para genes que pertenecen a la vía indicada de KEGG. Las muestras se recolectaron el día 4 después de la inyección única i.p. de 1 mpk de R1MAb1 o ratones alimentados de a pares inyectados con IgG de control.

La Figura 4B muestra expresión de mRNA en BAT por qPCR. N = 6, \*p<0,05, \*\*p<0,001.

La Figura 4C muestra un ensayo de luciferasa en células HEK293. El gráfico muestra que tanto FGF21 como R1MAb1 inducen la transcripción de un gen informante de luciferasa manejado por UAS en células HEK293 a través de CREB fusionado con el dominio de unión de ADN GAL4 (GAL-CREB) (dos paneles izquierdos) o de un gen informante de luciferasa manejado por CRE (dos paneles derechos), de un modo dependiente de la dosis. Algunas células también se cotransfectaron para expresar FGFR1c y KLB (rojo; curva de arriba en gráficos). Los resultados representan el promedio de experimentos por triplicado para la actividad de luciferasa normalizada por actividad de renilla.

La Figura 4D muestra WAT recolectado 15 minutos después de la inyección i.v. con 25 µg de FGF21 (+) o PBS (-) y se sometió a análisis de western blot.

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

La Figura 4F muestra un modelo para la vía de señalización a través de la cual FGF21 y R1MAb activa el programa PGC-1alfa en tejidos adiposos.

La Figura 5 muestra la actividad agonista independiente de heparina y dependiente de FGFR1 de R1MAb1. Ensayo de GAL-Elk1 luciferasa en células HEK293. Las células se cotransfectaron con o sin un vector de expresión para FGFR1c tal como se indicó, junto con GAL-Elk1, SV40-renilla Luciferasa e

informante de luciferasa de luciérnaga que responde a Gal. Las células transfectadas se incubaron en medio que contenía mayores concentraciones de R1Mab1 con o sin 25 mg/L de heparina porcina tal como se indicó durante 6 horas antes del ensayo de luciferasa. La activación transcripcional se evaluó por medio de la actividad relativa de luciferasa de luciérnaga normalizada por la actividad de renilla y se expresó como unidad de luciferasa relativa (RLU).

La Figura 6A muestra la ingesta de comida (izquierda), peso corporal (centro) y glucosa en sangre (derecha) de ratones db/db después de una inyección única i.p. de R1Mab2 o IgG de control en dosis de 3 mpk el día 0. Los ratones de control se alimentaron de a pares (PF) para ajustar la ingesta de alimento hasta el día 11. En el día 11, la ingesta de comida de ratones tratados con R1Mab2 retornaron a normal y así, todos los ratones se alimentaron ad libitum después del día 11 (AL). N = 7~12.  $p < 0,001$ .

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

La Figura 6C muestra GTT conducido usando los mismo ratones el día 28.

La Figura 6D muestra ITT conducido usando los mismos ratones el día 37.

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

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

La Figura 7C muestra GTT conducido con ratones alimentados con HFD usados en S3B el día 8 después de la inyección Ab. Los ratones se inyectaron i.p. con 1 g/kg de glucosa después de ayunar durante la noche. Los pesos corporales medios eran de  $28,6 \pm 0,6$  (R1Mab1) y  $32,1 \pm 0,8$  (IgG de control) ( $p < 0,01$ ). N=7.

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

La Figura 8A muestra la tinción representativa de isleta pancreática en ratones db/db analizados en la Fig. 4E. Rojo: Insulina, verde: glucagón, azul: núcleos. Observar que R1Mab no afecta la morfología general de isletas.

La Figura 8B muestra la distribución del área positiva de insulina (%) en cada isleta en cada animal.

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

La Figura 9B muestra un ensayo de luciferasa a base de GAL–Elk en células HEK293 que expresan FGFR1c para comparar R1MAb2 y el mutante de ADN de R1MAb2 (R1MAb2 DANA).

La Figura 9C muestra glucosa en sangre de ratones db/db antes (pre) y el día 7 después de la inyección i.p. de Ab indicado a 1 mpk. Los ratones de control eran alimentados de a pared para normalizar el peso corporal.

La Figura 9D muestra un ELISA que mide la unión del anticuerpo con fragmentos de ECD de FGFR purificado. OA–R1MAb1: versión OA de R1MAb1.

La Figura 9E muestra un ensayo de luciferasa en base a GAL–Elk similar a S5B.

La Figura 9F muestra el análisis de western blot de adipocitos 3T3–L1 tratados con la proteína indicada a 0,5 µg/ml durante el tiempo indicado.

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

La Figura 9H muestra lípidos hepáticos y séricos de muestras tomadas el día 7 después de la inyección Ab. N = 7. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,0005$  (vs IgG de control).

La Figura 10 muestra la expresión de mRNA de las isoformas KLB y FGFR en el hígado y WAT. Los ratones alimentados con comida y los ratones C57BL/6 alimentados con HFD tenían 25 semanas de edad. Los ratones alimentados con HFD estaban en HFD durante 21 semanas. \* $p < 0,05$  o \*\* $p < 0,001$ . N = 6.

La Figura 11 muestra el requerimiento para la función adiposa normal para la actividad de FGF21 y R1MAb. La ingesta de alimento (izquierda), glucosa en sangre (centro) y peso corporal (derecha) de ob/ob o ratones transgénicos ap2–srebp1c después de una inyección única i.p. de R1MAb1 o IgG de control en dosis de 1 mpk el día 0. Mismos ratones descritos en la Fig. 3E. N = 7. N.º  $p < 0,001$  (vs IgG), \* $p < 0,001$  (vs PF–IgG). La medición del postratamiento se realizó 1 día después de la inyección.

La Figura 12A muestra un ensayo de luciferasa a base de células en HEK293. Las células se cotransfectaron con un vector de expresión para una

proteína de fusión GAL indicada, SV40–renilla Luciferasa e informante de luciferasa que responde a GAL. Ciertas células también se cotransfectaron con el vector de expresión para KLB, tal como se indicó. Las células transfectadas se incubaron con medios que contenían medio acondicionado para células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para FGF21 o vector vacío de control tal como se indicó. Después de 6 horas de incubación, las células se sometieron a ensayos de luciferasa. La activación transcripcional se evaluó por medio de la actividad relativa de luciferasa de luciérnaga normalizada por la actividad de renilla luciferasa y expresada como inducción en veces.

La Figura 12B muestra un ensayo de luciferasa similar, donde algunas células se cotrataron con el siguiente ligando del receptor nuclear: 1MM Wi14643 (PPAR $\alpha$ ), 5nM GW101516 (PPAR $\gamma$ ), 50 nM de rosiglitazona (PPAR $\gamma$ ), 50 nM de T0901317 (LXR $\alpha$ ), 5 nM de T3 (TR $\beta$ ), 30 MM de CDCA (FXR). Observar que FGF21 no afectó la actividad de ninguno de los receptores nucleares ensayados aquí con o sin tratamiento de ligando afín.

La Figura 12C muestra análisis de western blot de células HEK293 tratadas con FGF21 a 0,5  $\mu$ g/ml durante 10 minutos. Algunas células se pretrataron con un inhibidor para FGFR (100 nM de PD173074), mTOR (100 nM de rapamicina) MEK1/2 (10  $\mu$ M de U0126), PI3K (1  $\mu$ M de wortmannina) tal como se indicó.

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

La Figura 13 muestra glucosa en sangre (arriba) y peso corporal (abajo) de ratones db/db después de una inyección única i.p. de R1MAb2 (rotulado como 182.2), R1MAb3 (rotulado como 182.5) o IgG de control (anti–Her2) en las dosis

indicadas. N = 6, \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005. R1MAb3 comprende VH que comprende SEQ ID NO: 6 y VH que comprende SEQ ID NO: 4.

La Figura 14A muestra la ingesta acumulativa de comida, glucosa en sangre y cambio de peso corporal de ratones magros C57BL/6 después de una inyección única intraperitoneal de R1MAb1 o IgG de control a 0,5 mpk. Los ratones también se implantaron por vía subcutánea con una minibomba osmótica el día 0 para infundir de forma continua (c.i.) FGF21 recombinante a 1,2 mpk/día o vehículo control (PBS). El día 3, los ratones ayunaron durante la noche para realizar la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) el día 4 (flecha).

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

La Figura 14C muestra análisis sérico de ratones mostrado en las Figs. 2C, S10A y S10B. Las muestras de suero se recolectaron el día 5 después de 4 h de ayuno. Los datos representan media  $\pm$  SEM con  $n = 6$  ratones por grupo;  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  vs. PBS (c.i.) + IgG de control, por test de Student de dos colas no apareado (n. s. = no significativo).

La Figura 15 muestra el análisis de expresión génica usando mRNA aislado de tejido hepático de ratones usados en las Figs. 2C y S10. Las muestras de tejido se aislaron el día 5 después de 4 h de ayuno. Los datos representan media  $\pm$  SEM con  $n = 6$  ratones por grupo;  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$  vs. PBS (c.i.) + IgG de control, por prueba de Student de dos colas no apareado (n. s. = no significativo).

La Figura 16 muestra el análisis de expresión génica usando mRNA aislado de tejido adiposo marrón de ratones usados en las Figs. 2C, S10 y S11. Las muestras de tejido se aislaron el día 5 después de 4 h de ayuno. Los datos representan media  $\pm$  SEM con  $n = 6$  ratones por grupo;  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$  vs. PBS (c.i.) + IgG control, por prueba de Student de dos colas no apareado (n. s. = no significativo).

La Figura 17A muestra resultados de ELISA midiendo la unión de anticuerpo con fragmentos biotinilados de péptido.

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

La Figura 17C muestra resultados de ELISA midiendo la unión de FGFR1 con rótulo His con la proteína FGF2 en presencia de diversas concentraciones de R1MAb1 o IgG de control. Los datos se expresan como % de enlace de FGFR1–His y representan media  $\pm$  SEM ( $n=3$ ).

La Figura 17D muestra la unión con FGF21 yodado con células HEK293 que expresan de forma estable tanto KLB como FGFR1c en presencia de diversas

concentraciones de R1MAb1 o FGF21 no rotulados (la reacción también contenía BSA (10 mg/ml) e IgG de control (350 mM) para bloquear la unión no específica. Los datos se expresan como % de FGF21 ligado de FGF21 total radiorrotulado en la reacción.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

### **I. DEFINICIONES**

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

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) y su compañero de unión (*por ejemplo*, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en la presente, la "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (*por ejemplo*, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y en general se puede representar con una constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por métodos comunes en la técnica, que incluyen los que se describen en la presente. Los ejemplos de realizaciones ilustrativas y específicas para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

The term "anti-FGFR1 agonist antibody" refers to an anticuerpo que es capaz de unir FGFR1 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como un agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a FGFR1. En una forma



de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-FGFR1 a una proteína no FGFR1 no relacionada es menor de aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a FGFR1 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a FGFR1 tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1\mu\text{M}$ ,  $\leq 100\text{ nM}$ ,  $\leq 10\text{ nM}$ ,  $\leq 1\text{ nM}$ ,  $\leq 0,1\text{ nM}$ ,  $\leq 0,01\text{ nM}$ , o  $\leq 0,001\text{ nM}$  (por ejemplo  $10^{-8}\text{ M}$  o menos, por ejemplo de  $10^{-8}\text{ M}$  a  $10^{-13}\text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9}\text{ M}$  a  $10^{-13}\text{ M}$ ). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 se une a un epítipo de FGFR1 que está conservado entre FGFR1 de diferentes especies.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en el sentido más amplio y cubre varias estructuras de anticuerpo, que incluyen pero sin limitación anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que ellos exhiban la actividad biológica deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto, que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

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

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estos se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), *por ejemplo*, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las clases diferentes de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y

citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de células B); y activación de células B.

Una "cantidad efectiva" de un agente, *por ejemplo*, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad efectiva en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "región Fc" de la presente se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de la inmunoglobulina, que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc de la variante. . En una forma de realización, la región Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos de la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, que se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Estructura" o residuos de "FR" se refieren a los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa" "anticuerpo intacto" y "anticuerpo total" se usan en forma indistinta para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura del anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se definió en la presente.

Los términos "célula huésped" "línea celular césped" y "cultivo celular huésped" se usan en forma indistinta y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de tales células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen las células primarias transformadas y la progenie derivada de ellas sin tener en cuenta el número de pasajes. La progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, pero puede contener

mutaciones. Se incluyen en la presente la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica identificada o seleccionada en la célula originalmente transformada.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde al de un anticuerpo producido por un ser humano y/o una célula humana derivado de una fuente humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humano.

Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias estructurales VL o VH de la inmunoglobulina humana. En general, la selección de las secuencias estructurales VL o VH de la inmunoglobulina humana es de un subgrupo de las secuencias del dominio variable. En general, el subgrupo de las secuencias es un subgrupo de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publicación 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una forma de realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I de Kabat *et al.*, *supra*. En una forma de realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III de Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente el total de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que el total o sustancialmente el total de las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las del anticuerpo no humano, y el total o sustancialmente el total de las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha experimentado la humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR" como se usa en la presente se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres de la VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las

“regiones determinantes de complementariedad” (CDR), estas últimas son de la mayor variabilidad de secuencia y/o están involucradas en el reconocimiento del antígeno. Los ejemplos de bucles hipervariables ocurren en los residuos de aminoácidos 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2), y 96–101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987).) Los ejemplos de CDR (CDR–L1, CDR–L2, CDR–L3, CDR–H1, CDR–H2, y CDR–H3) ocurren en los residuos de aminoácidos 24–34 de L1, 50–56 de L2, 89–97 de L3, 31–35B de H1, 50–65 de H2, y 95–102 de H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción del CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden “residuos determinantes de especificidad” o “SDR” que son residuos que se ponen en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas, o a-CDR. Los ejemplos de a-CDR (a-CDR–L1, a-CDR–L2, a-CDR–L3, a-CDR–H1, a-CDR–H2, y a-CDR–H3) ocurren en los residuos de aminoácidos 31–34 de L1, 50–55 de L2, 89–96 de L3, 31–35B de H1, 50–58 de H2, y 95–102 de H3. (Ver Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008).) A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, residuos FR) se numeran en la presente de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

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

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas. En ciertas formas de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo “aislado” es uno que ha sido separado de un componente de su ambiente natural. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purifica a más del 95% de pureza determinado, por ejemplo, por métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS–PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o fase inversa HPLC). Para la revisión de los métodos para la evaluación de la pureza del anticuerpo, ver, por ejemplo, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79–87 (2007).

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

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-FGFR1" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo (o sus fragmentos), que incluye tales moléculas de ácido nucleico en un vector solo o vectores separados, y tales moléculas de ácidos presentes en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que se originan durante la producción de una preparación de un anticuerpo monoclonal, tales variantes en general están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal, que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. En consecuencia, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se interpreta que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales usados de acuerdo con la presente invención se pueden obtener por una variedad de técnicas, que incluyen, pero sin limitación, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de despliegue en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen el total o parte del locus de inmunoglobulina humana, tales métodos y otros ejemplos de métodos para obtener anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

"Anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variadas. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. Desde el extremo N- a C-terminal, cada cadena

pesada tiene una región variable (VH), también llamada un dominio pesado variable o un dominio variable de la cadena pesada, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). De modo similar, desde el extremo N- a C-terminal, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también llamada dominio liviano variable o un dominio variable de la cadena pesada, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), sobre la base de las secuencias de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias concernientes al uso de tales productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia del polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos de la secuencia del polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir las brechas, si es necesario, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede obtener de varias maneras que están dentro de la experiencia del arte, por ejemplo, usando un programa de computación disponible al público tal como el programa de computación BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, que incluyen algunos algoritmos necesarios para obtener el alineamiento máximo respecto de la longitud completa de las secuencias comparadas. Para los fines de la presente, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con la documentación del usuario en U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se registra bajo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente. El programa ALIGN-2 se podría compilar para

usar en un sistema operativo UNIX, con preferencia UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen para el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de las secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que se puede expresar alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción  $X/Y$

donde X es el número de residuos de aminoácidos clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 es este alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no equivaldrá al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente se obtienen en como se describió en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa de computación ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica contenida en este sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se debe administrar la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que es no tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un buffer, excipiente, estabilizantes, o conservante.

La expresión "receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 o FGFR1", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier FGFR1 nativo de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique otra cosa. La expresión comprende FGFR1 de "longitud total" no procesado, así como cualquier forma de FGFR1 que resulte del procesamiento en la célula. El término

también comprende variantes naturales de FGFR1, por ejemplo, variantes de división o variantes alélicas. La secuencia de aminoácido de FGFR1b y FGFR2b humanos de ejemplo, respectivamente, es como se muestra a continuación:

NTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKN  
GKEFKPDHRIGGYKVERYATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVV  
ERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPD  
NLPYVQILKHSGINSSDAEVLTLFNVTEAQSGEYVCKVSNYIGEANQSAWLTVTRP  
VAKALEERPAVMTS (SEQ ID NO: 1); y

NTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKN  
GKEFKPDHRIGGYKVERYATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVV  
ERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPD  
NLPYVQILKTAGVNTT DKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHS AWLTV  
LEALEERPAVMTS (SEQ ID NO: 5).

Como se usa en la presente, "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar" o "que trata") se refieren a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo tratado, y se puede realizar tanto para la profilaxis como durante el tratamiento de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquiera de las consecuencias directas o indirectas patológicas de la enfermedad, disminución de la tasa de avance de la enfermedad, mejora o paliativo del estado de enfermedad y mejora del pronóstico. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para lentificar el avance una enfermedad.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana del anticuerpo que está involucrada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, con cada dominio que comprende cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Ver, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Por otra parte, los anticuerpos que unen a un antígeno particular se puede aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios de VL o VH



complementarios, respectivamente. Ver, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880–887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624–628 (1991).

El término "vector" como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que se ha unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico auto-replicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en la presente como "vectores de expresión".

## II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

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

### **Anticuerpos anti-FGFR1 de ejemplo**

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen con FGFR1. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 se une con FGFR1b y/o FGFR1c y agoniza la actividad de FGFR1.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 puede ser completamente humano, humanizado o no humano. En una forma de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 comprende HVRs como en cualquiera de las formas de realización anteriores y también comprende un marco humano de aceptores, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR1 comprende una secuencia del dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene el menos el 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 3 ó 4 de la siguiente manera:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTWISWVPGKGLEWVGEID  
PYDGDITYADSVKGRFTISADTSKNLQMNSLRAEDTAVYYCASSGYGGSDYAMD  
YWGQ (SEQ ID NO: 2),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNYIHWVPGKGLEWVADIY  
PNDGDITYADSVKGRFTISADTSKNLQMNSLRAEDTAVYYCAREHFDWVHYV  
MDYWGQ (SEQ ID NO: 3) y

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNWISWVPGKGLEWVAEID  
PYDGATDYADSVKGRFTISADTSKNLQMNSLRAEDTAVYYCATGTDVMDYWGQ  
(SEQ ID NO: 4). En ciertas formas de realización, una secuencia de VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR1 que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse con FGFR1 y de agonizar su actividad. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos fueron sustituidos, insertados y/o suprimidos en la SEQ ID NO: 2, 3 ó 4. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o supresiones se producen en regiones fuera de HVRs (es decir, en FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR1 comprende la secuencia VH en la SEQ ID NO: 2, 3 ó 4, incluyendo las modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 de la siguiente manera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAYQQKPGKAPKLLIYS  
ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE  
IKR (SEQ ID NO: 6). En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-FGFR1 que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse con FGFR1. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos fueron sustituidos, insertados y/o suprimidos en la SEQ ID NO: 6. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o supresiones se producen en regiones fuera de las

HVRs (es decir, en FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-FGFR1 comprende la secuencia VL en la SEQ ID NO: 6, incluyendo las modificaciones después de la traducción de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1, en donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas con anterioridad y una VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas con anterioridad. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NO: 2, 3 o 4 y SEQ ID NO: 6, respectivamente, incluyendo las modificaciones después de la traducción de esas secuencias.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-FGFR1 de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una forma de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento de F(ab')<sub>2</sub>. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud total, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo tal como se define en la presente.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR1 de acuerdo con cualquiera de las anteriores formas de realización pueden incorporar cualquiera de los rasgos, solos o en combinación, como se describe en las siguientes Secciones 1-7:

### **1. Afinidad de anticuerpo**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$ , o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

En una forma de realización, se mide Kd por un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) se realiza con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno se describe con el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab para el antígeno se mide al equilibrar el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, luego se captura el antígeno unido en una placa cubierta de anticuerpo anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas multipocillo MICROTITER® (Thermo Scientific) se recubren toda la noche con 5

$\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con 2% (p/v) de albúmina sérica bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc N.º 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno [ $^{125}\text{I}$ ] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (*por ejemplo*, compatible con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593–4599 (1997)). El Fab de interés posteriormente se incuba toda la noche, sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (*por ejemplo*, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Luego, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (*por ejemplo*, durante una hora). Luego la solución se elimina y la placa se lava ocho veces con 0,1% de polisorbato (TWEEN-20<sup>TM</sup>) en PBS. Cuando las placas se han secado, se agrega 150  $\mu\text{l}$ / pocillo de centelleo (MICROSCINT-20<sup>TM</sup>; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT<sup>TM</sup> (Packard) durante diez minutos. Se seleccionan las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual a 20% de la unión máxima para usar en los ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra forma de realización, la  $K_d$  se mide por el uso de ensayos de resonancia del plasmón superficial usando un BIACORE<sup>®</sup>-2000 o un BIACORE<sup>®</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips de antígeno inmovilizado de CM5 a ~10 unidades de respuesta (RU). En breves palabras, los chips del biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4,8, a 5  $\mu\text{g/ml}$  (~0,2  $\mu\text{M}$ ) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5  $\mu\text{l/min}$  para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan dos diluciones seriadas dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de tensioactivo polisorbato 20 TWEEN-20<sup>TM</sup> (PBST) a 25°C con una velocidad de flujo de aproximadamente 25  $\mu\text{l/min}$ . Las tasas de asociación ( $k_{on}$ ) y disociación ( $k_{off}$ ) se calculan usando un modelo de Langmuir simple uno a uno (programa de computación BIACORE<sup>®</sup> Evaluation versión 3.2) con ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la relación  $k_{off}/k_{on}$ . Ver, por ejemplo, Chen *et al.*, J.

*Mol. Biol.* 293:865–881 (1999). Si la tasa de asociación excede  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  por el ensayo de resonancia del plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación se puede determinar por el uso de una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de 20 nM de anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

## **2. Fragmentos de anticuerpo**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente es un fragmento de anticuerpo. Los Fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, ver Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129–134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269–315 (1994); ver también WO 93/16185; y Patentes U.S. Nros. 5.571.894 y 5.587.458. Para la discusión de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden los residuos del epítopo de unión al receptor de reciclaje y que tienen vida media larga, ver Patente U.S. N.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o bispecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden el total o una porción del dominio variable de cadena pesada o el total o una porción del dominio variable de cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener por varias técnicas, que incluyen pero sin limitación digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como

la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo *E. coli* o fago), como se describen en la presente.

### **3. Anticuerpos quiméricos y humanizados**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. N.º 4,816,567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “cambio de clase” en que la clase o subclase ha sido cambiada desde la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen los fragmentos de unión al antígeno de esto.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos, a la vez que se retiene la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, CDR, (o porciones de estos) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de estas) derivan de las secuencias del anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas formas de realización, algunos residuos de la FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los correspondientes residuos de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos de obtenerlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332:323–329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029–10033 (1989); Patentes U.S. Nros. 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25–34 (2005) (que describen el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489–498 (1991) (que describen “revestimiento”); Dall’Acqua et al., *Methods* 36:43–60 (2005) (que describe “transposición de FR”); y Osbourn et al.,

*Methods* 36:61–68 (2005) y Klimka et al., *Br. J., cáncer* 83:252–260 (2000) (que describe el método de “selección guiada” para la transposición de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen pero sin limitación: regiones estructurales seleccionadas usando el método de “mejor ajuste” (ver, por ejemplo, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia de consenso de los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena liviana o pesada (ver, por ejemplo, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras humanas (con mutación somática) o regiones estructurales de la línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas de la selección de bibliotecas de FR (ver, por ejemplo, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678–10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611–22618 (1996)).

#### **4. Anticuerpos humanos**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368–74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos se pueden preparar por la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al estímulo antigénico. Tales animales normalmente contienen todo o una porción de los locus de la inmunoglobulina humana, que reemplaza los locus de la inmunoglobulina endógena, o que están presentes en forma extracromosómica o integrada aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, se han inactivado los locus de la inmunoglobulina endógena. Para la revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos de los animales transgénicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117–1125 (2005). Ver también, por ejemplo, las Patentes U.S. Nros. 6.075.181 y 6.150.584 que describe tecnología XENOMOUSE™; Patente U.S. N.º 5.770.429 que describe la tecnología HuMAB®; Patente U.S. N.º 7.041.870 que describe la tecnología K–M MOUSE®, y Publicación de la solicitud de patente U.S. N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones

variables humanas de los anticuerpos intactos generado por tales animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, por la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden por métodos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón–humano para la producción de los anticuerpos humanos monoclonales. (Ver, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de células B humanas también se describen en Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557–3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen a los que se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de las líneas celulares del hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265–268 (2006) (que describe los hibridomas humano–humano). La tecnología del hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927–937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods y Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185–91 (2005).

Los anticuerpos también se pueden generar por aislamiento de las secuencias del dominio variable del clon Fv seleccionados de las bibliotecas de despliegue en fago derivadas humanas. Tales secuencias del dominio variable luego se pueden combinar con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de las bibliotecas del anticuerpo se describen a continuación.

### **5. Anticuerpos derivados de bibliotecas**

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar por medio de bibliotecas combinatorias de selección de anticuerpos actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la técnica para generar bibliotecas de despliegue de fagos y analizar dichas bibliotecas para hallar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty et al., *Nature* 348:552–554; Clackson et al., *Nature* 352: 624–628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581–597 (1992);



Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161–175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299–310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467–12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1–2): 119–132(2004).

