



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020019756-4 A2



(22) Data do Depósito: 04/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 26/01/2021

(54) **Título:** MÉTODOS DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, IMUNOENSAIO, KITS PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, ANTICORPO ANTI-FGF21 ISOLADO, ANTICORPO ISOLADO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO E COMPOSIÇÃO

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/74; C07K 16/26; A61K 39/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 04/04/2018 US 62/652,701.

(71) **Depositante(es):** GENENTECH, INC..