En ciertos métodos de despliegue en fagos, Los repertorios de los genes VH y VL se pueden clonar separadamente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar al azar en bibliotecas de fagos, que luego se pueden analizar para hallar clones de unión con el antígeno como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433–455 (1994). Los fagos normalmente despliegan fragmentos de anticuerpo, sea como fragmentos de cadena simple Fv (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de la construcción de hibridomas. Alternativamente, el repertorio inactivo se puede clonar (por ejemplo, del ser humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos con una amplia variedad de antígenos no propios y propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725–734 (1993). Finalmente, las bibliotecas inactivas también se pueden preparar sintéticamente por clonación de los segmentos génicos V de las células madre, y mediante los cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para obtener el cambio de lugar in vitro como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). Las publicaciones de patente que describen bibliotecas de fago de anticuerpo humano incluyen, por ejemplo: Patente US N.º 5.750.373, y Publicaciones de patente US Nros. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

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

### **6. Anticuerpos multiespecíficos**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En ciertas formas de realización, una de las especificidades de unión es para FGFR1 y la

otra es para cualquier otro antígeno, por ejemplo, beta-Kloto. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir con dos diferentes epítopes de FGFR1. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para obtener anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada –cadena liviana de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y, manipulación genética “botón en ojal” (ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden obtener por manipulación genética de los efectos inductores electrostáticos para obtener anticuerpo Fc–moléculas heterodiméricas (documento WO 2009/089004A1); entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, Patente US N.º 4.676.980, y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cierres de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547–1553 (1992)); usando tecnología “diacuerpo” para obtener los fragmentos de anticuerpo biespecífico (ver, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444–6448 (1993)); y por el uso de dímeros de cadena única Fv (sFv). (ver, por ejemplo Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y la preparación de anticuerpos trispecíficos como se describió, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos manipulados genéticamente con tres o más sitios de unión de unión al antígeno funcionales, que incluye “anticuerpos Octopus” también se incluyen en la presente (ver, por ejemplo, documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en la presente también incluye un “FAB de acción dual” o “DAF” que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a FGFR1 así como a otro antígeno diferente, por ejemplo klotoBeta (ver, por ejemplo, el documento US 2008/0069820).

## 7. Variantes de anticuerpos

En ciertas formas de realización, se contemplan las variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos provistas en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar por la introducción de modificaciones apropiadas

en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar alguna combinación de supresión, inserción, y sustitución para obtener la construcción final, con la condición que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno.

**a) Variantes de la sustitución, inserción y supresión**

En ciertas formas de realización, se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las HVR y FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el título de "sustituciones preferidas". Los cambios más sustanciales, se proporcionan en la Tabla 1, bajo el título de "ejemplos de sustituciones" o como también se describe más adelante con referencia a las clases de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un anticuerpo de interés y los productos se analizan, para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión al antígeno retenido/mejorado, reducción de la inmunogenicidad, mejora de ADCC o CDC.

**TABLA 1**

| Residuo original | Ejemplos de sustituciones           | Sustituciones preferidas |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Ala (A)          | Val; Leu; Ile                       | Val                      |
| Arg (R)          | Lys; Gln; Asn                       | Lys                      |
| Asn (N)          | Gln; His; Asp, Lys; Arg             | Gln                      |
| Asp (D)          | Glu; Asn                            | Glu                      |
| Cys (C)          | Ser; Ala                            | Ser                      |
| Gln (Q)          | Asn; Glu                            | Asn                      |
| Glu (E)          | Asp; Gln                            | Asp                      |
| Gly (G)          | Ala                                 | Ala                      |
| His (H)          | Asn; Gln; Lys; Arg                  | Arg                      |
| Ile (I)          | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina | Leu                      |
| Leu (L)          | Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile                      |
| Lys (K)          | Arg; Gln; Asn                       | Arg                      |
| Met (M)          | Leu; Phe; Ile                       | Leu                      |
| Phe (F)          | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr        | Tyr                      |

| Residuo original | Ejemplos de sustituciones           | Sustituciones preferidas |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Pro (P)          | Ala                                 | Ala                      |
| Ser (S)          | Thr                                 | Thr                      |
| Thr (T)          | Val; Ser                            | Ser                      |
| Trp (W)          | Tyr; Phe                            | Tyr                      |
| Tyr (Y)          | Trp; Phe; Thr; Ser                  | Phe                      |
| Val (V)          | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina | Leu                      |

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades de las cadenas laterales:

- (1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) ácido: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán el intercambio un miembro de uno de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución involucra sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (*por ejemplo*, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes seleccionadas para posterior desarrollo tendrán modificaciones (*por ejemplo*, mejoradas) en ciertas propiedades biológicas (*por ejemplo*, aumento de afinidad, reducción de inmunogenicidad) con respecto al anticuerpo original del cual y/o tendrán ciertas propiedades biológicas sustancialmente retenidas. . Un ejemplo de variante de sustitución es un anticuerpo de afinidad madura, que se puede generar en forma conveniente, *por ejemplo*, usando técnicas de maduración de afinidad basadas en despliegue de fagos tales como los que se describen en la presente. En breves palabras, uno o más residuos HVR se mutan y las variantes desplegadas en el fago y se analizan para determinar una actividad biológica particular (*por ejemplo*, afinidad de unión).

Las alteraciones (*por ejemplo*, sustituciones) se pueden realizar en las HVR, *por ejemplo*, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones se pueden realizar en “puntos calientes” de la HVR es decir, residuos codificados por ~~codones~~ **codones** que experimentan mutación en alta frecuencia durante el proceso de

maduración somática (ver, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179–196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), con la variantes VH o VL resultante que se analiza para determinar la afinidad de unión. La maduración de afinidad por la construcción y reelección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas formas de realización de maduración de afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos por maduración por alguno de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR predispuesta a error, transposición de cadena, o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Luego se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca luego se analiza para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad involucra los abordajes dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de la HVR (por ejemplo, 4–6 residuos de una vez). Los residuos de HVR involucrados en la unión al antígeno se pueden identificar específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelado. A menudo se localiza selectivamente en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras provistas en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Tales alteraciones pueden ser externas de los “puntos calientes” de HVR o SDR. En ciertas formas de realización de las secuencias de la variante de VH y VL provistas anteriormente, cada HVR están no alterada, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081–1085. En este método, se identifican un residuo o un grupo de residuos blanco (*por ejemplo*, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplaza con un aminoácido neutro o cargado negativamente (*por ejemplo*, alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional para las

sustituciones adicionales. En forma alternativa o adicional, se puede analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser localizados selectivamente o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden analizar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen las fusiones de amino- y/o carboxilo-terminal que varían de extensión desde un residuo a los polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como las inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen la molécula de anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N- o C terminales del anticuerpo a una enzima (*por ejemplo*, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media sérica del anticuerpo.

#### **b) Variantes de glicosilación**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente se altera para aumentar o disminuir el grado de glicosilación del anticuerpo. La adición o supresión de sitios de glicosilación en un anticuerpo se obtiene en forma conveniente por la alteración de la secuencia de aminoácidos de modo de crear o eliminar una o más de los sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a este. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que en general está unido por una ligadura N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, *por ejemplo*, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Los oligosacáridos pueden incluir varios carbohidratos, *por ejemplo*, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una mucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas formas de realización, las modificaciones del oligosacárido de un anticuerpo de la invención se pueden realizar a fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una forma de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de mucosa unida (en forma directa o indirecta) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de mucosa en tal anticuerpo puede ser de 1% a 80%, de 1% a 65%, de 5% a 65% o de 20% a 40%.

La cantidad de mucosa se determina por el cálculo de la cantidad promedio de mucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras de manosa híbrida y alta, complejas) que se mide por espectrometría de masa MALDI-TOF, que se describe en, por ejemplo, WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 de la región Fc (numeración de Eu de los residuos de la región de Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden tener función de ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, Publicaciones de patente US Nros. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004); Yamane–Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); Solicitud de patente US N.º 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas de células inactivadas tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa *FUT8*, células CHO inactivadas (ver, por ejemplo, Yamane–Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680–688 (2006); y WO2003/085107).

También se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, *por ejemplo*, en el que un oligosacárido biantenarico fijado a la región Fc del anticuerpo se biseca con GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, *por ejemplo*, en WO 2003/011878 (Jean–Mairet et al.); Patente US N.º 6,602,684 (Umana et al.); y US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo

pueden tener mejor función de CDC. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

### **c) Variantes de la región Fc**

En ciertas formas de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo provisto en la presente, de este modo se genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (*por ejemplo*, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (*por ejemplo*, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas formas de realización, la invención contempla una variante del anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en una candidata deseable que para muchas aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante, ya que ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* se pueden realizar para confirmar la reducción/depleción de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) se pueden realizar para asegurar que el anticuerpo carezca de la unión a FcγR (por consiguiente probablemente que carezca de actividad ADCC), pero retenga la capacidad de unión al FcRn. Las células principales para la mediación de ADCC, las células NK, expresan solo Fc(RIII), mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se sintetiza en la Tabla 3 de la página 464 of Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457–92 (1991). Los ejemplos no limitantes de los ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente U.S. N.º 5.500.362 (ver, por ejemplo Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499–1502 (1985); 5.821.337 (ver Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). En forma alternativa, se pueden emplear métodos de ensayo no radiactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactiva ACTI™ por citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen



células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). En forma alternativa o adicional, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como se describió en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652–656 (1998). Los ensayos de unión C1q también se pueden llevar a cabo para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por consiguiente carece de actividad de CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión de C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC (ver, por ejemplo, Gazzano–Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045–1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de la unión de FcRn y la depuración/vida media *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente U.S. N.º 6.737.056). Tales mutantes de Fc incluyen las mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen la llamada mutante de Fc “DANA” con la sustitución de los residuos 265 y 297 para alanina (Patente US N.º 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a las FcR. (Ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591–6604 (2001).)

En ciertas formas de realización, una variante del anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunas formas de realización, las alteraciones se realizan en la región Fc que produce unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente US N.º 6.194.551, WO 99/51642, y Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

Los anticuerpos con aumento de vida media y mejor unión al receptor neonatal receptor de Fc (FcRn), que es el responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton *et*

al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella que aumentan la unión de la región Fc a FcRn. Tales variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (Patente US N.º 7.371.826).

Ver también Duncan & Winter, *Nature* 322:738–40 (1988); Patente U.S. N.º 5.648.260; Patente U.S. N.º 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de las variantes de la región Fc.

#### **d) Variantes de anticuerpo con cistina manipulada genéticamente**

En ciertas formas de realización, se puede desear crear anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína, *por ejemplo*, "tioMAbs", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En formas de realización particulares, los residuos sustituidos aparecen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir estos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos en consecuencia se ubican en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros residuos, tales como residuos de fármaco o residuos de fármaco–ligador, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en la presente. En ciertas formas de realización, alguno o más de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la cadena pesada de la región Fc. Los anticuerpos manipulados genéticamente con cisteína se pueden generar como se describe, *por ejemplo*, en la Patente U.S. N.º 7.521.541.

#### **e) Derivados del anticuerpo**

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en la presente también se puede modificar para contener residuos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Los residuos adecuados para la derivatización del anticuerpo, incluyen pero sin limitación polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli–1,3–dioxolano, poli–1,3,6–trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, ~~poliaminoácidos~~ (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n–

vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (*por ejemplo*, glicerol), alcohol polivinílico y sus mezclas. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas para la fabricación debida a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si más de un polímero se une, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o el tipo de los polímeros usados para la derivatización sobre la base de las consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo mejorado, si el derivado del anticuerpo se usará en una terapia en condiciones patológicas definidas, etc.

En otra forma de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y residuo no proteináceo que se pueden calentar selectivamente por la exposición a la radiación. En una forma de realización, el residuo no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600–11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que se calientan el residuo no proteináceo a una temperatura en la que se destruyen las células próximas al anticuerpo–residuo no proteináceo.

## **B. Métodos y composiciones recombinantes**

Los anticuerpos se pueden producir usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la Patente U.S. N.º 4.816.567. En una forma de realización, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-FGFR1 descrito en la presente. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas liviana y/o pesada del anticuerpo). En una forma de realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden tal ácido nucleico. En una forma de realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende tal ácido nucleico. En tal forma de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que

comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una forma de realización, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfóide (por ejemplo, células Y0, NS0, Sp20). En una forma de realización, se proporciona un método de obtener un anticuerpo anti-FGFR1, donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, provisto antes, en las condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de anticuerpo anti-FGFR1, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describió anteriormente, se aísla e inserta en uno más vectores para la clonación adicional y/o para expresión en una célula huésped. Tal ácido nucleico se puede aislar fácilmente y secuenciar mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, por medio de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de los vectores que codifican el anticuerpo incluyen células procarióticas o eucarióticas que se describen en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en las bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación y función efectora del Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en las bacterias, ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nros. 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523. (Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245–254, que describe la expresión de los fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, que incluyen cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación han sido “humanizadas”, lo que origina la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409–1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210–215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales que se pueden usar en conjunto con las células de insecto, en particular para la transfección de las células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos celulares también se pueden utilizar como huéspedes. Ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nros. 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados se pueden usar como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de mamífero que se adaptan a crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de las líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 del riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7), línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describió, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK,), células de sertoli de ratón (células TM4, como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243–251 (1980)); células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A,), células de pulmón humano (W138 ), células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44–68 (1982), células MRC 5, células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) que incluyen las células DFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), y y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255–268 (2003).

### C. Ensayos

Los anticuerpos Anti-FGFR1 provistos en la presente se pueden identificar, analizar, o caracterizar por sus propiedades físicas/química y/o actividades biológicas por varios ensayos conocidos en la técnica.

### **1. Ensayos de unión y otros ensayos**

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

### **2. Ensayos de actividad**

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

### **D. Inmunoconjugados**

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden en la presente un anticuerpo anti-FGFR1 conjugado a uno o más agentes citotóxicos tales como un agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibitorios del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, planta o animal o sus fragmentos), o isótopos radiactivos.

En una forma de realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en que un anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, que incluyen, pero sin limitación un maytansinoide (ver Patentes U.S. Nros. 5.208.020, 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos DE y DF de monometilauristatina fármaco (MMAE y MMAF) (ver Patentes U.S. Nros. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de esta (ver Patentes U.S. Nros. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336–3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925–2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477–523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358–362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717–721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829–834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529–1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.*

45:4336–4343 (2002); y Patente U.S. N.º 6,630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente conjugado a una toxina enzimáticamente activa y fragmentos de estas que incluyen, pero sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteína Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricótesenos.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo que se describe en la presente conjugado a un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de los radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $\text{At}^{211}$ ,  $\text{I}^{131}$ ,  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{Y}^{90}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$ ,  $\text{Sm}^{153}$ ,  $\text{Bi}^{212}$ ,  $\text{P}^{32}$ ,  $\text{Pb}^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para los estudios centellográficos, por ejemplo  $\text{tc99m}$  o  $\text{I}^{123}$ , o una marca de espín para imagen de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen de resonancia magnética, mri), tales como nuevamente yodo 123, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan por medio una variedad de agentes de acoplamiento de la proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imdoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno.) Por ejemplo se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen

triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un ligador lábil al ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente U.S. N.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC de la presente contemplan expresamente, pero sin limitación a tales conjugados preparados con reactivos de entrecruzamiento que incluyen, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el comercio (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos).

#### **E. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección**

En ciertas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 provistos en la presente es útil para detectar la presencia de FGFR1 en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en la presente abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tales como tejido adiposo marrón, tejido pancreático, tejido hepático, tejido adiposo blanco y tejido tumoral.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 para usar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método de detectar la presencia de FGFR1 en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-FGFR1 que se describe en la presente en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FGFR1 a FGFR1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FGFR1 y FGFR1. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, un anticuerpo anti-FGFR1 se usa para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-FGFR1, por ejemplo, donde FGFR1 es un biomarcador para la selección de pacientes.

En ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos marcados anti-FGFR1. Las marcas incluyen, pero sin limitación, marcas o residuos que se



detectan directamente (tal como marcas fluorescente, cromofórica, electrodensidad, quimioluminiscente y radioactiva), así como residuos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan en forma indirecta, *por ejemplo*, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de marcas incluyen pero sin limitación, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rhodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, *por ejemplo*, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcas de espín, marcas de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

#### **F. Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-FGFR1 que se describen en la presente se preparan por la mezcla de tal anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, pero sin limitación: buffer tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), polipéptidos, proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contraiones formadores de sales tales como sodio;

contraiones formadores de sal tales como sodio, complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn–proteínas), y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™; y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables en la presente también incluyen agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glicoproteínas de hialuronidasa activas neurales solubles (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH–20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HILENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos de sHASEGPs y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las Publicaciones de patente US Nros. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, un sHASEGP se combina con uno o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Los ejemplos de formulaciones de anticuerpo liofilizadas se describen en la Patente US N.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las que se describen en la Patente US N.º 6.171.586 y WO2006/044908, estas últimas formulaciones incluyen un buffer de histidina–acetato.

La formulación de la presente también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, con preferencia aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, se puede desear seguir proporcionando un análogo de glp–1, una amilina sintética, un antagonista del receptor de glucagón (por ejemplo, un anticuerpo anti–GCGR) o leptina. Tales ingredientes activos están presentes de modo adecuado en combinación con cantidades que son efectivas para el propósito deseado.

Los ingredientes activos también se pueden preparar encerrados en microcápsulas, por ejemplo por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli–(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano–partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las preparaciones de liberación sostenida se pueden preparar. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo,

tales matrices están en forma de artículos definidos, *por ejemplo*, películas o microcápsulas.

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

### **G. Métodos y composiciones terapéuticas**

Cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas provistos en la presente se puede usar en los métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para usar como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para usar en el tratamiento de una enfermedad metabólica. En ciertas formas de realización, se proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para usar en un método de tratamiento. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR1 agonista para usar en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad metabólica que

comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo anti-FGFR1. En tal forma de realización, el método también comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un análogo de glp-1, una amilina sintética, un antagonista del receptor de glucagón (por ejemplo, un anticuerpo anti-GCGR) o leptina. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores es preferentemente un humano.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-FGFR1 agonista en la fabricación o la preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad metabólica. En otra forma de realización, el medicamento es para usar en un método de tratamiento de enfermedad metabólica que comprende la administración a un individuo que tiene la enfermedad de una cantidad efectiva del medicamento. En una de tales formas de realización, el método también comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, tal como se describe más abajo. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad metabólica. En una forma de realización, el método comprende la administración a un individuo que tiene tal enfermedad metabólica de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-FGFR1 agonista. En tal forma de realización, el método también comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, tal como se describe más abajo. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas provistos en la presente, por ejemplo, para usar en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas provistos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR1 agonistas provistos en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

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

Tales terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por cualquiera de los medios adecuados, que incluyen administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas,

que dependen en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan varios esquemas de dosis, que incluyen, pero sin limitación administraciones únicas o múltiples durante varios puntos de tiempo, administración en bolo, e infusión por pulso.

Los anticuerpos de la invención pueden formular, dosificar y administrar de un modo compatible con la buena práctica médica. Los factores para considerar en este contexto incluye el trastorno particular tratado, el mamífero particular tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el esquema de administración, y otros factores conocidos para los profesionales médicos. El anticuerpo no necesita, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descriptos anteriormente. En general estos se usan en las mismas dosis y con las vías de administración usadas en la presente con anterioridad o aproximadamente de 1 a 99% de la dosis empleada antes en la presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determina en forma empírica/clínica como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad tratada, el tipo de anticuerpo, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, antecedentes clínicos del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico asistente. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. De acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1  $\mu\text{g/kg}$  a 15  $\text{mg/kg}$  (*por ejemplo*, 0,1  $\text{mg/kg}$ –10  $\text{mg/kg}$ ) del anticuerpo puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, sea, por ejemplo por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1  $\mu\text{g/kg}$  a 100  $\text{mg/kg}$  o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general el tratamiento se debe sostener hasta se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo debe estar en el rango de aproximadamente 0,05  $\text{mg/kg}$  a aproximadamente 10  $\text{mg/kg}$ . De este modo, una o más dosis de aproximadamente 0,5  $\text{mg/kg}$ , 2,0

mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se pueden administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar en forma intermitente, *por ejemplo*, todas las semanas, cada tres semanas, (*por ejemplo*, para que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, *por ejemplo*, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se pueden administrar una dosis de carga inicial superior, seguida por una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser de utilidad otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

#### **H. Artículos de manufactura**

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar contruidos de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente porta una composición que por sí misma o combinada con otras composiciones efectivas para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una puerta de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja inyectable hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como asma. Además, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en la misma, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en este, en donde la composición comprende además un agente terapéutico citotóxico o de otro modo adicional. El artículo de manufactura de esta forma de realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones de anticuerpos se pueden usar para tratar una afección particular. En forma alternativa o adicional, el artículo de manufactura también puede comprender un segundo recipiente (o tercero) que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un

punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros buffer, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

### III. EJEMPLOS

Los siguientes son los ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden practicar diversas formas de realización, dada la descripción general provista con anterioridad.

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

Generamos anticuerpos monoclonales específicos de FGFR1 usando tecnología de visualización de fagos e IgD2–D3 con rótulo His de FGFR1b humano y c como antígenos. Se usaron bibliotecas de fagos humanos con diversidades sintéticas en las regiones determinantes complementarias seleccionadas (H1, H2, H3, L3), imitando la diversidad natural del repertorio de IgG humana para paneo. Los fragmentos Fab se desplegaron de forma bivalente sobre la superficie de partículas de bacteriófagos M13 (Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284:119–32 (2004)). El protocolo de paneo se describió previamente (Liang et al., *J. Mol. Biol.* 366:815–29 (2007)). Después de controlar muchos clones de múltiples bibliotecas, se identificaron anticuerpos de gados únicos y específicos que se unen tanto con isoformas b como c de FGFR1 por ELISA de fagos. Para ensayar la unión de los anticuerpos con FGFRs humanos, se empleó el protocolo convencional de ELISA usando 2 µg/ml de proteínas quiméricas Fc humano de ECD de FGFR1.

También medidos afinidades de unión de anticuerpos anti-FGFR1 con FGFR1 por medio de Biacore/SPR usando un instrumento BIAcore™ T100 tal como se describió (Liang et al., *supra*) con las siguientes modificaciones. Primero se recubrió anticuerpo Fc anti-humano murino en un chip CM5 BIAcore™ de dextrano carboximetilado usando acoplamiento directo con grupos amino libres según un procedimiento descrito por el fabricante. Luego se capturó anticuerpo en chips de biosensores CM5 para lograr aproximadamente 200 unidades de respuesta (RU). Las mediciones de unión se realizaron usando un tampón de corrida compuesto por 10 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,005% de tensioactivo P20 (tampón HBS–P). Se inyectó una serie de dilución doble de proteína ECD–His de FGFR1 en un rango de 1,550 nM en tampón HBS P a una tasa de flujo de 30 µL/minuto a 25 °C. Las tasas de asociación (Kon, por mol/s) y

tasas de disociación ( $K_{off}$ , por s) se calcularon usando un modelo simple uno–uno de unión Langmuir (BIAcore™ Evaluation Software versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio ( $K_d$ , por mol) se calculó como la relación de  $K_{off} / K_{on}$ .

Dos de los anticuerpos anti–FGFR1 que se identificaron como se describió con anterioridad en experimentos independientes (designados aquí como R1MAb1 y R1MAb2) se unieron con FGFR1b y FGFR1c con una afinidad similar, pero no con cualquier otra isoforma de FGFR (Fig. 1A y B). Su actividad de señalización se ensayó usando un ensayo de luciferasa en base a Gal–Elk1 en células de rata L6 con falta de FGFRs endógenos, pero transfectados para expresar cada isoforma de FGFR (y KLB de ser necesario). Estos anticuerpos eran inesperadamente potentes agonistas: ambos R1MAbs indujeron actividad de luciferasa de una forma dependiente de la dosis, pero sólo cuando las células expresan FGFR1b o FGFR1c recombinante, indicando que R1MAbs actúa como agonista específico de FGFR1 (Fig. 1C). En este formato de ensayo, R1MAbs no afectaron de forma apreciable la actividad de FGF básico (bFGF), un ligando clásico de FGFR1 (Fig. 1D). Sin embargo, R1MAbs y FGF21 mostraron un efecto aditivo cuando las células expresan FGFR1c y KLB (Fig. 1D). El fragmento F(ab')<sub>2</sub> pero no Fab de R1MAb2 mostraron actividad agonista dependiente de FGFR1, lo que sugiere que R1MAbs ejercen su actividad agonista por promoción de la homodimerización de FGFR1 (Fig. 1E). Previamente, se habían informado un agonista de dimerización artificial de FGFR con un péptido de unión a FGFR1 y el dominio de cierre de leucina c–jun. Esta molécula llamada C19jun también se une a heparina a través del dominio c–jun y requiere heparina para la activación de FGFR1 (Ballinger et al., *Nature Biotechnol.* 17: 1199–1204 (1999)). Por el contrario, la heparina no afecta la actividad agonista de R1MAb1 en el ensayo de luciferasa (Fig. 5). La actividad agonista independiente de heparina de R1MAb1 luego se confirmó por examinación de la fosforilación de ERK y MEK1/2, señalando componentes corriente abajo de FGFRs, en adipocitos 3T3–L1 cultivados de murinos (Fig. 1F) o en WAT de ratones C57BL/6 inyectados por vía intraperitoneal con R1MAb (Fig. 1G).

Hemos realizado experimentos para mapear el epítipo FGFR1 ligado por R1MAb1 y R1MAb2. Hemos sintetizado 30 péptidos representados por porciones de la secuencia de FGFR1 con un rótulo de biotina amino–terminal y se usaron para ensayos de unión ELISA. Estas secuencias de los péptidos eran las siguientes: N.º 1: SSSEKETDNTKPNPVAPY (SEQ ID NO: 36); N.º 2: PVAPYWTSPEKMEKKLHAV (SEQ ID NO: 37); N.º 3: KLHAVPAAKTVKFKCPSSG



(SEQ ID NO: 38); N.º 4: CPSSGTPNPTLRWLKNGKE (SEQ ID NO: 39); N.º 5: KNGKEFKPDHRIGGYKVRVY (SEQ ID NO: 40); N.º 6: YKVRVYATWSIIMDSVWPSD (SEQ ID NO: 41); N.º 7: WPSDKGNYTCIVENEYGS (SEQ ID NO: 42); N.º 8: NEYGSINHTYQLDVVERSP (SEQ ID NO: 43); N.º 9: VERSPHRPILQAGLPANKT (SEQ ID NO: 44); N.º 10: PANKTVALGSNVEFMCKVY (SEQ ID NO: 45); N.º 11: MCKVYSDPQPHIQWLKHIE (SEQ ID NO: 46); N.º 12: LKHIEVNGSKIGPDNLPLYV (SEQ ID NO: 47); N.º 13: NLPYVQILKTAGVNTTDKE (SEQ ID NO: 48); N.º 14: TTDKEMEVLHLRNVSFEDA (SEQ ID NO: 49); N.º 15: SFEDAGEYTCLAGNSIGLS (SEQ ID NO: 50); N.º 16: SIGLSHHSAWLTVLEALEE (SEQ ID NO: 51); N.º 17: YWTSPEKMEKKLHAVPAAK (SEQ ID NO: 52); N.º 18: EKMEKKLHAVPAAKTVKFK (SEQ ID NO: 53); N.º 19: PAAKTVKFKCPSSGTPNPT (SEQ ID NO: 54); N.º 20: KFKCPSSGTPNPTLRWLKN (SEQ ID NO: 55); N.º 21: GTPNPTLRWLKNGKEFKPD (SEQ ID NO: 56); N.º 22: TLRWLKNGKEFKPDHRIGG (SEQ ID NO: 57); N.º 23: FKPDRIGGYKVRVYATWSI (SEQ ID NO: 58); N.º 24: HRIGGYKVRVYATWSIIMDS (SEQ ID NO: 59); N.º 25: LHAVPAAKTVKFKCPSS (SEQ ID NO: 60); N.º 26: KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28); N.º 27: AVPAAKTVKFKCPSSG (SEQ ID NO: 61); N.º 28: FKPDRIGGYKVRVY (SEQ ID NO: 29); N.º 29: KPDHRIGGYKVR (SEQ ID NO: 62); N.º 30: GTPNPTLRWLKN (SEQ ID NO: 63). Tal como se muestra en la Fig. 17A, para ambos R1MAb1 y R1MAb2, los péptidos más cortos con los cuales demuestran una significativa unión eran los péptidos N.º 26 y N.º 28.

Ejemplo 2. R1MAbs demuestran actividad antidiabética sostenida

Ensayamos si los anticuerpos anti-FGFR1 de la invención tendrían una actividad antidiabética usando modelos murinos de diabetes. Todos los ratones se adquirieron de Jackson Laboratory y se mantuvieron en una instalación de animales libres de patógenos a 21 °C en un ciclo estándar de 12 h de luz/12 h de oscuridad con acceso a comida (un alimento estándar para roedores (Labdiet 5010, 12,7% calorías de grasa) o una dieta alta en grasas y alta en carbohidratos (Harlan Teklad TD.03584, 58,4% calorías de grasa) y agua *ad libitum*. Ratones db/db con antecedentes de C57BLKS/J eran hembras y otros ratones eran todos machos. Todos los ratones se usaron para inyección de alrededor de 9–11 semanas de edad, excepto que los ratones ap2-SREBP1c tenían 8 meses de edad (Fig. 3E) o 4 meses de edad (Fig. 3F). Para una infusión continua de

proteína FGF21, se implantó subcutáneamente una bomba osmótica (Alzet® 2001). Los niveles de glucosa se midieron usando un glucómetro OneTouch® Ultra®. Para análisis de lípidos hepáticos, el lípido se extrajo de acuerdo con el método Folch y se resuspendieron en PBS que contenía 5% de Triton X-100. Se determinaron colesterol total, triglicéridos,  $\beta$ -hidroxibutilato (Thermo DMA) y ácido graso no esterificado (Roche) usando reacciones enzimáticas. Se determinaron niveles de insulina sérica por medio de ELISA (Cristal Chem).

Ensayamos la actividad agonista de los R1MAbs *in vitro* e *in vivo*, inyectando ratones db/db hiperglucémicos resistentes a leptina con 3, 10 y 50 mg/kg (mpk) de R1MAb1. Observamos que los niveles de glucosa en sangre se normalizaron durante una semana en las tres dosis y el efecto reductor de la glucosa observado era inesperadamente fuerte y duradero, siendo los niveles de glucosa inferiores a los ratones de control durante 30 días después de una única inyección (Fig 2A). Esto se asoció con una reducción transitoria pero significativa del peso corporal (Fig. 2A). La actividad reductora de la glucosa era probablemente a través de una mejora en la sensibilidad a la insulina, porque el nivel de insulina en suero también se había reducido con la inyección de R1MAb1 (Fig. 2B). Observamos una reducción inducida por R1MAb similar en niveles de glucosa en sangre con R1MAb2 (Fig. 6) y en tres modelos murinos adicionales con marcada insulinoresistencia, ratones ob/ob deficientes en leptina, ratones alimentados con dieta alta en grasas (HFD) y ratones Ins2Akita (Hong et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E1687–96 (2007)) (Fig. 2C y 7). Los experimentos de alimentación de a pares mostró que la pérdida de peso inducida por R1MAb en ratones db/db e Ins2Akita se debe a una reducción en la ingesta de alimentos; sin embargo, la reducción observada en glucosa en sangre depende ampliamente de la ingesta de alimentos (Fig. 2D y 6–7). En el páncreas, la inyección de R1MAb1 incrementó el área insulinopositiva por cada isleta en comparación con ratones de control alimentados de a pares o no alimentados de a pares (Fig. 2E y 8). FGFR1 se expresa en células  $\beta$  pancreáticas (Hart et al., *Nature* 408:864–68 (2000)) y FGF21 promueve la función de células  $\beta$  *ex vivo* (Wente et al., *Diabetes* 55:2470–78 (2006)); así, la activación de FGFR1 en células  $\beta$  podría contribuir directamente con los niveles de insulina pancreática incrementados. Estos datos demuestran que la activación de FGFR1 (pero no FGFR2 o FGFR3) es suficiente para recapitular las actividades antidiabéticas y antilipidémicas de FGF21 recombinante.

Para analizar la importancia de las funcionalidades de IgG para las actividades de R1MAb, utilizamos dos tipos de modificaciones. Una mutación dual (D265A/N297A; DANA) en la región Fc anula la unión con FcγRs y el reclutamiento de células efectoras inmunes por una molécula de IgG (Gong et al., 2005). Ni la actividad agonista ni antidiabética de R1MAb2 se efectuó por introducción de mutaciones de DANA; en consecuencia, la función efectora no cumple un papel en la actividad antidiabética de R1MAb2 (Fig. 9A–C). Sin embargo, una versión de un brazo manipulada por ingeniería (OA) de R1Mab1 (Atwell et al., *J. Mol. Biol.* 270:26–35 (1997)), carente de uno de los fragmentos Fab (OA–R1MAb1) (Fig. 9A y D) mostró una actividad agonista disminuida (Fig. 9E y F) y fracasó en la reducción de glucosa en sangre, peso corporal y niveles séricos de lípidos en ratones db/db (Fig. 9G y H), indicando que las actividades tanto agonistas como antidiabéticas de R1MAbs eran dependientes de la bivalencia de Ab (a pesar de que también ensayamos anticuerpos biespecíficos de ensayo sólo con un brazo anti–FGFR1 (por ejemplo, con un brazo anti–beta–Kloto) y confirmamos que retienen los atributos beneficiosos de los anti–FGFR1 R1MAbs bivalentes). Estas correlaciones sugieren fuertemente que la activación inducida por R1MAb de la señalización de la vía corriente debajo de FGFR1 media probablemente sus efectos antidiabéticos.

MAbs emergieron como una potente modalidad terapéutica para el tratamiento de una cantidad de enfermedades humanas. Nuestra demostración de potentes actividades antihiper glucemiantes y reductoras de lípidos de MAb agonista de anti–FGFR1 abre una nueva vía hacia el desarrollo de MAbs terapéuticos dirigidos al complejo de receptores con FGFR1 o FGFR1 para el tratamiento de diabetes de tipo 2 y sus trastornos crónicos relacionados con obesidad. El objeto a base de MAb de FGFR1 ofrece varias propiedades favorables respecto de la terapia de FGF21 recombinante. Primero, por su naturaleza, MAbs proporcionan propiedades farmacocinéticas predecibles, modulables y superiores en grasas en comparación con FGF21 o cualquier otra proteína terapéutica no anticuerpo. De hecho, demostramos que una simple inyección i.p. a 1–3 mps de R1MAb1 o R1Mab2 en ratones db/db lleva a una mejora marcadamente sostenida de hiperglucemia durante 30 días (Fig. 2 y 5). Este efecto glucemiante de larga duración nunca se informó para cualquiera de los agentes antidiabéticos previamente descritos.

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

Se sugirió que FGF21 recombinante mejora la sensibilidad a la insulina a través de los tejidos adiposos y el hígado (Berglund et al., *Endocrinology* 150:4084–93 (2009); Li et al., *FEBS Letters* 583:3230–34 (2009)). La inyección de FGF21 en ratones indujo la fosforilación de MEK y ERK en cuatro tipos de tejidos tisulares que expresan KLB, el hígado, tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo marrón (BAT) y páncreas, tal como se informó previamente (Fig. 3A, superior) (Kurosu et al., *J. Biol. Chem.* 282: 26687–95 (2007); Xu et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(5): E1105–14 (2009)). Por el contrario, la inyección de R1MAb1 lleva a fosforilación de los mismos efectores corriente abajo en tejidos adiposos y páncreas, pero no en el hígado (Fig. 4A, inferior), consistente con la expresión de mRNA de FGFR1 muy baja en el hígado (Fig. 10) (Fon Tacer et al., *Mol. Endocrinol.* 24(10): 2050–64 (2010)). De hecho, una comparación lado a lado de la expresión génica hepática reveló que la expresión de dos genes previamente identificados dirigidos a FGF21 (receptor de leptina (LepR) y supresor de señalización de citoquinas 2 (SOCS2); Coskun et al., *Endocrinology* 149:6018–27 (2008), Inagaki et al., *Cell Metabolism* 8:77–83 (2008)) era inducida por FGF21 pero no por R1MAb1 (Fig. 15). Por otro lado, la expresión hepática de genes regulados por insulina conocidos (acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), ácido graso sintasa (FAS), familia de elongasas de ácidos grasos de cadena larga 6 (Elovl6), proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina (IGF) (IGFBP)–1, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)) estaba alterada de modo similar tanto por FGF21 como por R1MAb1, lo que sugiere que estos genes podrían estar regulados indirectamente por vía de cambios hormonales (por ejemplo, insulina) o metabólicos. R1MAb1 redujo marcadamente los lípidos hepáticos y séricos al inyectarlos en ratones db/db el día 7 después de la única inyección, presumiblemente debido a los efectos de división de lípidos a través de los tejidos adiposos (Fig. 3B–D). La inyección de R1MAb1 no indujo fosforilación de MEK o ERK en pulmón y próstata (Fig. 3A), dos tipos de tejidos tendientes al cáncer que expresan FGFR1. Estas observaciones sugieren juntas que los tejidos adiposos, pero no el hígado, son centrales para la actividad metabólica común de R1MAb y FGF21.

Para seguir investigando este punto, usamos ratones transgénicos lipoatróficos ap2-srebp1c, que despliegan una severa insulinoresistencia, deficiencia de leptina y hepatomegalia, debido a la falta de tejidos adiposos

blancos y la función adiposa marrón comprometida (Fig 3E, 11) (Shimomura et al., *Genes Dev.* 12:3182–94 (1998); Shimomura et al., *Nature* 401:73–76 (1999)). Consistente con la idea de que la función tisular adiposa normal se requiere para la actividad metabólica de R1MAb1, una única inyección i.p. a 1mpk mejoró la tolerancia a HOMA–IR y glucosa sólo en los ratones ob/ob de control pero no en los ratones ap2–srebp1c (Fig. 3E). La ingesta de alimento se redujo por inyección R1MAb1 tanto en ratones ob/ob como transgénicos ap2–srebp1c, en comparación con ratones alimentados de a pares inyectados con IgG de control (Fig. 3E). Además, la infusión continua de FGF21 recombinante también falló al mejorar la tolerancia a la insulina en ratones ap2–srebp1c, a pesar de que se observaron un significativo aumento en  $\beta$ –hidroxibutirato sérico (es decir, cuerpo de cetona) y una reducción en el colesterol (Fig. 3F).

#### Ejemplo 4. Activación de PGC1–alfa en adiposidad marrón por R1MAb

Se sugirió recientemente que FGF21 activa la proteína PGC–1 $\alpha$  del coactivador transcripcional del receptor nuclear en tejidos adiposos y el hígado induce la expresión de los genes corriente abajo asociados con el metabolismo oxidativo (Chau et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 107:12553–58 (2010); Hondares et al., *Cell Metabolism* 11:206–12 (2010); Pottoff et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 30;106(26): 10853–8 (2009)). De hecho, cuando se inyectó en ratones ob/ob, R1MAb1 aumentó significativamente la expresión de BAT de genes implicados en OXPHOS y el metabolismo de ácidos grasos tal como se reveló por análisis de microdisposición de ADN seguido por un análisis de enriquecimiento de fijación de genes (Fig. 4A). R1MAb1 (y FGF21) también incrementó la expresión de PGC–1 $\alpha$ , PGC–1 $\beta$  y sus principales blancos CIDEA y UCP1 en tejidos adiposos marrones (medido por qPCR; Figs. 4B y 16).

La transcripción de PGC–1 $\alpha$  se regula a través de elementos de respuesta a cAMP (CREs) en la región promotora y el factor de transcripción CREB que se une con CREs (Herzig et al., *Nature* 413:179–83 (2001); Karamitri et al., *J. Biol. Chem.* 284:20738–52 (2009); Muraoka et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296:E1430–39 (2009); Shi et al., *J. Biol. Chem.* (2005)). En un control para identificar los factores de transcripción relacionados con el metabolismo que se pueden activar por FGF21 en células HEK293 que expresan KLB, hallamos que la proteína de fusión GAL–CREB puede ser activada por FGF21 (Fig. S8A–B). Posteriormente, hallamos que tanto FGF21 como R1MAb1 pueden activar el informante GAL–CREB así como el informante de CRE–luciferasa de una manera

dependiente de la dosis en células HEK293 (Fig. 4C). Consistente con la idea de que las funciones de CREB como un efecto corriente abajo, FGF21 aumentó la fosforilación de CREB y p90RSK, una CREB quinasa corriente arriba regulada por ERK, en tejidos adiposos blancos de ratones (Fig. 4D), adipocito primario humano diferenciado (Fig. 4E) y células HEK293 (Fig. 12C). Así, la activación de CREB por FGF21 y R1MAb probablemente contribuye a la inducción de PGC-1 $\alpha$  y un grupo de genes corriente abajo implicados en el metabolismo oxidativo en tejidos adiposos (Fig. 4F y 12D). Además de la regulación transcripcional sugerida aquí, se informó que FGF21 activa PGC-1 $\alpha$  después de la traducción por activación de AMPK (Chau et al., *supra*), a pesar de que fallamos al observar la evidencia de la activación de AMPK *in vitro* o *in vivo* por R1MAb (datos no mostrados). De forma colectiva, nuestros resultados sustentan el papel de PGC-1 $\alpha$  en tejidos adiposos en la mediación de los efectos antilipídicos y antidiabéticos de FGF21 y R1MAb.

#### Ejemplo 5. Ensayo de anticuerpos biespecíficos de anti-FGFR1/anti-beta-Kloto

Otra diferencia importante entre nuestros R1MAbs y FGF21 es la especificidad del receptor objetivo. FGF21 puede actuar sobre FGFR1c, 2c y 3c, pero sus efectos están probablemente limitados a tejidos que expresan KLB (es decir, hígado, adiposidad y páncreas) (Fon Tacer et al., *supra*; Kurosu et al., *J. Biol. Chem.* 282:26687–95 (2007); Ogawa et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 104:7432–37 (2007)). Por el contrario, los tejidos objeto de nuestros R1MAbs se determinan por expresión de FGFR1 y distribución de tejidos de la molécula de anticuerpos, pero improbablemente se limitan por la expresión de KLB. De hecho, observamos hipofosfatemia moderada en ratones tratados con R1MAb1, lo que sugiere la activación de la vía de FGF23/Kloto en el riñón. Conforme a ello, generamos anticuerpos biespecíficos anti-KLB/FGFR1 usando despliegue de fagos o tecnología de hibridoma (ratones BALBc inmunizados con células HEK293 que expresan FGFR1c y KLB) para generar anticuerpos anti-KLB separados y tecnología “knob-and-hole” (Merchant et al. *Nature Biotechnol.* 16(7): 677–81 (1998)). Ensayamos la capacidad de estos anticuerpos biespecíficos para activar la expresión GAL-Elk1 y confirmamos que estos anticuerpos dependen de la presencia tanto de beta-Kloto como FGFR1 para la activación de la señal corriente abajo. También confirmamos que uno de los anticuerpos podían aumentar la fosforilación de los intermediarios de señalización corriente abajo, MEK y ERK 1/2 en adipocitos humanos primarios diferenciados. Una de las cruces de anticuerpos biespecíficos reacciona con las proteínas murinas y usamos este anticuerpo para ensayar la actividad *in vivo* de un anticuerpo biespecífico.

Observamos que este anticuerpo biespecífico redujo los niveles de glucosa en sangre sin elevar FGF23 sérico, mientras que el correspondiente control del anticuerpo anti-FGFR1 (monoespecífico) redujo los niveles de glucosa en sangre en una medida similar pero elevó significativamente los niveles séricos de FGF23.

A continuación, ensayamos la capacidad de estos anticuerpos biespecíficos para proporcionar los beneficios metabólicos de los anticuerpos agonistas anti-FGFR1. Generamos ratones transgénicos que expresan beta-Kloto humano (R1MAb1 y R1MAb2 reconocen también FGFR1 murino) y confirman que los anticuerpos biespecíficos anti-KLB/FGFR1 descritos con anterioridad mejoran la tolerancia a la glucosa en modelos murinos, por ejemplo, ratones transgénicos hKLB alimentados con dieta alta en grasas. También generamos anticuerpos anti-beta-Kloto que reaccionan con la proteína en otros animales modelo (por ejemplo, rata, conejo, cinomologous y monos rhesus) y la similitud prueba la capacidad de anticuerpos biespecíficos contruidos con ellos y los anticuerpos anti-FGFR1 para proporcionar beneficios metabólicos.

A pesar de que la anterior invención se describió con cierto detalle por medio de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no se han de construir como limitativos del alcance de la invención. Las descripciones de todas las patentes y literatura científica citadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de tratamiento de una enfermedad o condición metabólica en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de un agonista del receptor 1 del factor de crecimiento anti-fibroblastos (FDFR1), en donde la enfermedad metabólica está seleccionada del grupo que consiste en: síndrome de ovario poliquístico (PCOS), síndrome metabólico (MetS), obesidad, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado hepático no alcohólica (NAFLD), hiperlipidemia, hipertensión, diabetes de tipo 2, no diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmune latente (LAD) y diabetes de inicio en la madurez para los jóvenes (MODY), en donde el agonista de FGFR1 no activa FGFR2 o FGFR3.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agonista de FGFR1 es un anticuerpo anti-FGFR1.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-FGFR1 se une con el péptido N.º 26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) o péptido N.º 28 FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29).

4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-FGFR1 se une tanto con FGFR1b como FGFR1c.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo también se une con beta-Kloto.

7. Un anticuerpo aislado que se une con FGFR1, en donde el anticuerpo es un agonista de la actividad de FGFR1.

8. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el anticuerpo no es un agonista de FGFR2 o FGFR3.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el anticuerpo se une con el péptido N.º 26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) o péptido N.º 28 FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29).

11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

12. Un anticuerpo anti-FGFR1, en donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo



que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDAAVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20), (b) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23) y (c) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en  $X_1X_2IX_3PX_4DGX_5TX_6YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es A o G,  $X_2$  es D o E,  $X_3$  es D o Y,  $X_4$  es N o Y,  $X_5$  es A o D y  $X_6$  es D o Y (SEQ ID NO: 24) y  $X_1IX_2PX_3DGX_4TX_5YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es D o E,  $X_2$  es D o Y,  $X_3$  es N o Y,  $X_4$  es A o D y  $X_5$  es D o Y (SEQ ID NO: 25).

13. Un anticuerpo anti-FGFR1, en donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos  $GFTFX_1X_2X_3X_4IX_5$ , en donde  $X_1$  es S o T,  $X_2$  es N o S,  $X_3$  es N o T,  $X_4$  es W o Y,  $X_5$  es H o S (SEQ ID NO: 26), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en  $X_1X_2IX_3PX_4DGX_5TX_6YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es A o G,  $X_2$  es D o E,  $X_3$  es D o Y,  $X_4$  es N o Y,  $X_5$  es A o D y  $X_6$  es D o Y (SEQ ID NO: 24) y  $X_1IX_2PX_3DGX_4TX_5YADSVKG$ , en donde  $X_1$  es D o E,  $X_2$  es D o Y,  $X_3$  es N o Y,  $X_4$  es A o D y  $X_5$  es D o Y (SEQ ID NO: 25) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDAAVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20).

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTSTWIS (SEQ ID NO: 7), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GEIDPYDGDTYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) y EIDPYDGDTYYADSVKG (SEQ ID NO: 11) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16) y SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17).

15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSNNYIH (SEQ ID NO: 8), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ADIYPNDGDTDYADSVKG (SEQ ID NO: 12) y DIYPNDGDTDYADSVKG (SEQ ID NO: 13) y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos EHFDAAVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18).

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos

GFTFTSNWIS (SEQ ID NO: 9), (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AEIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 14) y EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 15) y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) y GTDVMDY (SEQ ID NO: 20).

17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-16, que también comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 21); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SASFLYS (SEQ ID NO: 22); y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23).

18. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende una secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3 y 4.

19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, que también comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 6.

20. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.

21. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo también se une con beta-Kloto.

22. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-21, que es un anticuerpo IgG1.

23. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-22.

24. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 23.

25. Un método de producción de un anticuerpo que comprende el cultivo de la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24 de modo que se produce el anticuerpo.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, que también comprende la recuperación del anticuerpo de la célula huésped.

27. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-22 y un portador farmacéuticamente aceptable.

28. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-22 para usar como un medicamento.

29. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-22 para usar en el tratamiento de una enfermedad o condición metabólica

seleccionada del grupo que consiste en: síndrome de ovario poliquístico (PCOS), síndrome metabólico (MetS), obesidad, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado hepático no alcohólica (NAFLD), hiperlipidemia, hipertensión, diabetes de tipo 2, no diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmune latente (LAD) y diabetes de inicio en la madurez para los jóvenes (MODY).

30. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-22 para usar en la sensibilización de un individuo a la insulina.

31. Uso del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-22 en la fabricación de un medicamento.

32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o condición metabólica seleccionada del grupo que consiste en: síndrome de ovario poliquístico (PCOS), síndrome metabólico (MetS), obesidad, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado hepático no alcohólica (NAFLD), hiperlipidemia, hipertensión, diabetes de tipo 2, no diabetes de tipo 2, diabetes de tipo 1, diabetes autoinmune latente (LAD) y diabetes de inicio en la madurez para los jóvenes (MODY).

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el medicamento es para sensibilizar a un individuo a la insulina.

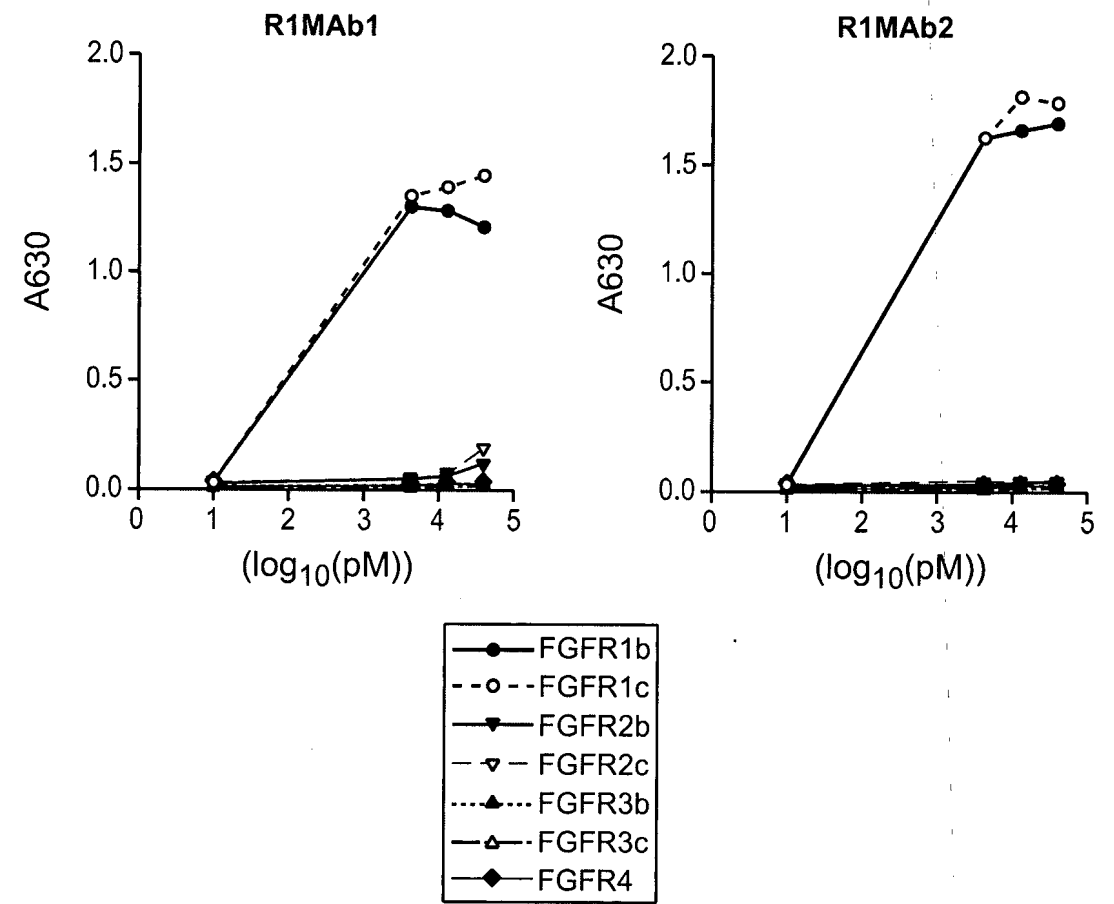
34. Un método de tratamiento de diabetes en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva del anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 7-22.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, que también comprende la administración al individuo de otro agente para tratar diabetes, siempre que el otro agente no sea insulina.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 34, que también comprende la administración al individuo de un agente para tratar enfermedad cardiovascular.

### RESUMEN

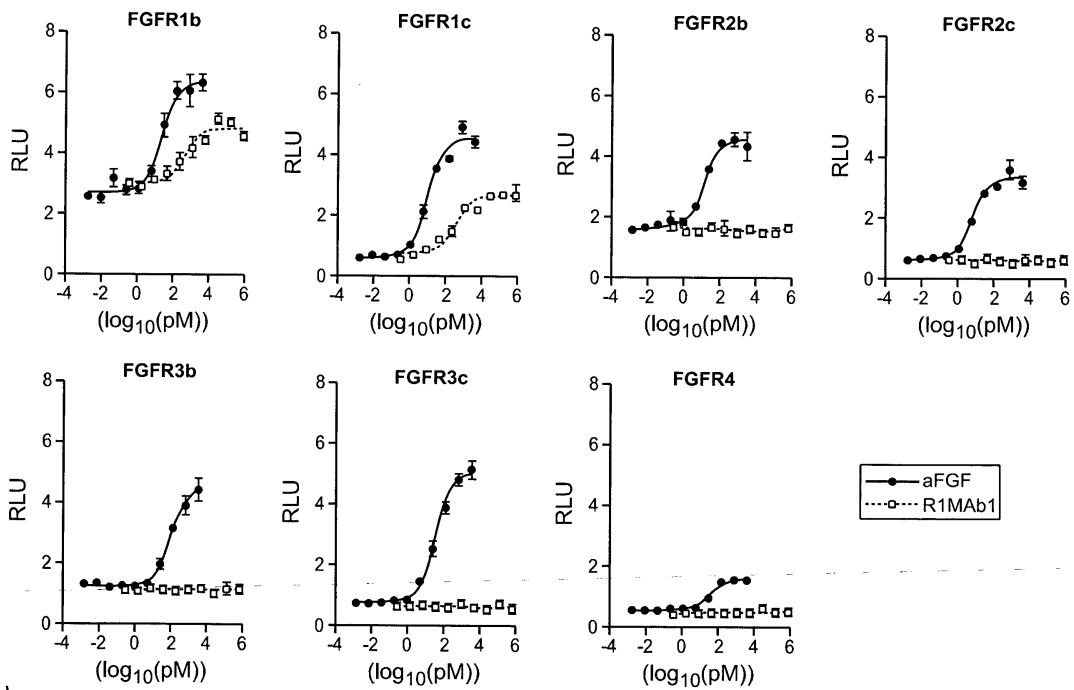
La invención proporciona agonistas de FGFR1, incluyendo anticuerpos agonista de anti-FGFR1 y sus métodos de uso.



**FIG. 1A**

|        |        | $k_{on}$<br>( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_{off}$<br>( $s^{-1}$ ) | KD<br>(M)             |
|--------|--------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| R1MAb1 | FGFR1b | $2.7 \times 10^6$              | $1.6 \times 10^{-3}$      | $5.9 \times 10^{-10}$ |
|        | FGFR1c | $3.2 \times 10^6$              | $2.2 \times 10^{-3}$      | $6.7 \times 10^{-10}$ |
| R1MAb2 | FGFR1b | $1.9 \times 10^6$              | $8.2 \times 10^{-4}$      | $4.4 \times 10^{-10}$ |
|        | FGFR1c | $1.9 \times 10^6$              | $8.7 \times 10^{-4}$      | $4.6 \times 10^{-10}$ |

**FIG. 1B**



**FIG. 1C-1**

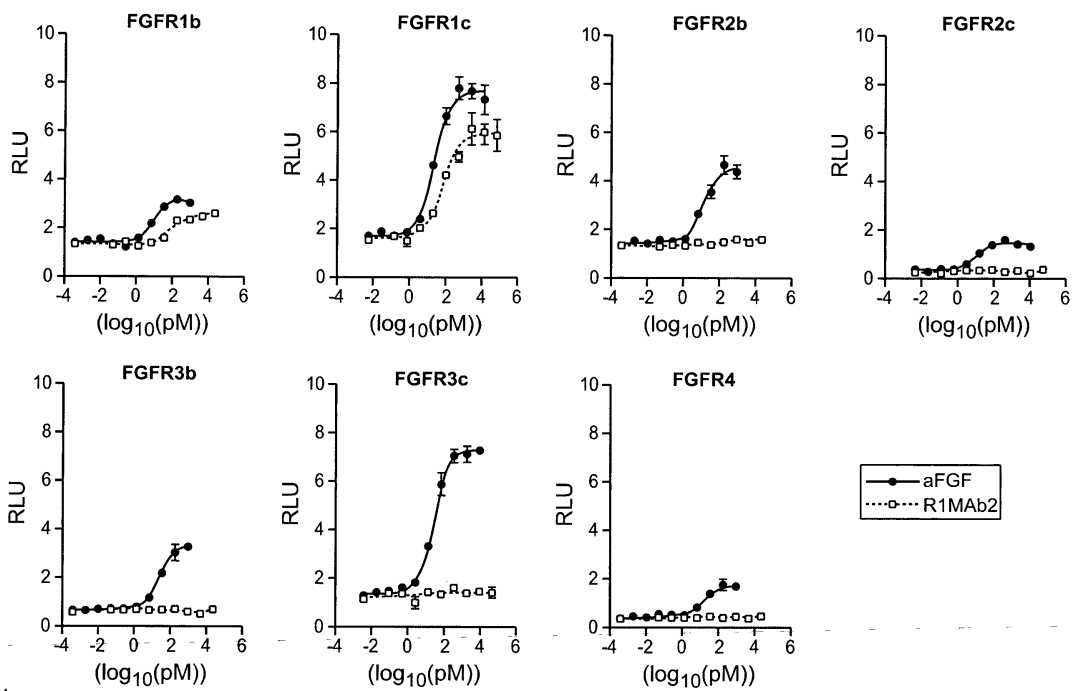
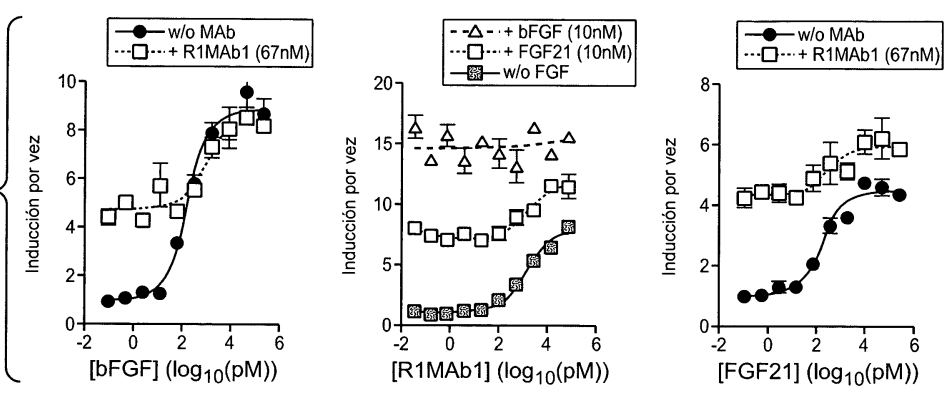


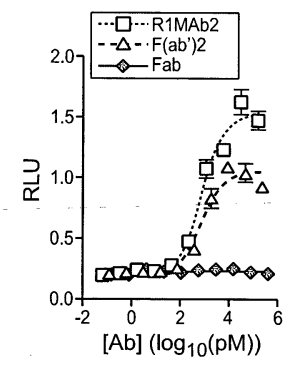
FIG. 1C-2

FIG. 1D



4 / 29

FIG. 1E



4



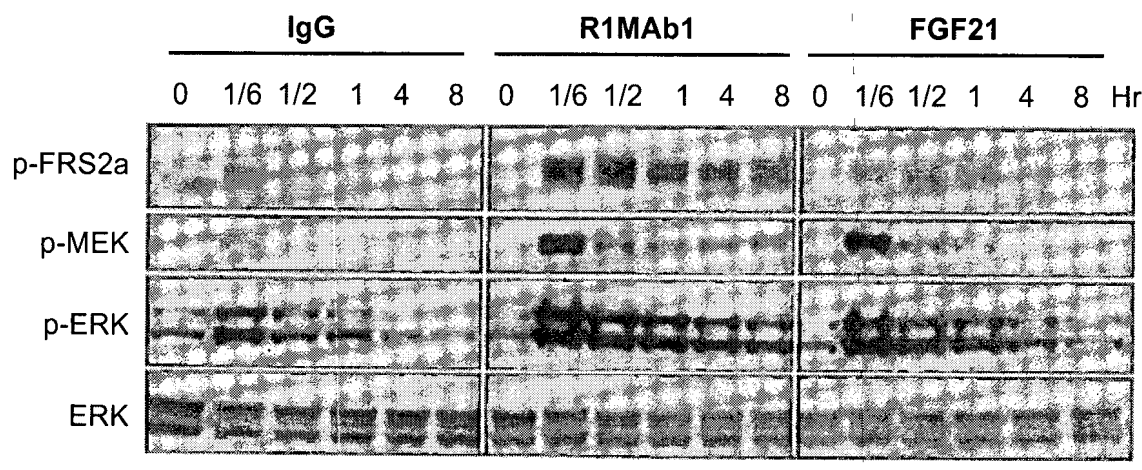


FIG. 1F

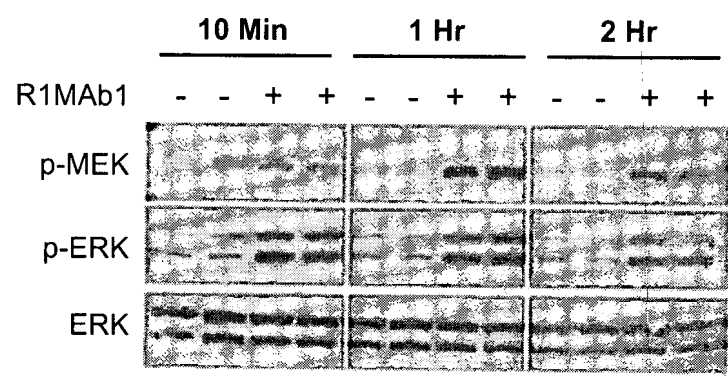


FIG. 1G

FIG. 2A

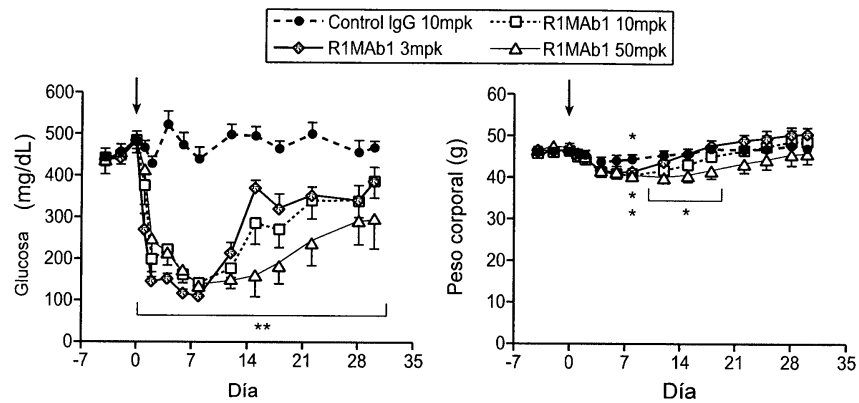
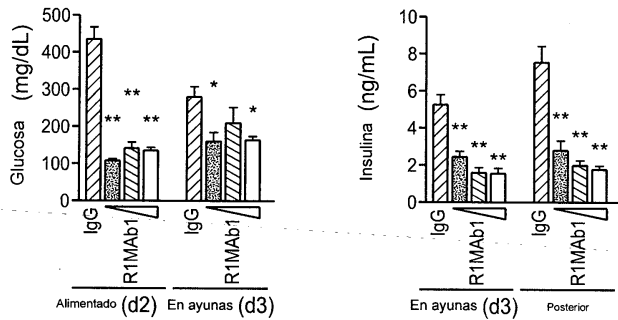


FIG. 2B



Q8

7 / 29

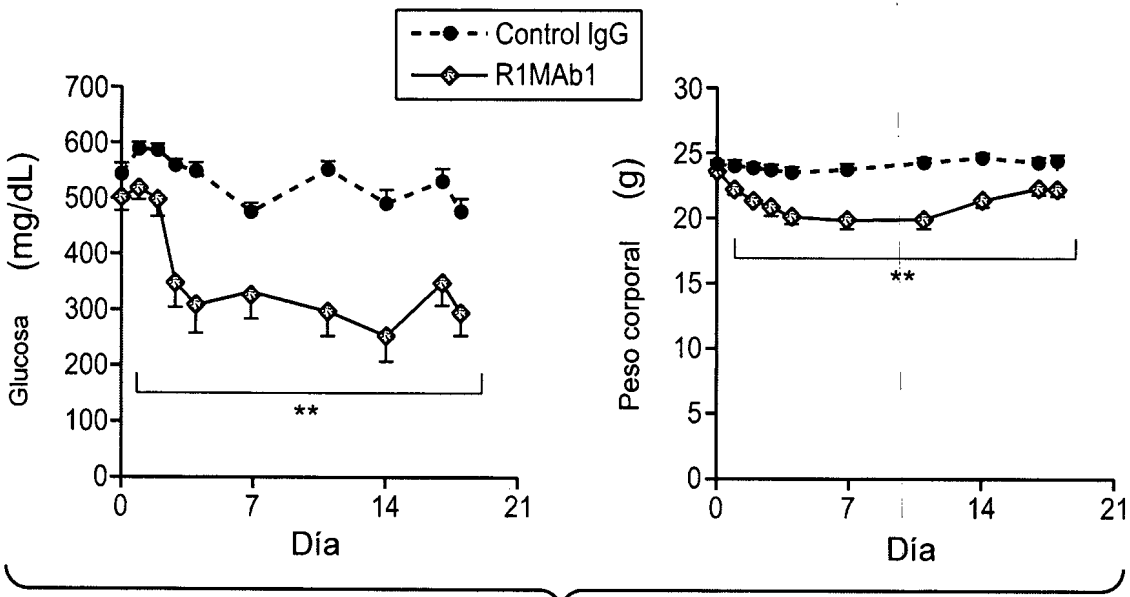


FIG. 2C

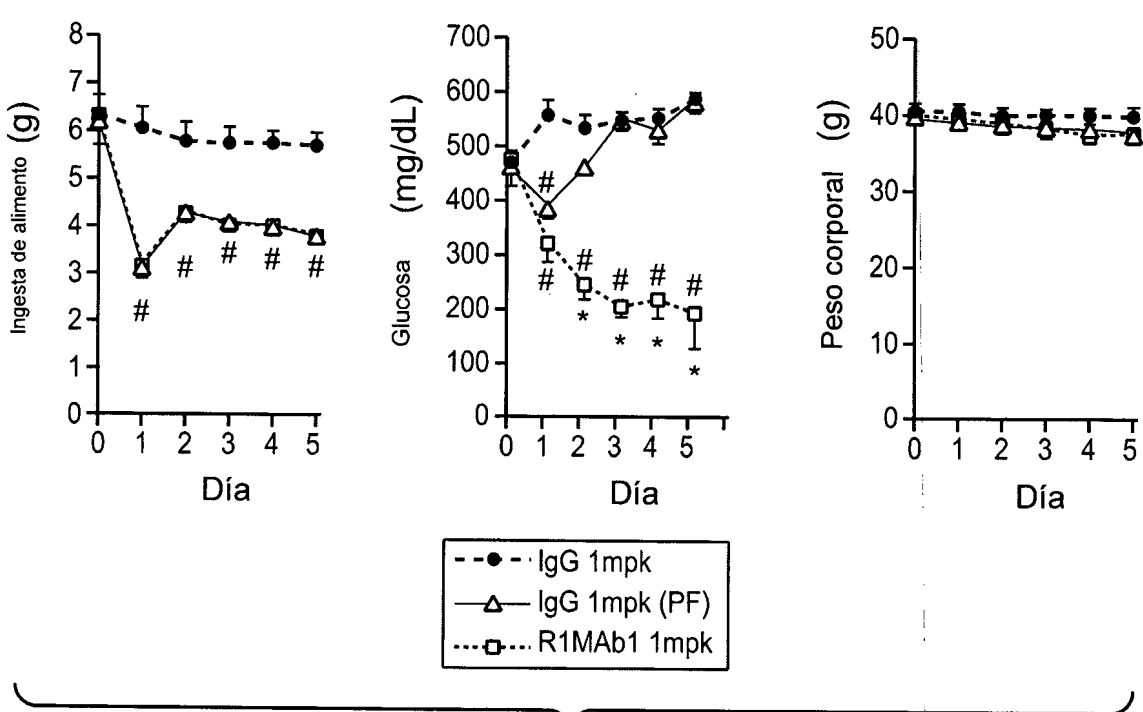
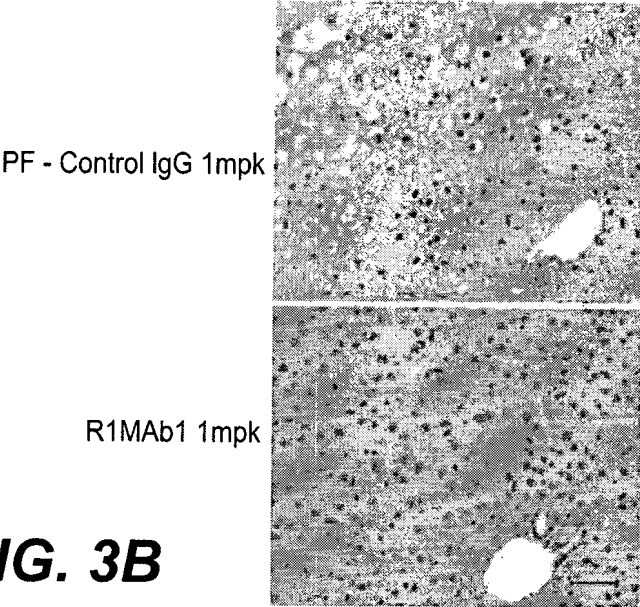
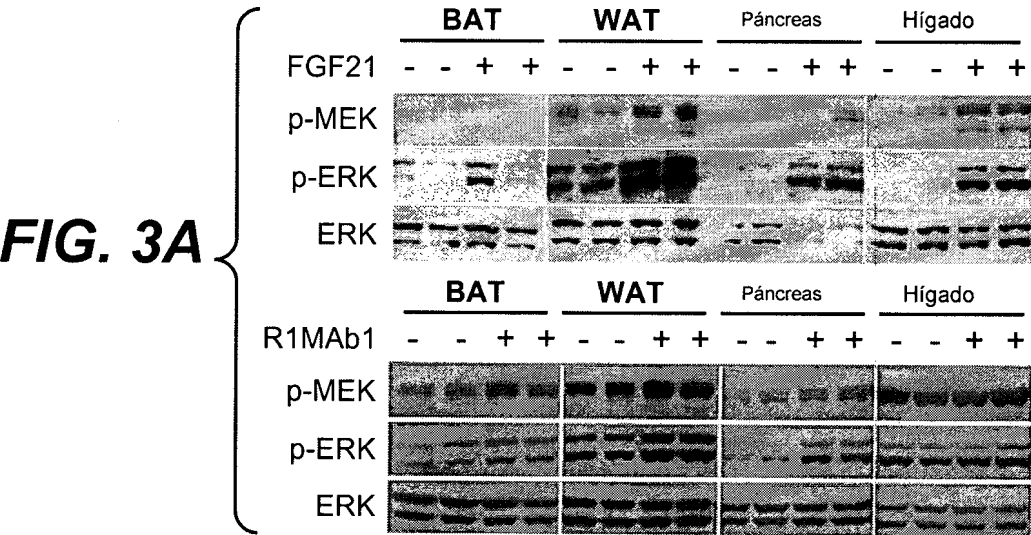
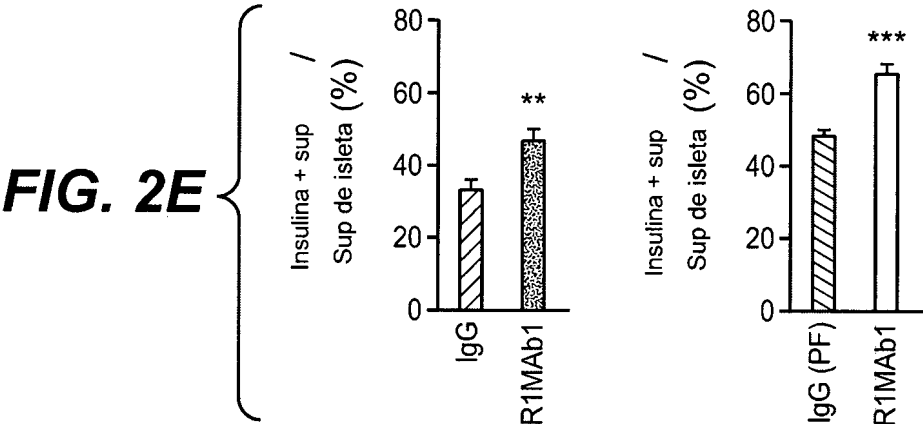


FIG. 2D



**FIG. 3B**

9 / 29

FIG. 3C

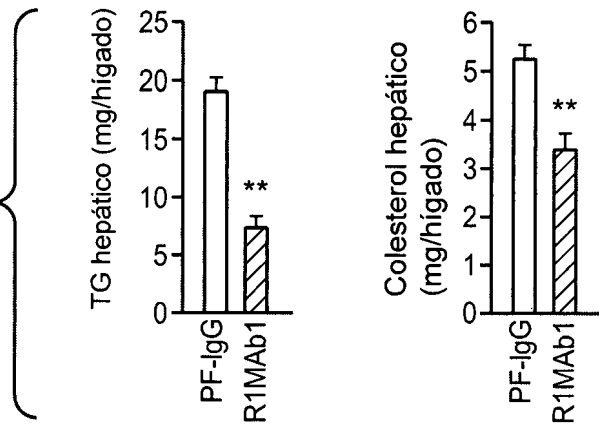


FIG. 3D

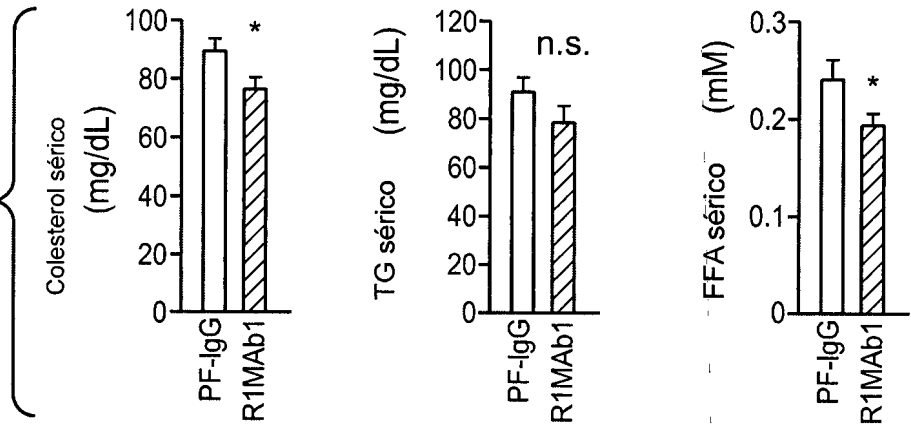
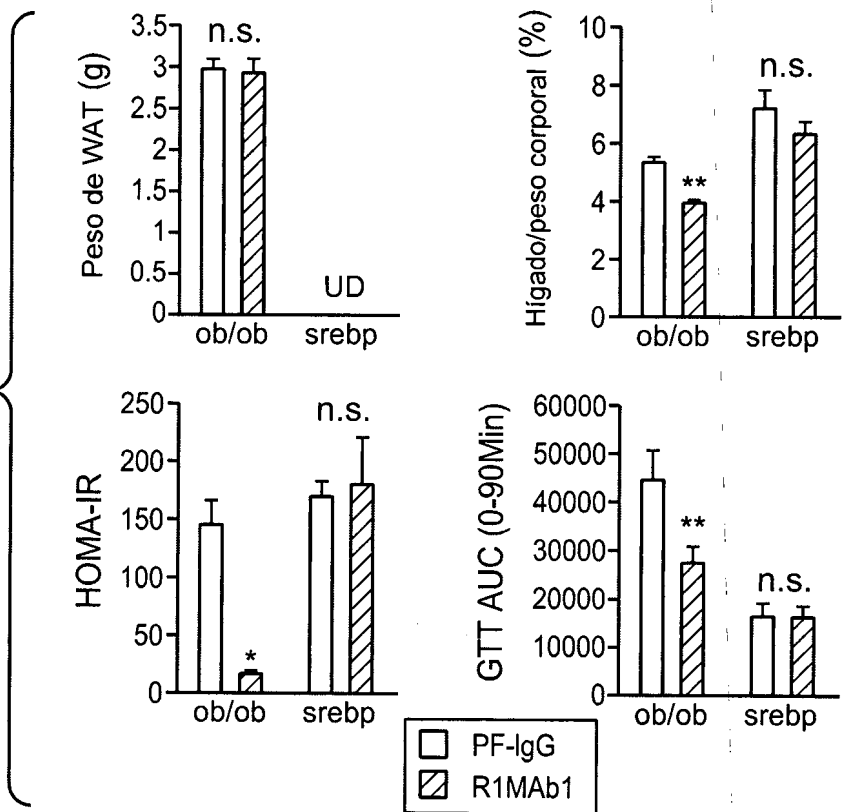
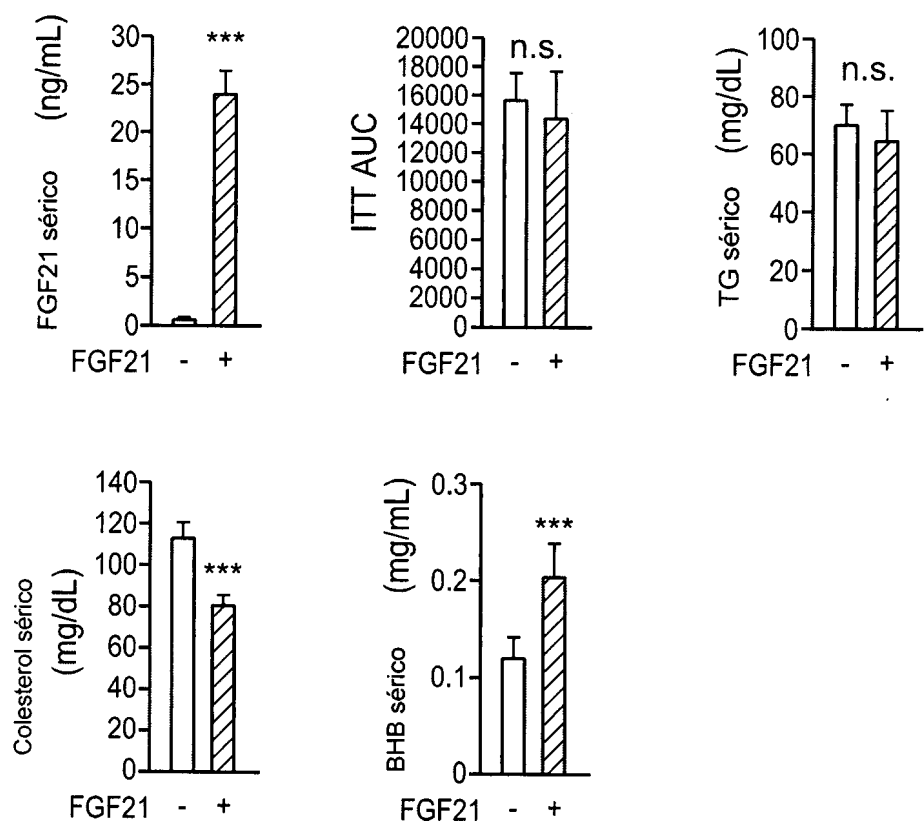


FIG. 3E





**FIG. 3F**

FIG. 4A

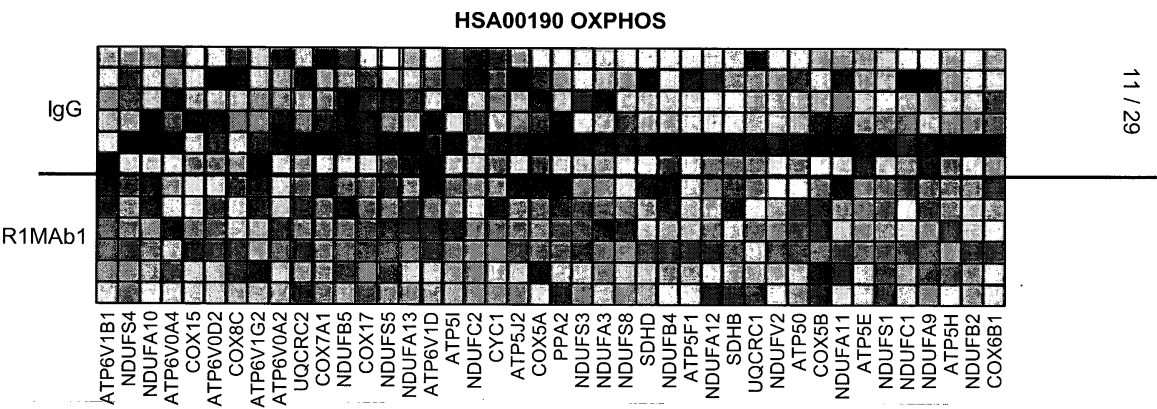


FIG. 4A-1

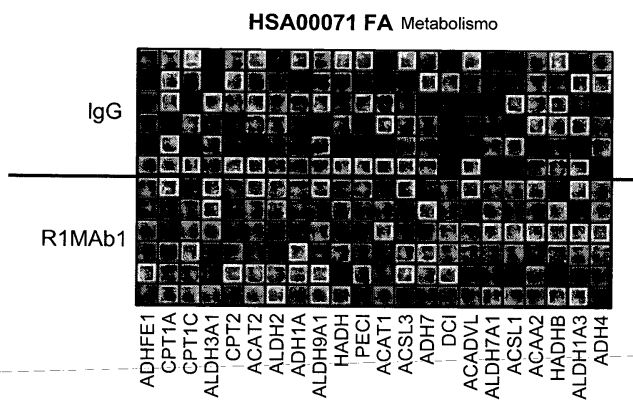


FIG. 4A-2



13 / 29

FIG. 4B

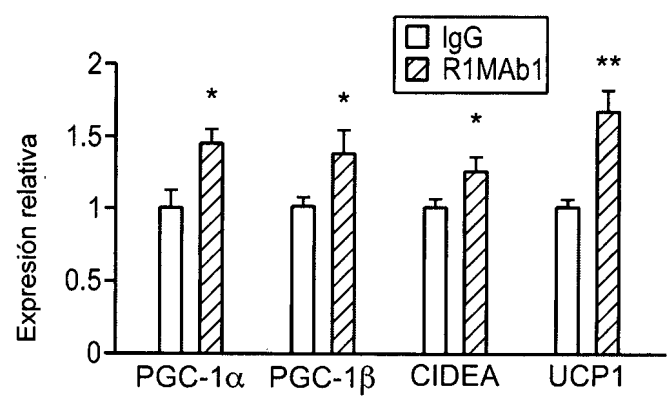
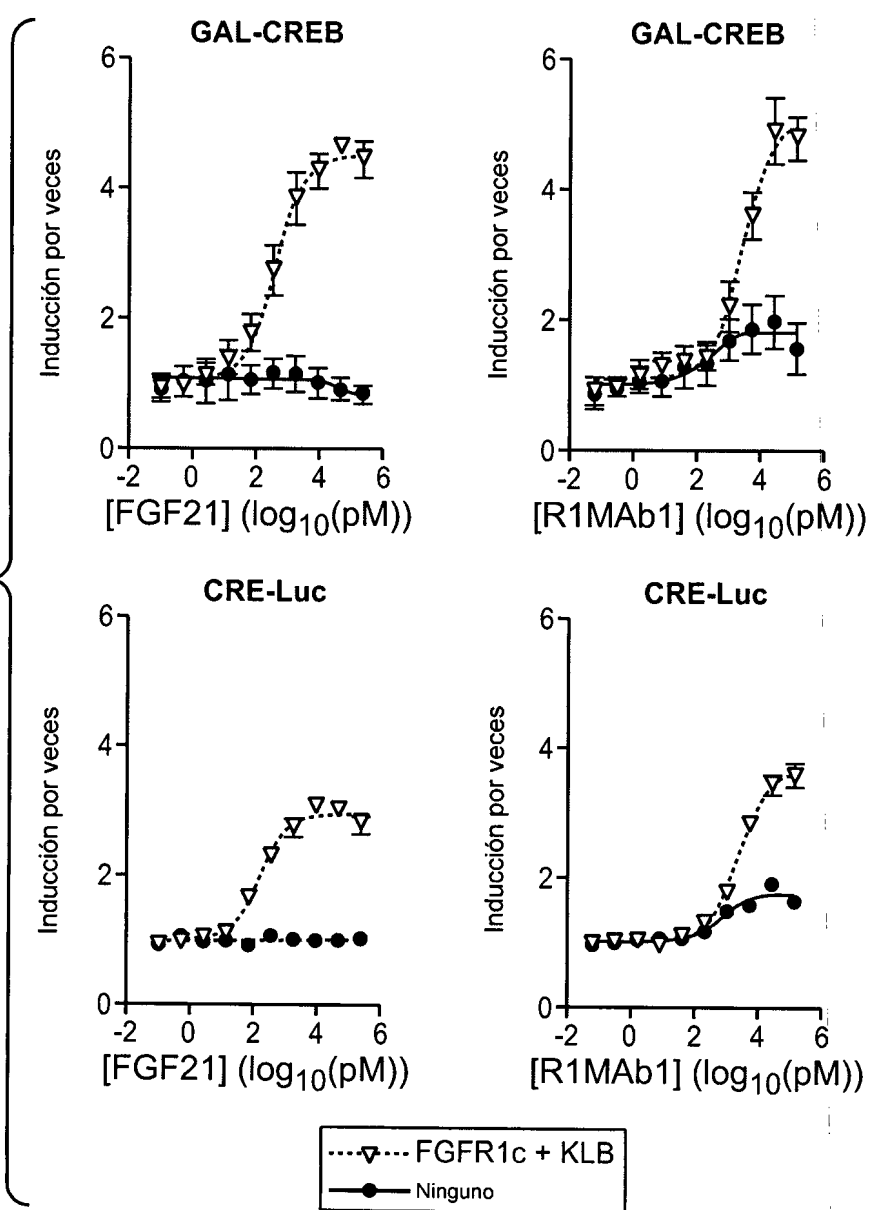


FIG. 4C



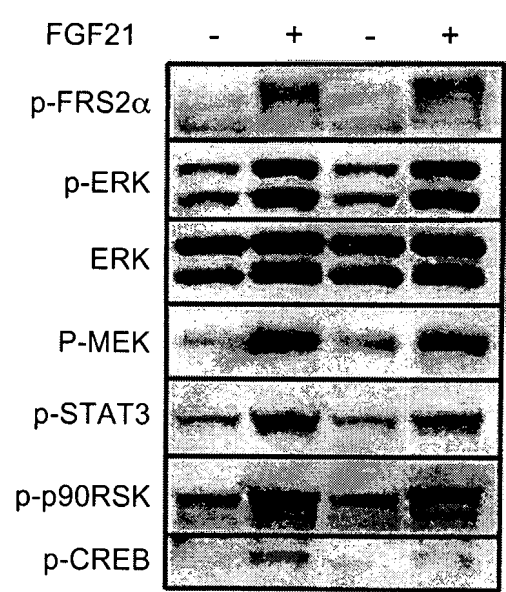


FIG. 4D

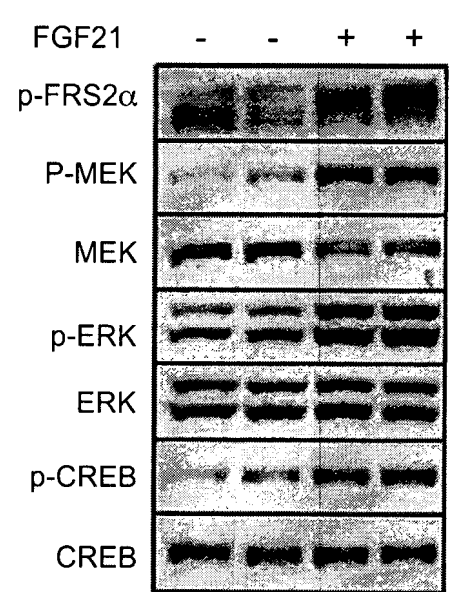


FIG. 4E

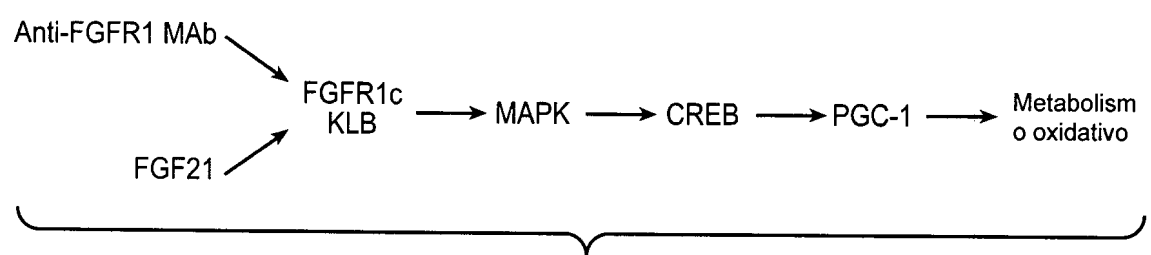


FIG. 4F

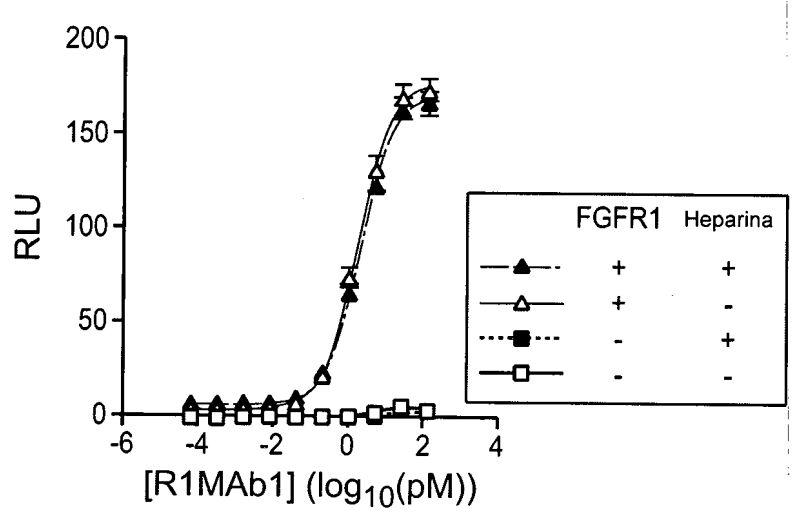
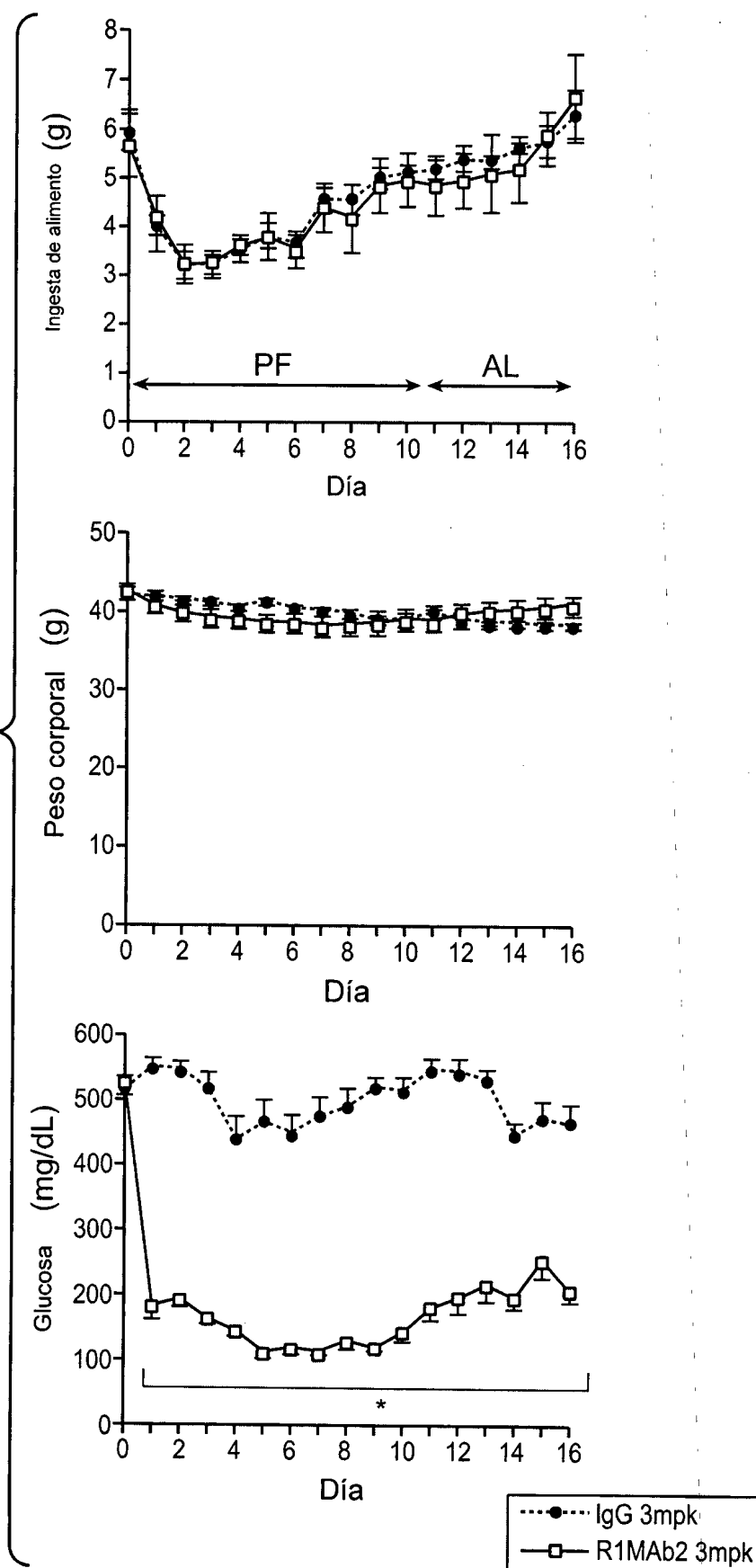
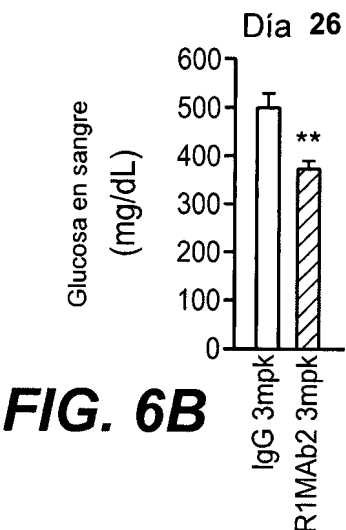


FIG. 5

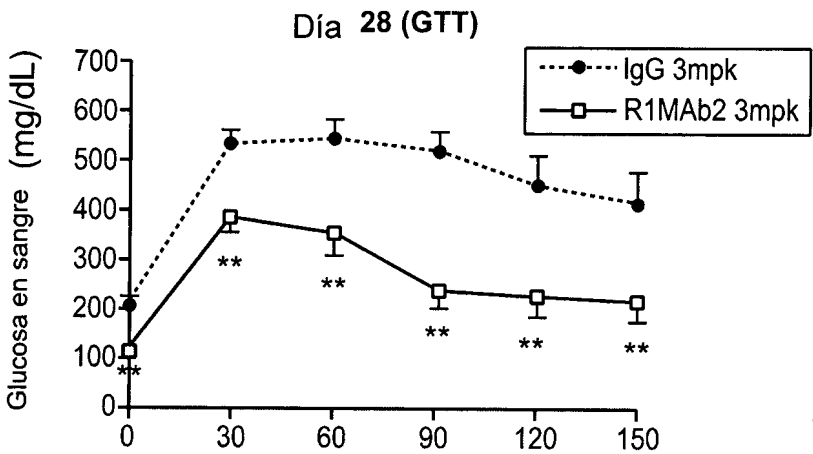
15 / 29

FIG. 6A

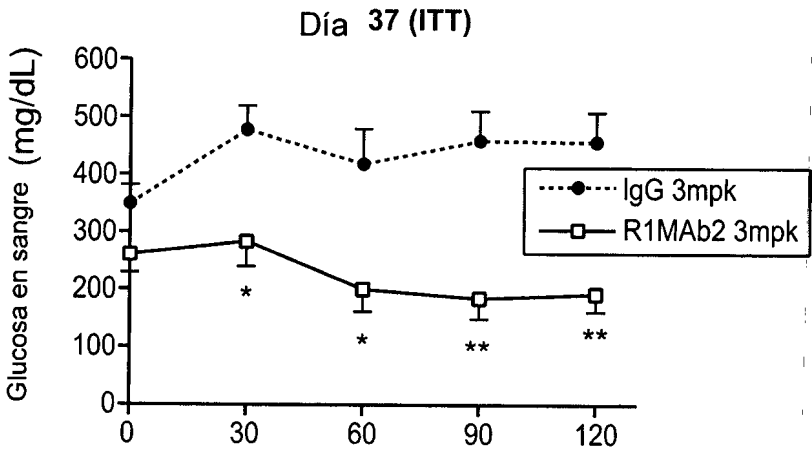




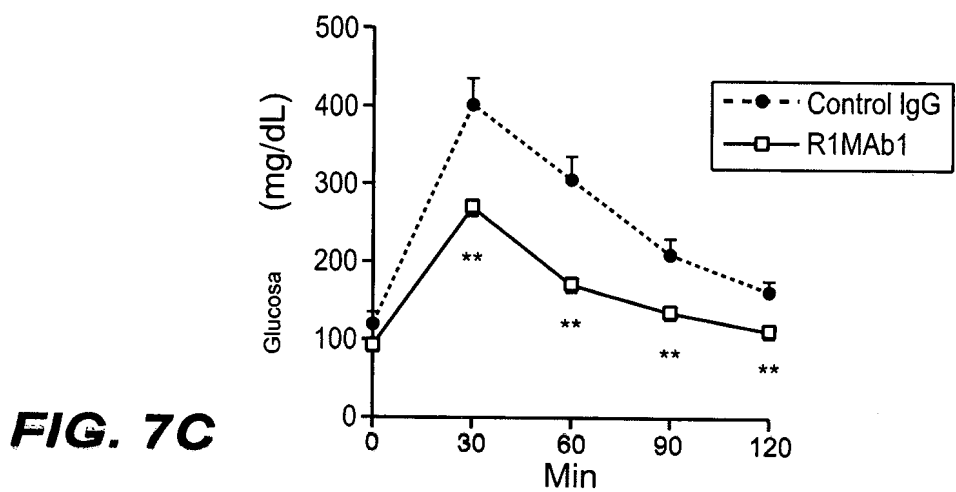
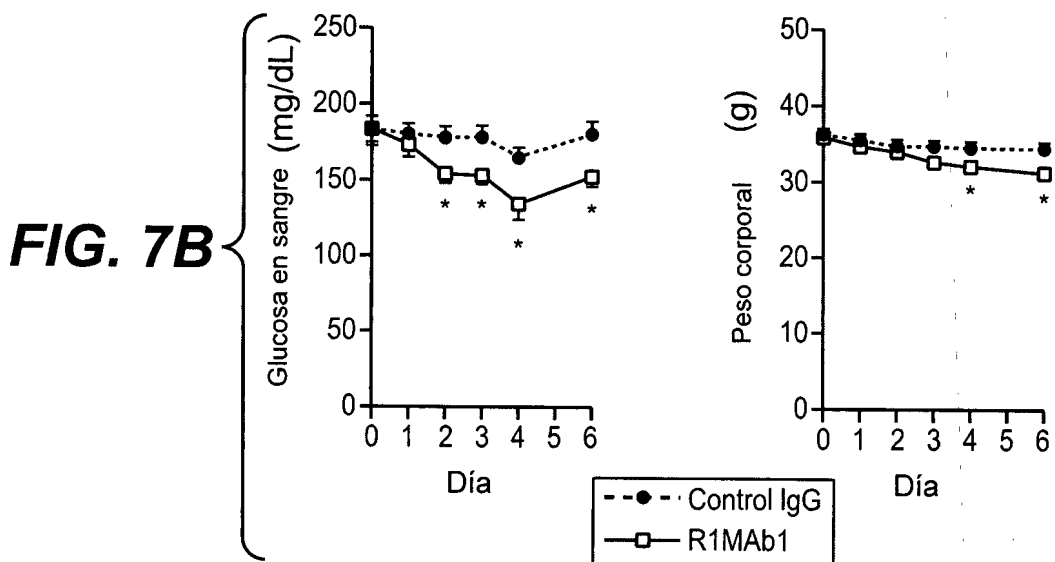
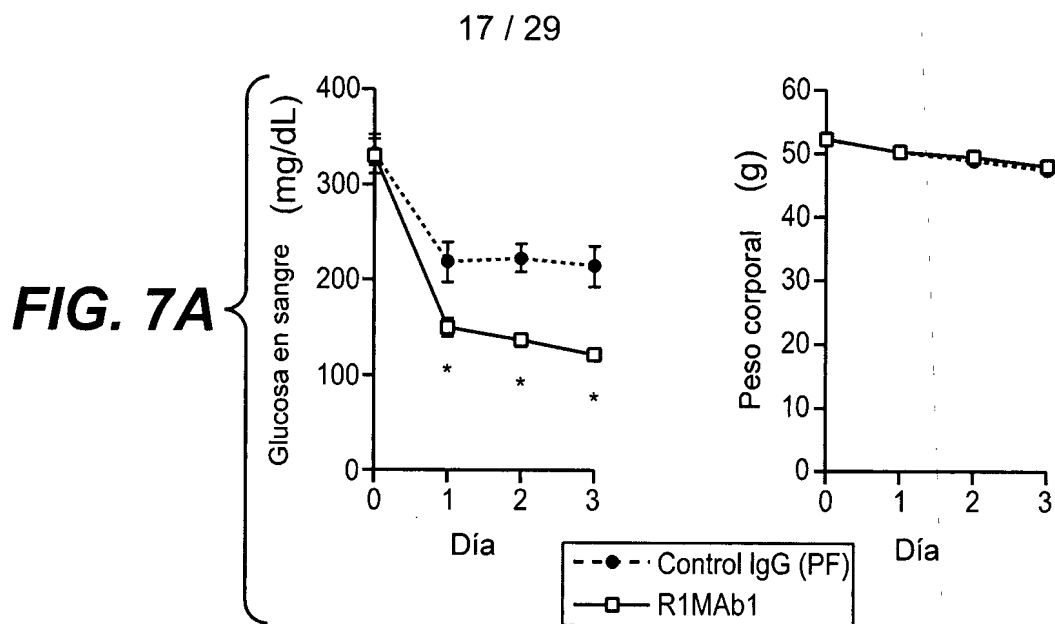
**FIG. 6B**

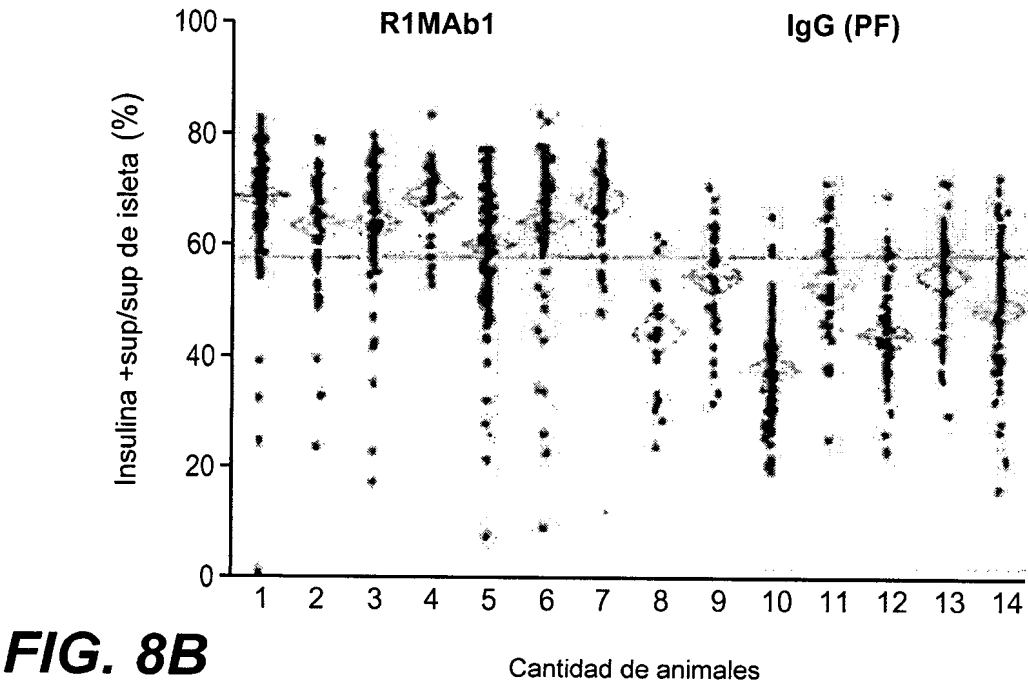
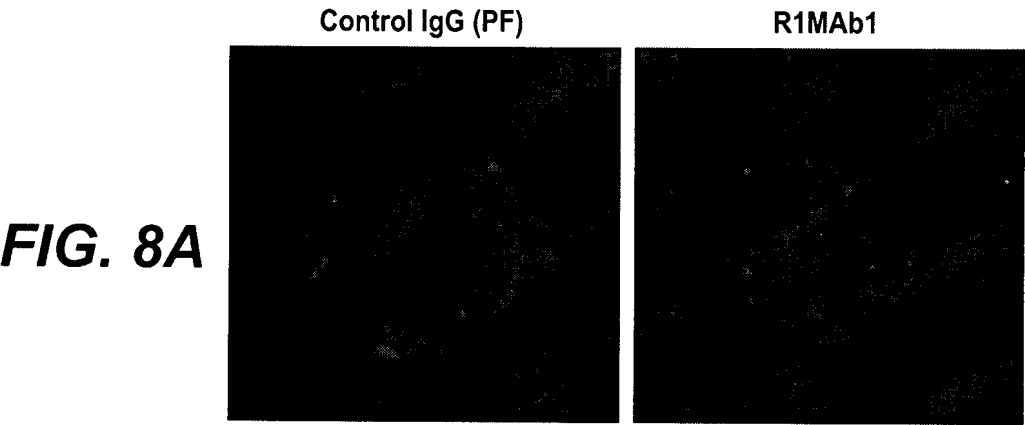
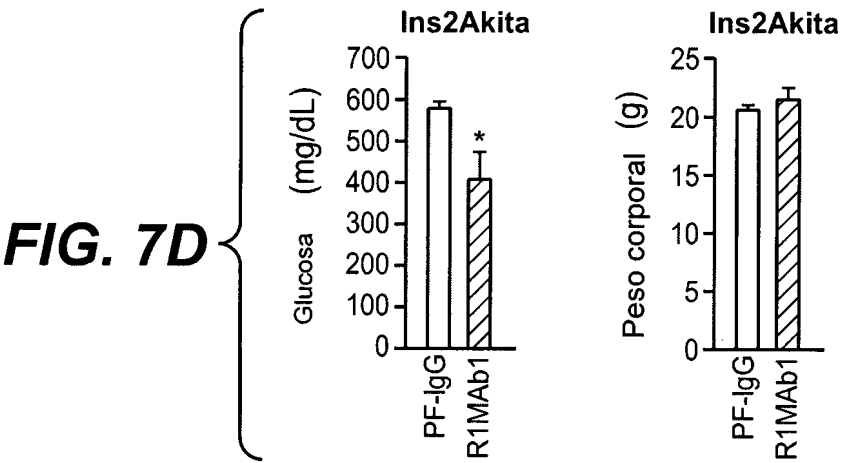


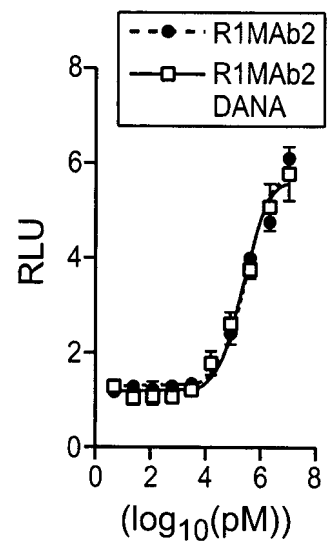
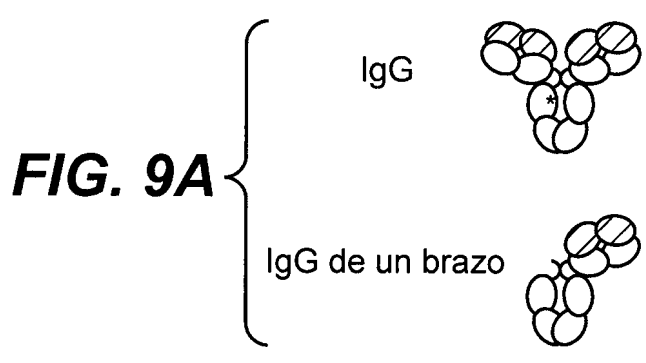
**FIG. 6C**



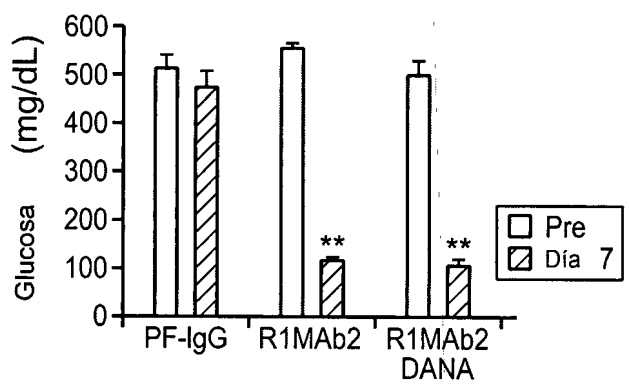
**FIG. 6D**



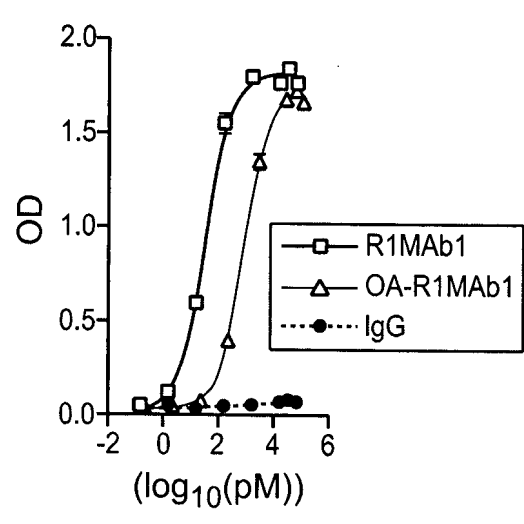




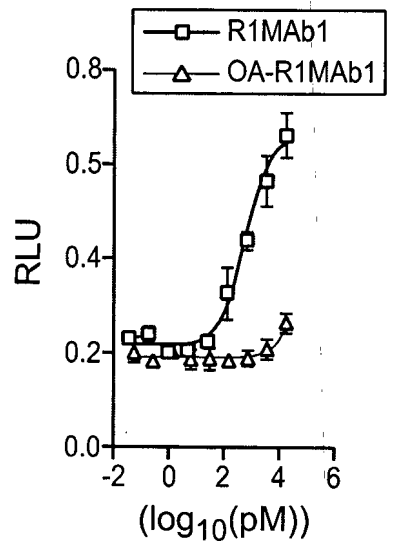
**FIG. 9B**



**FIG. 9C**



**FIG. 9D**



**FIG. 9E**

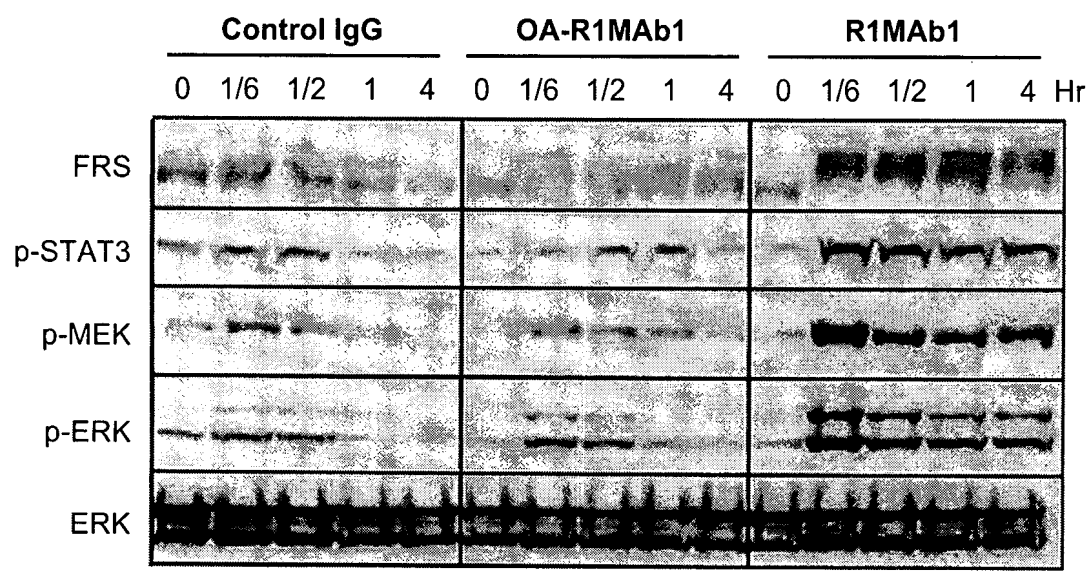


FIG. 9F

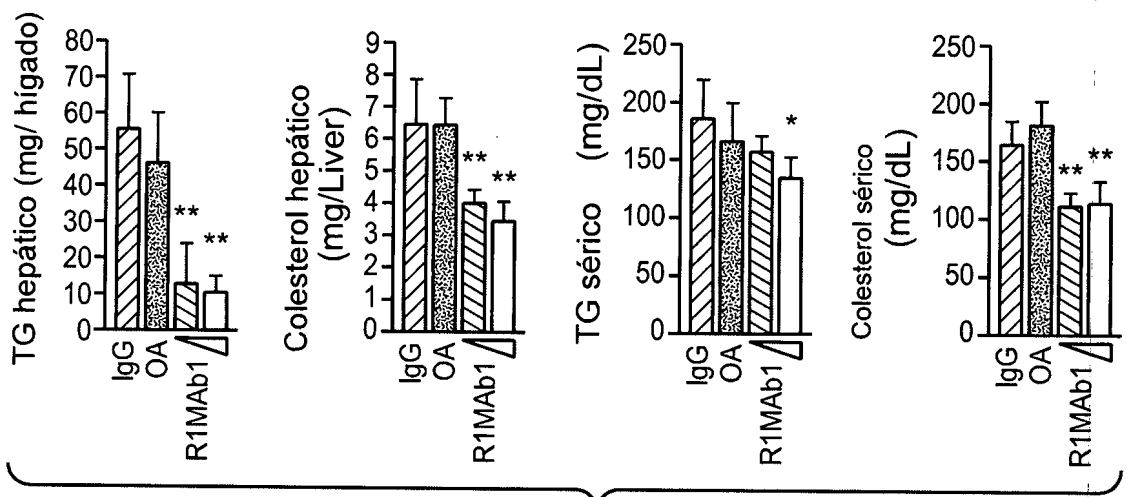
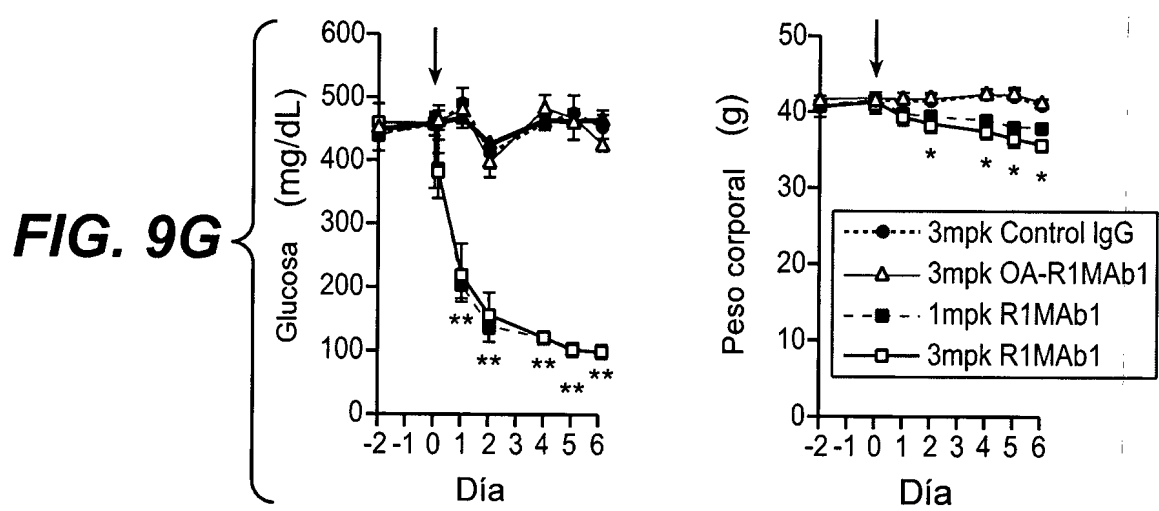


FIG. 9H



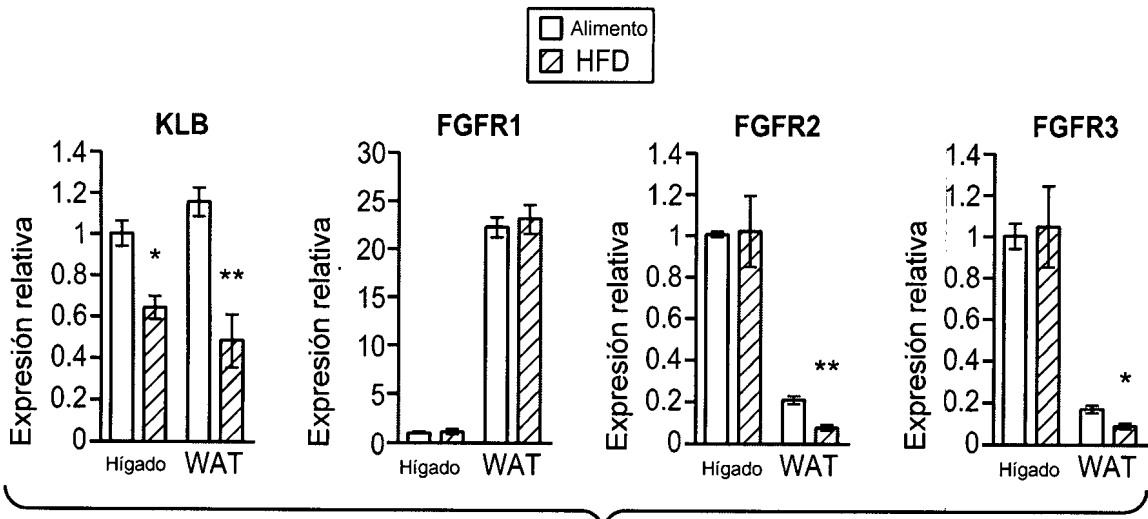


FIG. 10

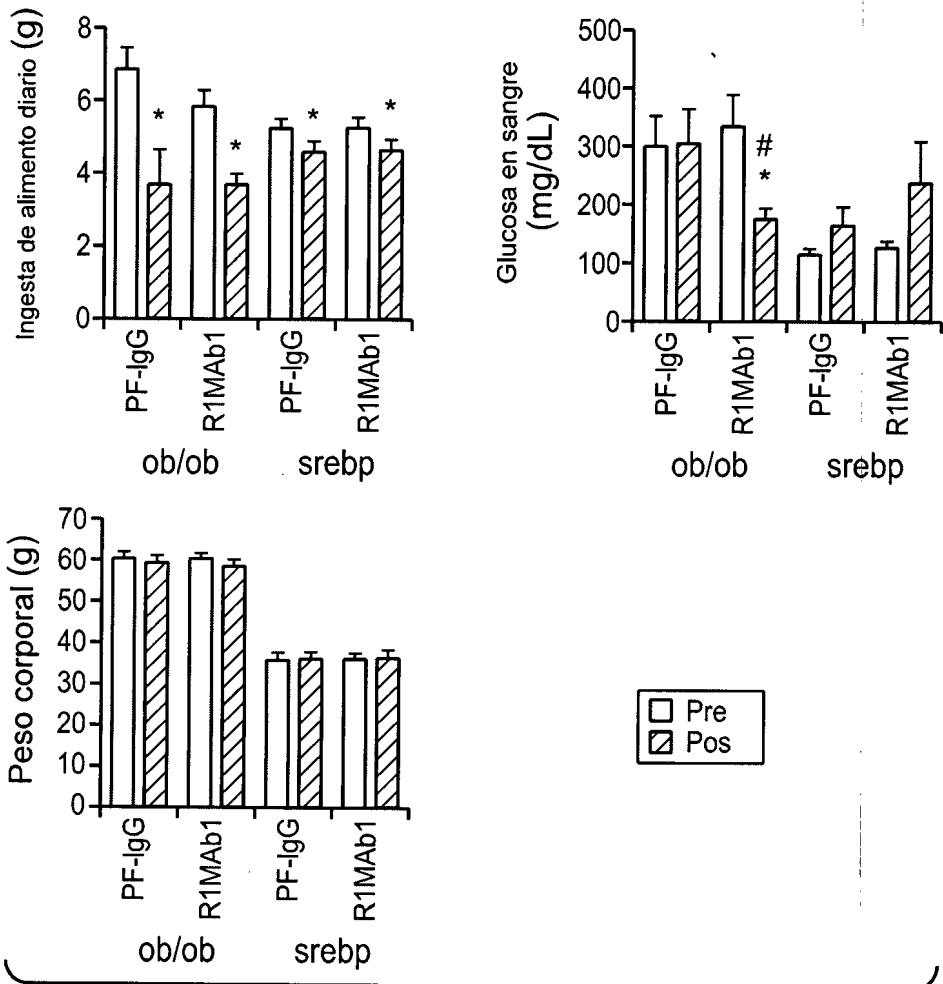


FIG. 11

22 / 29

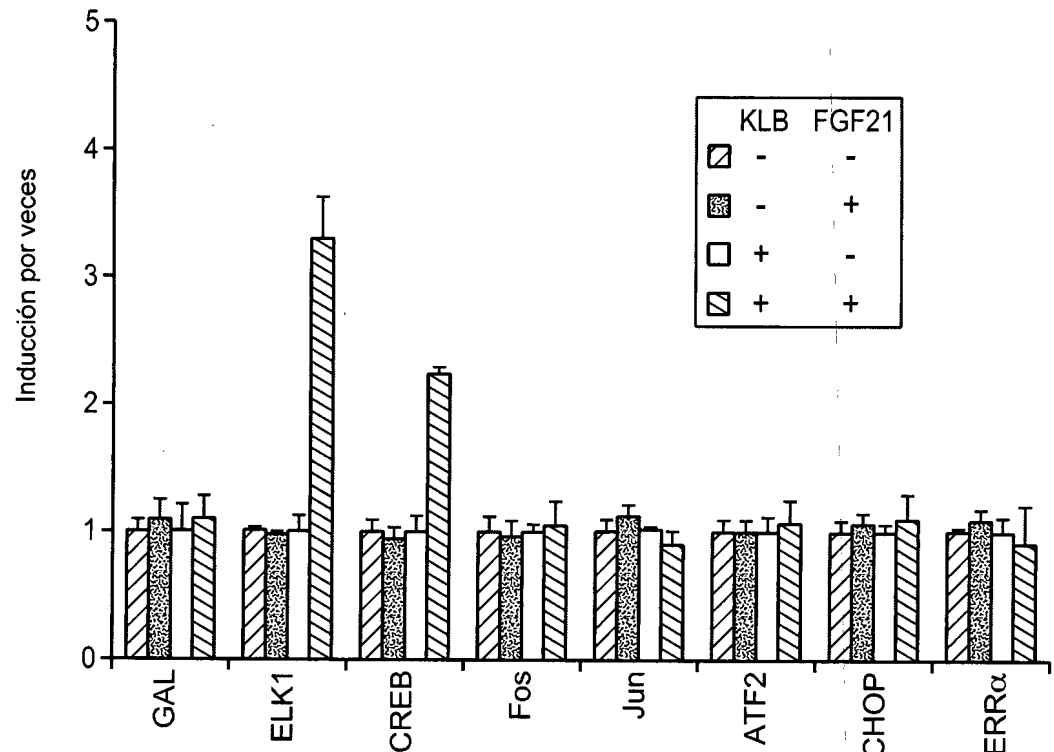


FIG. 12A

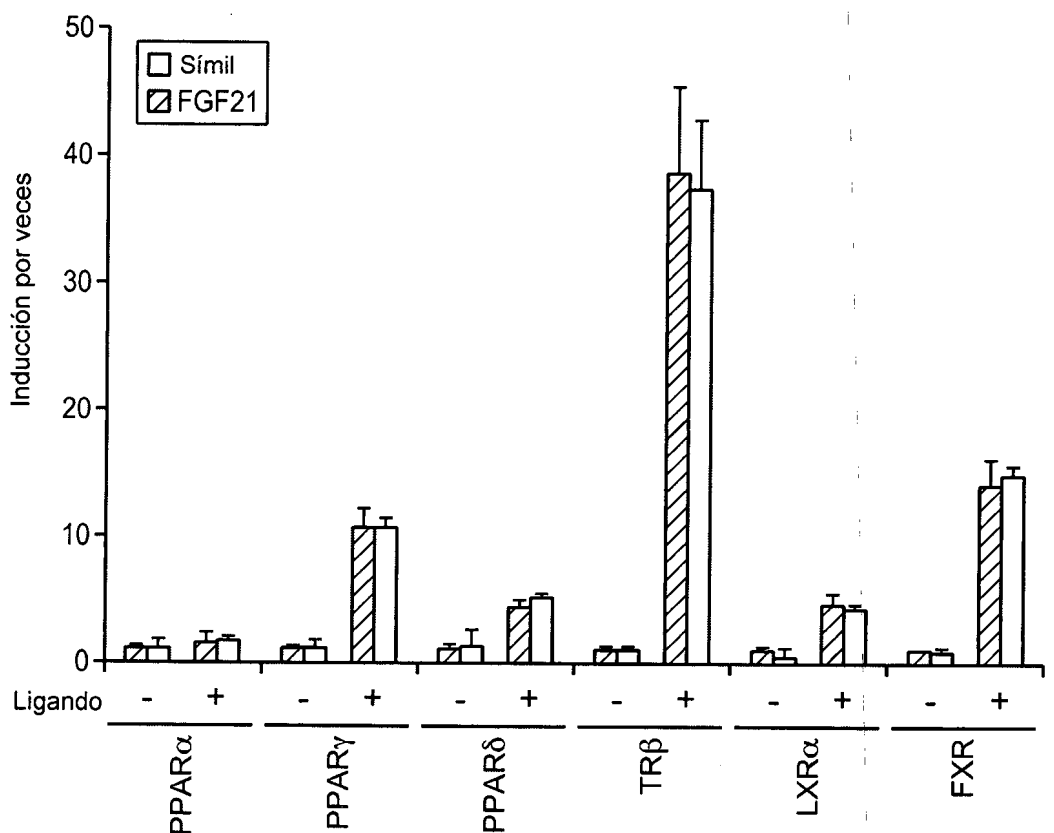


FIG. 12B

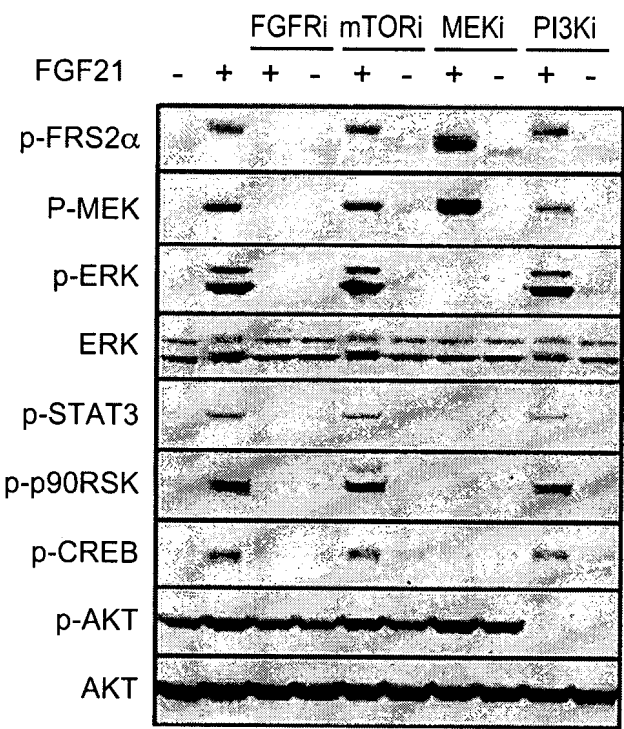


FIG. 12C

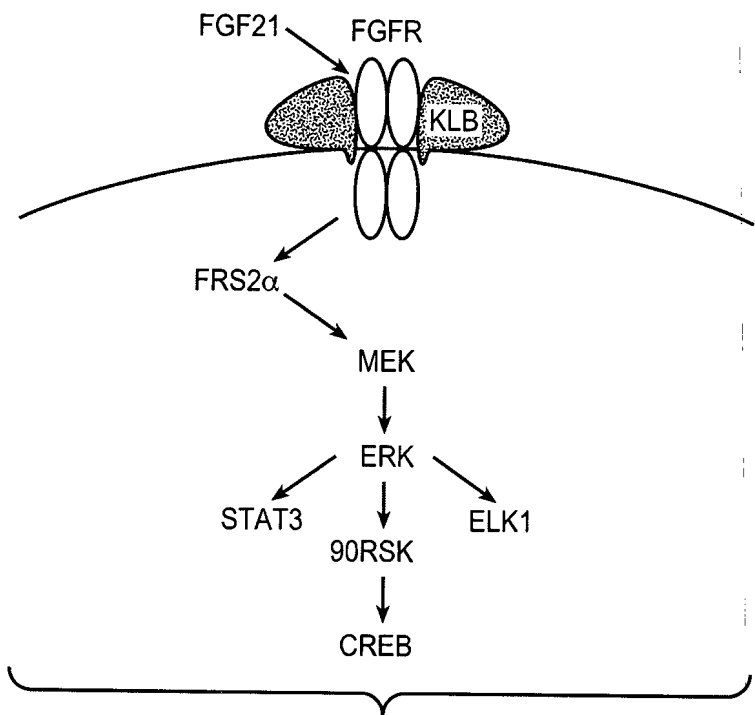


FIG. 12D

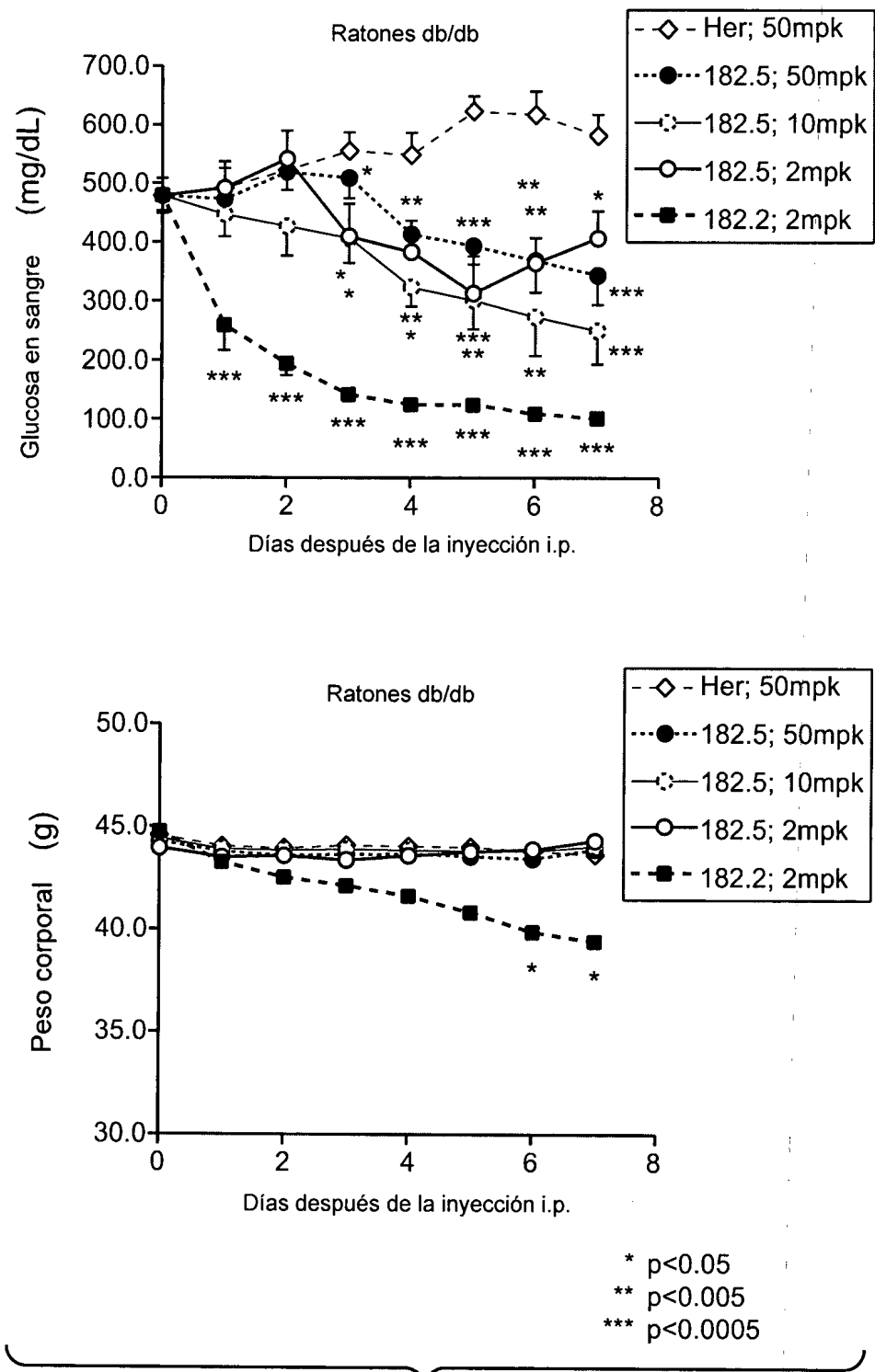


FIG. 13

25 / 29

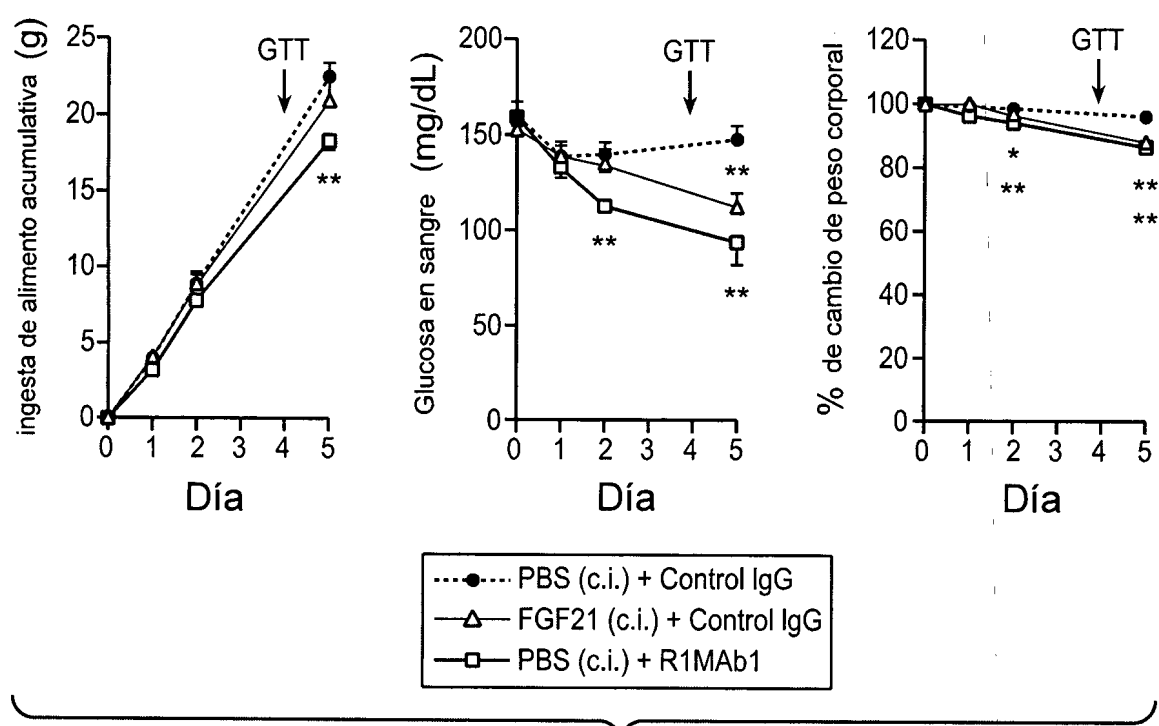


FIG. 14A

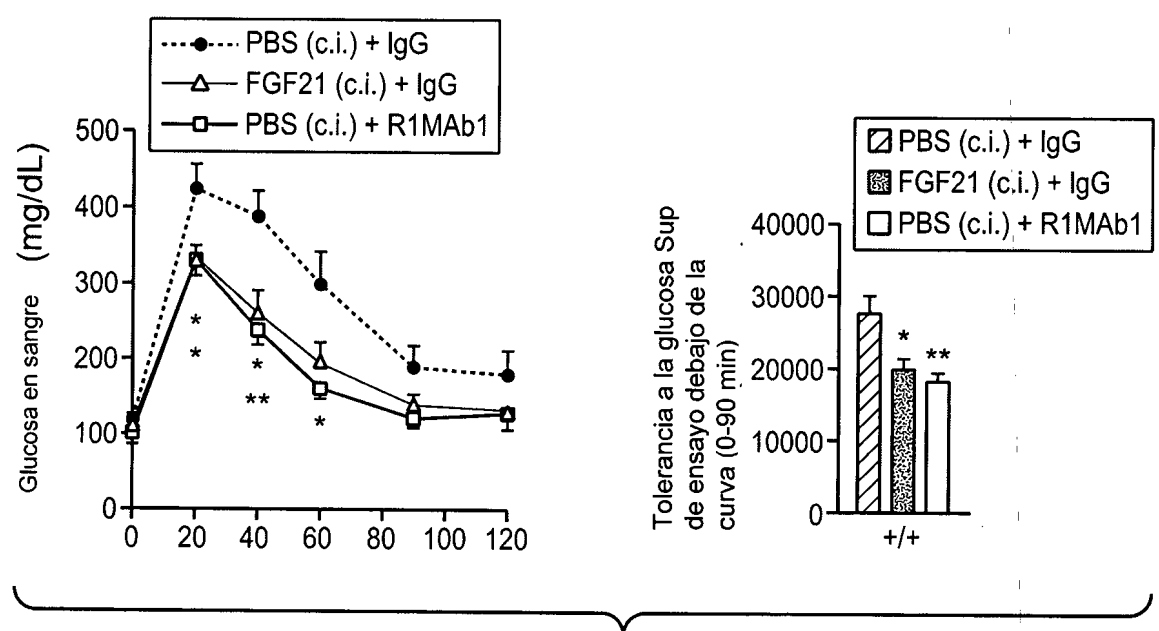
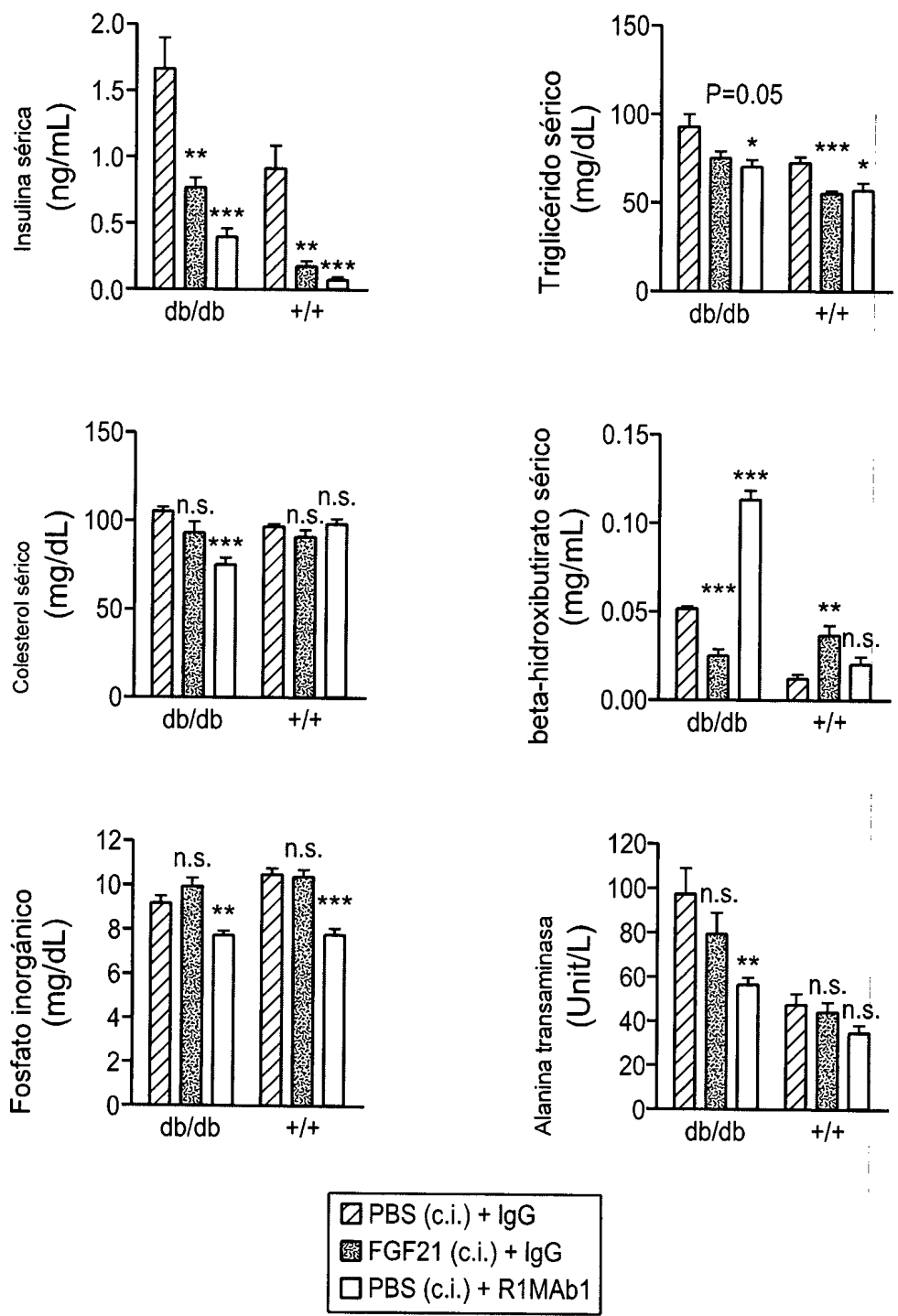
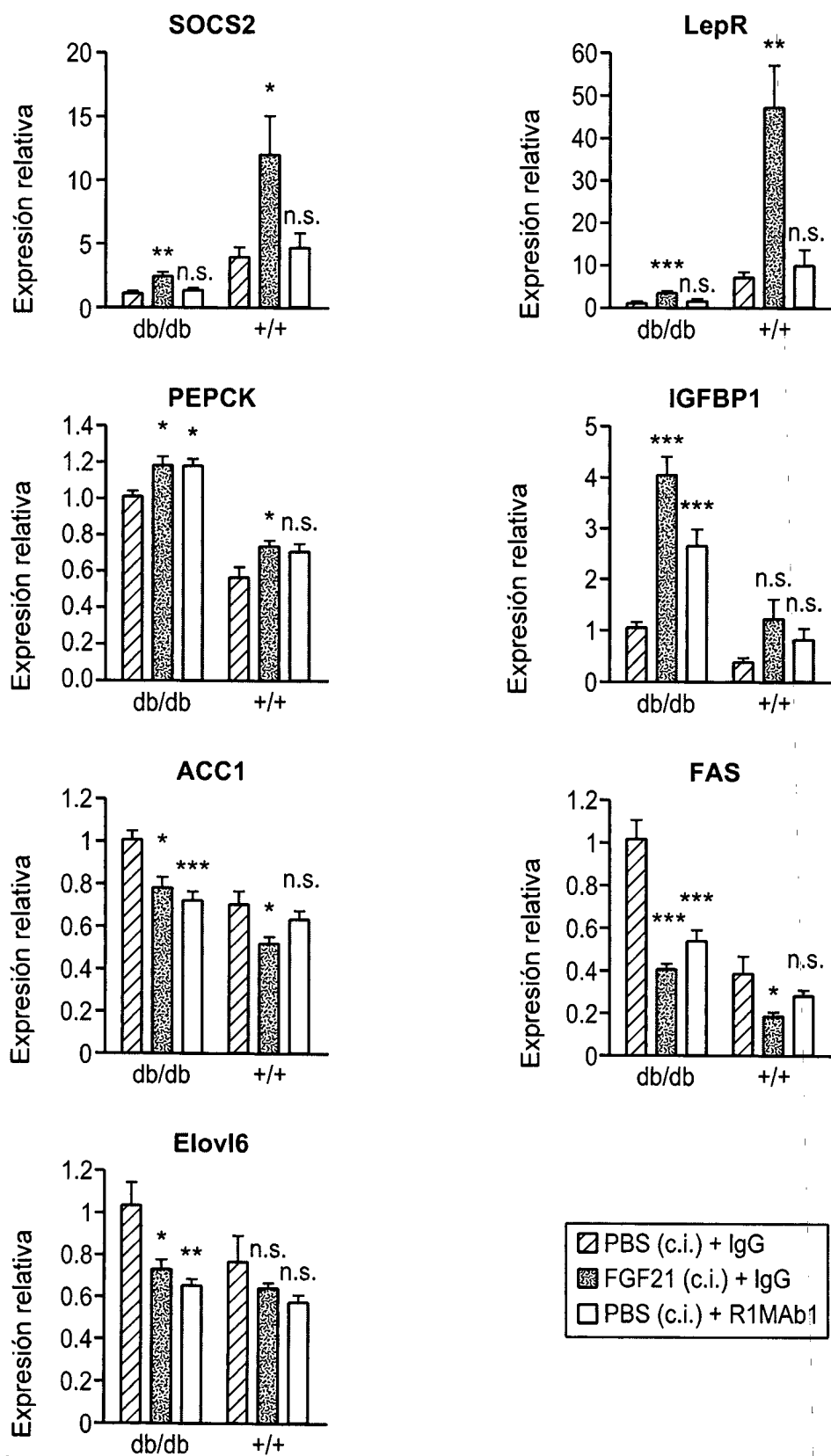


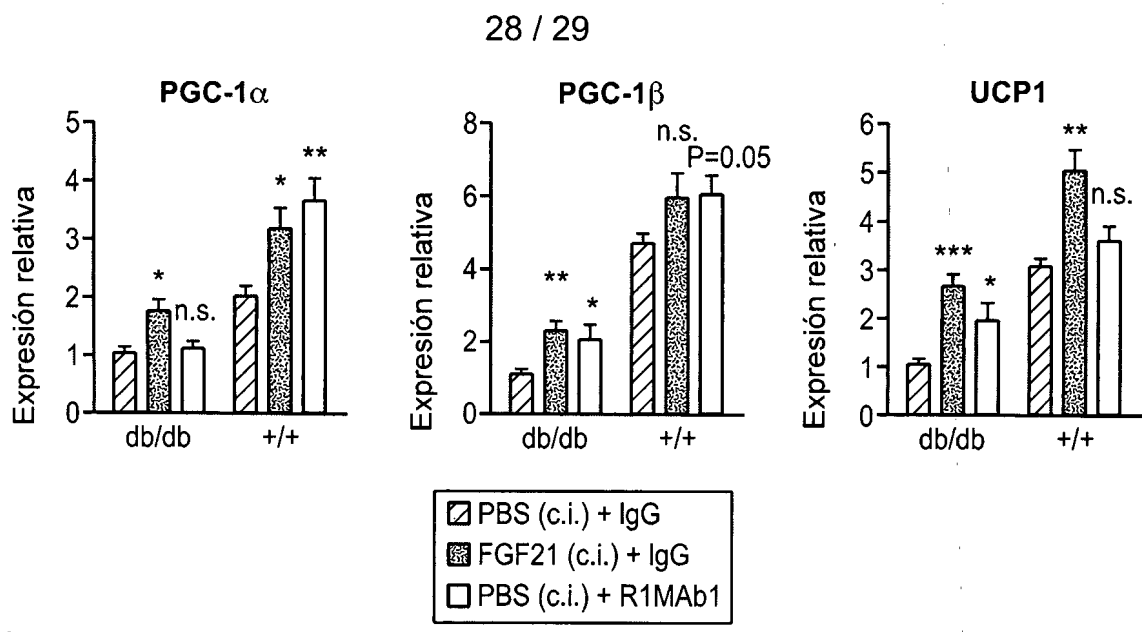
FIG. 14B



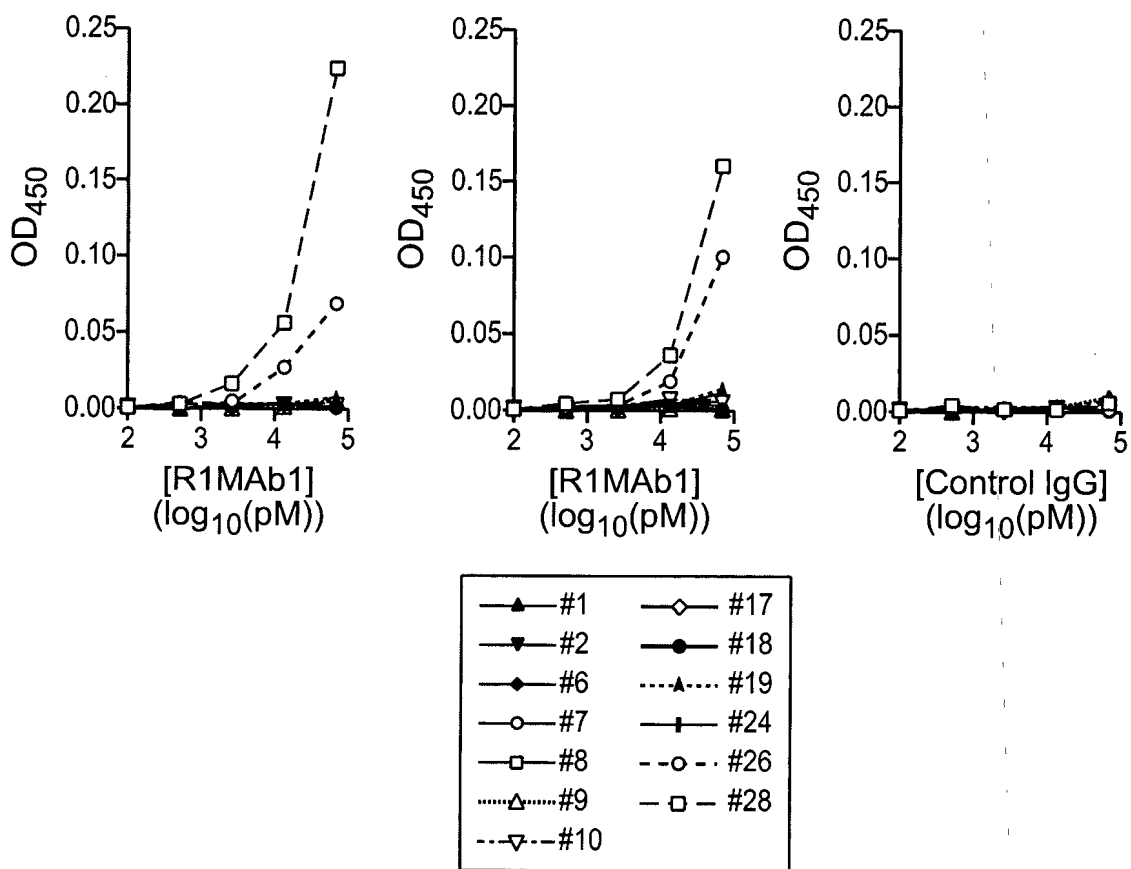
**FIG. 14C**

27 / 29

**FIG. 15**



**FIG. 16**



**FIG. 17A**



161

...MEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATW...

212

FGFR1:KLHAVPAAKTVKFKCP (#26)

FKPDHRIGGYKVRY (#28)

FGFR2:RLHAVPAANTVKFRCP

FKQEHHRIGGYKVRN

FGFR3:KLLAVPAANTVRFRCF

FRGEHRIGGIKLRH

FGFR4:KLHAVPAGNTVKFRCP

FHGENRIGGIQLRH

FIG. 17B

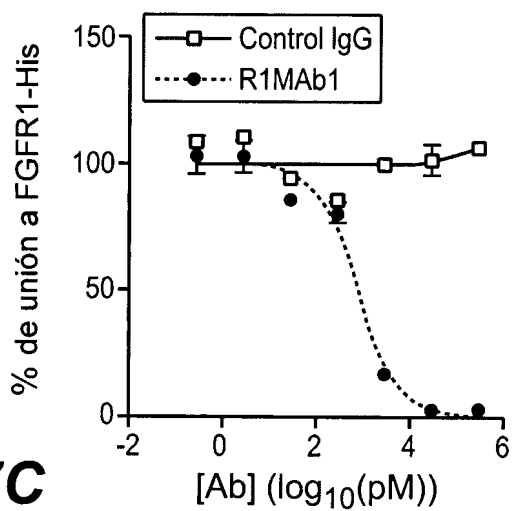


FIG. 17C

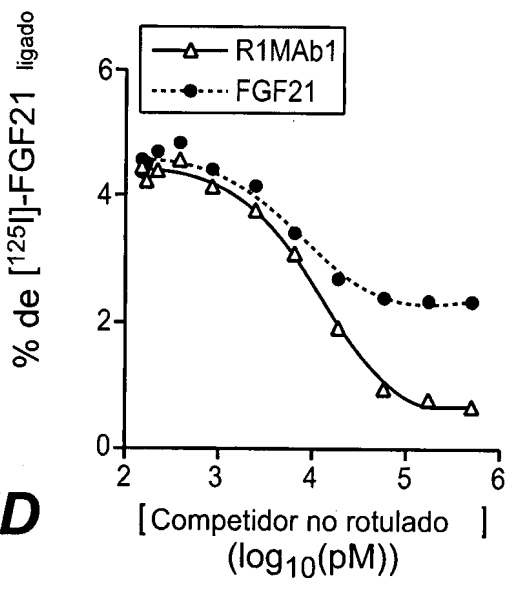


FIG. 17D

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. ET AL.  
<120> AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO  
<130> P4653R1W0  
  
<140>  
<141>  
  
<150> 61/536.936  
<151> 2011-09-20  
  
<150> 61/486.731  
<151> 2011-05-16  
  
<160> 63  
<170> PatentIn versión 3.5  
  
<210> 1  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 1  
Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys  
1 5 10 15  
Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe  
20 25 30  
  
Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys  
35 40 45  
  
Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val  
50 55 60  
  
Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp  
65 70 75 80  
  
Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn  
85 90 95  
  
His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile  
100 105 110  
  
Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn  
115 120 125  
  
Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln  
130 135 140  
  
Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn  
145 150 155 160  
  
Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asp  
165 170 175  
  
Ala Glu Val Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Gln Ser Gly Glu  
180 185 190  
  
Tyr Val Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Glu Ala Asn Gln Ser Ala  
195 200 205  
  
Trp Leu Thr Val Thr Arg Pro Val Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Pro  
210 215 220  
  
Ala Val Met Thr Ser  
225  
  
<210> 2  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido  
sintético"  
  
<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr  
 20 25 30  
 Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile  
 35 40 45  
 Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg  
 50 55 60  
 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Gly Tyr Gly  
 85 90 95  
 Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Ile  
 35 40 45  
 Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg  
 50 55 60  
 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Phe Asp  
 85 90 95  
 Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105

<210> 4

<211> 102

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn  
 20 25 30  
 Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile  
 35 40 45  
 Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg  
 50 55 60  
 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu

65                      70                      75                      80

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

Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100

```
<210> 5
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 5  
Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys  
1 5 10 15

Met Glu Lys Lys<sub>20</sub> Leu His Ala Val<sub>25</sub> Pro Ala Ala Lys Thr Val<sub>30</sub> Lys Phe

Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys  
 35 40 45  
 Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Tyr Lys Val  
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Ser  
225

```
<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

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

<400> 6  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

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

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

<400> 7  
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Trp Ile Ser  
 1 5 10

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

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

<400> 8  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Tyr Ile His  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 9  
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn Trp Ile Ser  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

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

Lys Gly

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 11  
 Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 12  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 12  
 Ala Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 13  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 13  
 Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

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

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

<400> 14  
 Ala Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 1 5 10 15

Lys Gly

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

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

<400> 15  
 Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

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

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

<400> 16  
 Ser Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 17  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 17  
Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

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

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

<400> 18  
Glu His Phe Asp Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 19  
Thr Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr  
1 5

<210> 20  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 20  
Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr  
1 5

<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 21  
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

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

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

<400> 22  
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
1 5

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

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

<400> 23  
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr  
1 5

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

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

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

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia respecto de las anotaciones para dichas posiciones"

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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



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

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

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia respecto de la anotación para dicha posición"

<400> 25  
 Asp Ile Asp Pro Asn Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

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

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

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(5)

```

<223> /reemplazar="Thr"

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Thr"

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(8)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia
        respecto de las anotaciones para dichas posiciones"

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia
        respecto de la anotación para dicha posición"

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

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

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

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

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

Arg Tyr Ala Thr Trp
          50

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

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

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

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 29
Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
1          5          10

```

<210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 30  
 Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro  
 1 5 10 15

<210> 31  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 31  
 Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro  
 1 5 10 15

<210> 32  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 32  
 Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro  
 1 5 10 15

<210> 33  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 33  
 Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn  
 1 5 10

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

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

<400> 34  
 Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His  
 1 5 10

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

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

<400> 35  
 Phe His Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His  
 1 5 10

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

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
  
<400> 36  
Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val  
1 5 10 15

Ala Pro Tyr

<210> 37  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
  
<400> 37  
Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu  
1 5 10 15

His Ala Val

<210> 38  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
  
<400> 38  
Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro  
1 5 10 15

Ser Ser Gly

<210> 39  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
  
<400> 39  
Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn  
1 5 10 15

Gly Lys Glu

<210> 40  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
  
<400> 40  
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys  
1 5 10 15  
Val Arg Tyr

<210> 41  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 41  
Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val  
1 5 10 15

Pro Ser Asp

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

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

<400> 42  
Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu  
1 5 10 15

Tyr Gly Ser

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

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

<400> 43  
Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu  
1 5 10 15

Arg Ser Pro

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

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

<400> 44  
Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala  
1 5 10 15

Asn Lys Thr

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

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

<400> 45  
Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys  
1 5 10 15

Lys Val Tyr

<210> 46  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 46  
Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys  
1 5 10 15

His Ile Glu

<210> 47  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 47  
 Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Tyr Val

<210> 48  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 48  
 Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Glu

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

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

<400> 49  
 Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Ala

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

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

<400> 50  
 Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ser

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

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

<400> 51  
 Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Glu

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

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

<400> 52  
 Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro  
 1 5 10 15

Ala Ala Lys

<210> 53  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
 <400> 53  
 Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Lys

<210> 54  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
 <400> 54  
 Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Thr

<210> 55  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
 <400> 55  
 Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Asn

<210> 56  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
 <400> 56  
 Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Asp

<210> 57  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
 <400> 57  
 Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Gly

<210> 58  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
 <400> 58  
 Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Trp Ser Ile

<210> 59  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
<400> 59  
His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile  
1 5 10 15  
Met Asp Ser

<210> 60  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
<400> 60  
Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser  
1 5 10 15  
Ser

<210> 61  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"  
<400> 61  
Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 62  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 62  
Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg  
1 5 10

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

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

<400> 63  
Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn  
1 5 10





## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                         |                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>P4653R1-WO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>See Form PCT/PEA/416                                                                                                                       |                                              |
| International application No.<br>PCT/US2012/037964                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | International filing date (day/month/year)<br>15.05.2012                                                                                                                | Priority date (day/month/year)<br>16.05.2011 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>INV. C07K16/28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                         |                                              |
| Applicant<br>Genentech, Inc.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                         |                                              |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).</p> |                                                                                                                                                                         |                                              |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                         |                                              |
| Date of submission of the demand<br><br>15.12.2012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Date of completion of this report<br><br>09.07.2013                                                                                                                     |                                              |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br> European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas<br>Tel. +31 70 340 - 2040<br>Fax: +31 70 340 - 3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Authorized officer<br><br>Siaterli, Maria<br><br>Telephone No. +31 70 340-8922<br> |                                              |

# INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.  
PCT/US2012/037964

## Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
  - ☒ 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 (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
    - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
    - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements\*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

### Description, Pages

1-4, 10-47, 49 as originally filed  
5-9, 48 filed with telefax on 15-12-2012

### Sequence listings, SEQ ID NO

1-63 as originally filed

### Claims, Numbers

1-36 as originally filed

### Drawings, Sheets

1/29-29/29 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
  - ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
  - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
  - ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ 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 70.2 (e)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY

International application No.  
PCT/US2012/037964

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

| Box No. II                  | Priority                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. <input type="checkbox"/> | This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:<br><input type="checkbox"/> copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(a)).<br><input type="checkbox"/> translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(b)). |
| 2. <input type="checkbox"/> | This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64.1). Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.                                                                                                       |
| 3.                          | Additional observations, if necessary:<br><u>see separate sheet</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

| Box No. V                                  | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |                                      |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Statement                               |                                                                                                                                                                 |                                      |
| Novelty (N)                                | Yes: Claims                                                                                                                                                     | <u>1-6, 10, 12-21, 29, 30, 32-36</u> |
|                                            | No: Claims                                                                                                                                                      | <u>7-9, 11, 22-28, 31</u>            |
| Inventive step (IS)                        | Yes: Claims                                                                                                                                                     | <u>1-6, 10, 12-21, 29, 30, 32-36</u> |
|                                            | No: Claims                                                                                                                                                      | <u>7-9, 11, 22-28, 31</u>            |
| Industrial applicability (IA)              | Yes: Claims                                                                                                                                                     | <u>1-36</u>                          |
|                                            | No: Claims                                                                                                                                                      |                                      |
| 2. Citations and explanations (Rule 70.7): | <u>see separate sheet</u>                                                                                                                                       |                                      |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**International application No.  
PCT/US2012/037964

---

**Box No. VI Certain documents cited**

---

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

---

**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

---

**Supplemental Box relating to Sequence Listing**

---

**Continuation of Box I, item 2:**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, 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 and/or examination☐ to this Authority as an amendment on

- 2.
- ☐
- 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.

3. Additional comments:

\* If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."

**Re Item V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1 PRELIMINARY OBSERVATIONS**

- 1.1 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 1-6,34-36 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.
- 1.2 Present claim 1 encompasses compounds defined only by their desired function FGFR1 agonists, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description, i.e. anti FGFR1 agonistic antibodies. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly.
- 1.3 The priority is validly claimed. Therefore document D5, cited as P-document is the Search report and referred to in the Written opinion is not relevant.
- 1.4 Reference is made to the following documents:  
**D1:** WO 2005/066211 A2  
**D2:** WO 01/04160 A1  
**D3:** WO 2005/037235 A2  
**D4:** Sun et al: "Monoclonal antibody antagonists of hypothalamic FGFR1 cause potent but reversible hypophagia and weight loss in rodents and monkeys", American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, vol. 292, no. 3, 2007-03-01, pages E964-E976, XP008085179.
- 1.5 **D1** describes agonistic anti FGFR1 antibodies (claims 1, 6) recognizing among others SEQ ID NO 9 and 10, which include peptide 28 (SEQ ID NO 28) of present application
- 1.6 **D2** describes anti-idiotypic antibodies of FGF's binding to FGFR1 and has agonistic activity (page 5, line 29-page 6, line 6, page 6, lines 9-10, 14-16, § 1-3, § 2-3).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY  
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2012/037964

epitopes within SEQ ID NO 28 or 29, neither are necessarily agonistic. Said claims relate to further anti FGFR1 antibodies without unexpected properties. Thus, they represent arbitrary, non inventive solutions to the problem posed.

- 3.5 On the contrary claims 10, 17, 19 relate to antibodies binding to SEQ ID NO 28 or 29. Said epitopes were neither identified nor suggested in the available prior art. Moreover exemplified antibodies R1MAb1 & R1MAb2 not only are potent agonists as dimers, but also they do not affect the activity of FGF (ligand independent effect). They were shown to have additive effect with FGF21 (example 1). All these features were unexpected Thus the subject-matter of claims 10,17,19 involves an inventive step (Article 33(3) PCT).
- 3.6 Claims 1-6,29-30,32-36 relate to the use of FGFR1 agonists for treating metabolic disorders including obesity, diabetes etc. D3 which is considered to represent the most relevant state of the art for the subject-matter of said claims, discloses anti FGFR1 antagonistic antibodies for treating obesity, diabetes and reducing food intake. Antibody FR1-A1 binds strongly to FGFR1c, but less to other receptors (example 14). It also inhibits ligand binding to receptor with IC50 of 5nM for FGF1. FR1-A1 inhibits ligand induced phosphorylation of the receptor. FR1-A1 induces rapid weight loss (example 16). FR1-4H and FR1-H7 are further neutralizing antibodies and FR1-H7 does not activate the receptor it self (examples 7, 17-18). Treatment of diabetes is claimed. D4 provides a similar disclosure.
- 3.7 The difference of claims 1-6,29-30,32-36 is the use of an anti FGFR1 agonistic antibody instead of an antagonistic one. There is no particular effect associated with the difference.
- 3.8 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of further treatment for the listed metabolic disorders.
- 3.9 The solution proposed in claims 1-6,29-30,32-36 is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT). The use of agonistic FGFR1 antibodies, in particular of antibodies R1MAb1 & R1MAb2 was shown to have anti diabetic activity (example 2). Moreover, the prior art teaches the opposite, Thus the skilled person, being rather reluctant to set up an experimental plan, would not consider without inventive skills to use agonistic antibodies

**Re Item VI Certain documents cited**

D5: Wu et al: "Amelioration of type 2 diabetes by antibody-mediated activation of fibroblast growth factor receptor 1.", Science Translational Medicine, vol. 3, no. 113, 14 December 2011 (2011-12-14), page 113RA126, XP008153178.

**Re Item VIII Certain observations on the international application**

- 1.1 It is not sufficient to characterise an antibody with one of the CDR sequences since an antibody is structurally made of two light and two heavy chains and it needs at least 6 CDR's to confer antigen binding specificity. Unless the contrary is shown it is considered that 3 CDR's are neither equivalent to an antibody, nor sufficient to define the specificity of an antibody. Since claims 12-16,17 do not clearly define the structure of the antibodies, they do not meet the requirement following from Article 6 PCT.
- 1.2 It seems also essential that the antibodies are in a bivalent form in order to be agonistic (example 1). Thus, for the definition of the invention it is essential that the antibodies are be bivalent. Since claims 7-36 does not contain this feature it does not meet the requirement following from Article 6 PCT taken in combination with Rule 6.3(b) PCT that the claims must contain all the technical features essential to the definition of the invention.
- 1.3 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in D1, D2 is not mentioned in the description, nor is this document identified therein.



**Brigard & Castro**  
BOGOTA - COLOMBIA

**PODER**

**POWER OF ATTORNEY**

Yo (nosotros)

I (We)

**Genentech, Inc.**

**1 DNA Way**

domiciliado(s) en

**South San Francisco, California 94080-4990  
USA**

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

**South San Francisco, California  
USA**

hoy de de 200\_

Granted and signed in

this 6th day of December 2005

Firma

Signature

Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.

Nombre  
Cargo

Title Section Patent Counsel  
Authorized Corporate Signatory  
Genentech, Inc.



PR4653

GK/5  
JN

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND  
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 22, 2011

PTAS

GRANT KALINOWSKI  
1 DNA WAY  
MS-49  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

501729771

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 11/18/2011

REEL/FRAME: 027258/0112  
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4653

ASSIGNOR:  
SONODA, JUNICHIRO

DOC DATE: 10/31/2011

ASSIGNOR:  
WU, YAN

DOC DATE: 11/06/2011

ASSIGNEE:  
GENENTECH, INC.  
1 DNA WAY  
MS-49  
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA  
94080

APPLICATION NUMBER: 61486731

FILING DATE: 05/16/2011

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: FGFR1 AGONISTS AND METHODS OF USE

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH  
PUBLIC RECORDS DIVISION

# PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1

Stylesheet Version v1.1

| SUBMISSION TYPE:                                                                                                                                                                                                       | NEW ASSIGNMENT                        |               |                |                     |            |        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------|----------------|---------------------|------------|--------|------------|
| NATURE OF CONVEYANCE:                                                                                                                                                                                                  | ASSIGNMENT                            |               |                |                     |            |        |            |
| CONVEYING PARTY DATA                                                                                                                                                                                                   |                                       |               |                |                     |            |        |            |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Execution Date</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Junichiro Sonoda</td> <td>10/31/2011</td> </tr> <tr> <td>Yan Wu</td> <td>11/06/2011</td> </tr> </tbody> </table> |                                       | Name          | Execution Date | Junichiro Sonoda    | 10/31/2011 | Yan Wu | 11/06/2011 |
| Name                                                                                                                                                                                                                   | Execution Date                        |               |                |                     |            |        |            |
| Junichiro Sonoda                                                                                                                                                                                                       | 10/31/2011                            |               |                |                     |            |        |            |
| Yan Wu                                                                                                                                                                                                                 | 11/06/2011                            |               |                |                     |            |        |            |
| RECEIVING PARTY DATA                                                                                                                                                                                                   |                                       |               |                |                     |            |        |            |
| Name:                                                                                                                                                                                                                  | Genentech, Inc.                       |               |                |                     |            |        |            |
| Street Address:                                                                                                                                                                                                        | 1 DNA Way                             |               |                |                     |            |        |            |
| Internal Address:                                                                                                                                                                                                      | MS-49                                 |               |                |                     |            |        |            |
| City:                                                                                                                                                                                                                  | South San Francisco                   |               |                |                     |            |        |            |
| State/Country:                                                                                                                                                                                                         | CALIFORNIA                            |               |                |                     |            |        |            |
| Postal Code:                                                                                                                                                                                                           | 94080                                 |               |                |                     |            |        |            |
| PROPERTY NUMBERS Total: 1                                                                                                                                                                                              |                                       |               |                |                     |            |        |            |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Property Type</th> <th>Number</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Application Number:</td> <td>61486731</td> </tr> </tbody> </table>                                              |                                       | Property Type | Number         | Application Number: | 61486731   |        |            |
| Property Type                                                                                                                                                                                                          | Number                                |               |                |                     |            |        |            |
| Application Number:                                                                                                                                                                                                    | 61486731                              |               |                |                     |            |        |            |
| CORRESPONDENCE DATA                                                                                                                                                                                                    |                                       |               |                |                     |            |        |            |
| Fax Number:                                                                                                                                                                                                            | (650)952-9881                         |               |                |                     |            |        |            |
| Email:                                                                                                                                                                                                                 | pgolden@gene.com                      |               |                |                     |            |        |            |
| <i>Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.</i>                                                                                                  |                                       |               |                |                     |            |        |            |
| Correspondent Name:                                                                                                                                                                                                    | Grant Kalinowski                      |               |                |                     |            |        |            |
| Address Line 1:                                                                                                                                                                                                        | 1 DNA Way                             |               |                |                     |            |        |            |
| Address Line 2:                                                                                                                                                                                                        | MS-49                                 |               |                |                     |            |        |            |
| Address Line 4:                                                                                                                                                                                                        | South San Francisco, CALIFORNIA 94080 |               |                |                     |            |        |            |
| ATTORNEY DOCKET NUMBER:                                                                                                                                                                                                | PR4653                                |               |                |                     |            |        |            |
| NAME OF SUBMITTER:                                                                                                                                                                                                     | Grant Kalinowski                      |               |                |                     |            |        |            |
| Total Attachments: 4<br>source=PR4653_Assignment_1#page1.tif<br>source=PR4653_Assignment_1#page2.tif<br>source=PR4653_Assignment_1#page3.tif<br>source=PR4653_Assignment_1#page4.tif                                   |                                       |               |                |                     |            |        |            |

CH \$40.00 61486731

**ASSIGNMENT**

WHEREAS, Junichiro Sonoda, a citizen of Japan, residing at San Mateo, CA, and Yan Wu, a citizen of the US, residing at Foster City, CA (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

**FGFR1 AGONISTS AND METHODS OF USE**

for which a provisional application Serial No. 61,486,731 (Docket No. PR4653) has been filed by them on 16-MAY-2011; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

## South San Francisco

Date 10-31-2011

  
Name: Junichiro Sonoda

## South San Francisco

Date \_\_\_\_\_

Name: Yan Wu

## ASSIGNMENT

WHEREAS, Junichiro Sonoda, a citizen of Japan, residing at San Mateo, CA, and Yan Wu, a citizen of the US, residing at Foster City, CA (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

### FGFR1 AGONISTS AND METHODS OF USE

for which a provisional application Serial No. 61,486,731 (Docket No. PR4653) has been filed by them on 16-MAY-2011; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Name: Junichiro Sonoda

South San Francisco

\_\_\_\_\_  
Date

11/06/2011

\_\_\_\_\_  
Name: Yan Wu

**TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A  
GENENTECH, INC., firmado por los cedentes y el cesionario.**

---

**OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS**  
**Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes**  
**de los Estados Unidos**

Noviembre 22, 2011

PTAS

GRANT KALINOWSKI  
1 DNA Way  
MS-49  
South San Francisco, CA 94080

**Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos**  
**Notificación de Registro de Documento de Cesión**

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 11/18/2011

Rollo/Cuadro: 027258/0112  
Número de páginas: 5

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)  
Número de Expediente de Abogado: PR4653

Cedente:  
SONODA, JUNICHIRO

Fecha del documento: 10/31/2011

Cedente:  
WU, YAN

Fecha del documento: 11/06/2011

Cesionario:  
GENENTECH, INC.  
1 DNA Way  
Ms 49  
South San Francisco, CA 94080

Número de solicitud: 61486731  
Número de patente:

Fecha de presentación: 05/16/2011  
Fecha de expedición:

Título: AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO

Ocruser, Examinador  
SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES  
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS



**CESIÓN DE PATENTE**

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

|                         |              |
|-------------------------|--------------|
| TIPO DE PRESENTACIÓN:   | CESIÓN NUEVA |
| NATURALEZA DEL ACUERDO: | CESIÓN       |

**DATOS DE LA PARTE CEDENTE**

| Nombre           | Fecha de ejecución |
|------------------|--------------------|
| Junichiro Sonoda | 10/31/2011         |
| Yan Wu           | 11/06/2011         |

**DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE**

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| Nombre:            | Genentech, Inc.     |
| Dirección:         | 1 DNA Way           |
| Dirección interna: | MS 49               |
| Ciudad:            | South San Francisco |
| Estado/País:       | CALIFORNIA          |
| Código Postal:     | 94080               |

**NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1**

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Tipo de Propiedad    | Número   |
| Número de solicitud: | 61486731 |

**DATOS DE CORRESPONDENCIA**

Número de Fax: (650) 952 9881

Correo electrónico: pgolden@gene.com

*La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.*

Nombre del destinatario: Grant Kalinowski

Dirección Línea 1: 1 DNA Way

Dirección Línea 2: MS#49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO: | PR4653           |
| NOMBRE DEL REMITENTE:            | Grant Kalinowski |

Total anexos: 4

Fuente= PR4653\_Assignment\_1#page1.tif

Fuente= PR4653\_Assignment\_1#page2.tif

Fuente= PR4653\_Assignment\_1#page3.tif

Fuente= PR4653\_Assignment\_1#page4.tif

Expediente de Abogado No. PR4653

### CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Junichiro Sonoda**, un ciudadano de Japón, residente en San Mateo, CA y **Yan Wu**, un ciudadano de Estados Unidos, residente en Foster City, CA (en adelante referidos como "CEDENTES"); han inventado una invención nueva y útil en

### AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/486,731 (Expediente de abogado No. PR4653) el 16 de mayo de 2011; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: 10/31/2011

(firma)  
Nombre: JUNICHIRO SONODA

South San Francisco

Fecha:

Nombre: YAN WU

**CESIÓN**

CONSIDERANDO QUE, **Junichiro Sonoda**, un ciudadano de Japón, residente en San Mateo, CA y **Yan Wu**, un ciudadano de Estados Unidos, residente en Foster City, CA (en adelante referidos como "CEDENTES"); han inventado una invención nueva y útil en

**AGONISTAS DE FGFR1 Y SUS MÉTODOS DE USO**

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/486,731 (Expediente de abogado No. PR4653) el 16 de mayo de 2011; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Nombre: JUNICHIRO SONODA

South San Francisco

Fecha: 11/06/2011

\_\_\_\_\_  
(firma)  
Nombre: YAN WU

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

|                                                                                                                                      |                       |                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>RECIBO DE CAJA</b> | <b>No. 13 - 0077817</b>                   |
|                                                                                                                                      |                       | Bogotá D.C., Agosto 05 de 2013 - 16:48:39 |

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 599250551 | 05/08/2013 | 37.908.000.00 |

|                           |                         |                                                  |                          |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|
| *** Conceptos Pagados *** |                         |                                                  |                          |
| CANT.                     | RENTISTICO              | CONCEPTO                                         | Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO |
| 1                         | 50005-01-01 SOLICITUDES | 7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES | 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. 13-238976- -00000-0000**  
Fecha: 2013-10-08 16:06:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125

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

|                                                                                                                                      |                       |                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>RECIBO DE CAJA</b> | <b>No. 13 - 0090713</b>                       |
|                                                                                                                                      |                       | Bogotá D.C., Septiembre 10 de 2013 - 15:44:41 |

|                                     |                |
|-------------------------------------|----------------|
| RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. | NI 860.047.372 |
|-------------------------------------|----------------|

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 560909145 | 10/09/2013 | 40.080.000.00 |

|                           |             |                                                              |                             |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| *** Conceptos Pagados *** |             |                                                              |                             |
| CANT.                     | RENTISTICO  | CONCEPTO                                                     | Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO |
| 16 50005-01-01            | SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC | 30.000.00 480.000.00        |
|                           |             |                                                              | \$480.000.00                |

SON: \*\*CUATROCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable:   
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
**No. 13-238976- -00000-0000**  
Fecha: 2013-10-08 16:06:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125

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

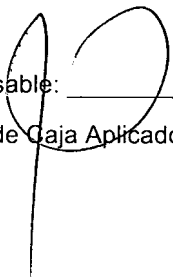
|                                                                                                                                      |                       |                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>RECIBO DE CAJA</b> | <b>No. 13 - 0086238</b>                   |
|                                                                                                                                      |                       | Bogotá D.C., Agosto 28 de 2013 - 16:55:19 |

|                                     |                |
|-------------------------------------|----------------|
| RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. | NI 860.047.372 |
|-------------------------------------|----------------|

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 599243536 | 28/08/2013 | 38.190.000.00 |

|                           |             |                                                                 |                            |
|---------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|
| *** Conceptos Pagados *** |             |                                                                 |                            |
| CANT.                     | RENTISTICO  | CONCEPTO                                                        | VR. UNDITARIO VR. CONCEPTO |
| 10 50005-01-01            | SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA<br>ADICIONAL A LAS 10 INIC | 30.000.00 300.000.00       |
|                           |             |                                                                 | \$300.000.00               |

SON: \*\*TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable:   
\_\*\*\*\*\*\_  
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 13-238976- -00000-0000**

Fecha: 2013-10-08 16:06:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

|                                                                       |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>                                              | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>                                              | Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>                                              | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>                                              | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>                                              | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> Incompleta <input type="checkbox"/> |                                                                                     |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                                                                  |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>                                                         | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input type="checkbox"/>                                                         | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input type="checkbox"/>                                                         | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input type="checkbox"/>                                                         | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> Incompleta <input type="checkbox"/> |                                                                                                                         |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                                                       |                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>                                              | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>                                              | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>                                              | Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>                                              | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> Incompleta <input type="checkbox"/> |                                                                                                           |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                                                       |                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>                                              | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>                                              | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>                                              | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>                                              | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> Incompleta <input type="checkbox"/> |                                                                                   |

PI02-F08 (2009-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-238976-00000-0000

Fecha: 2013-10-08 16:06:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125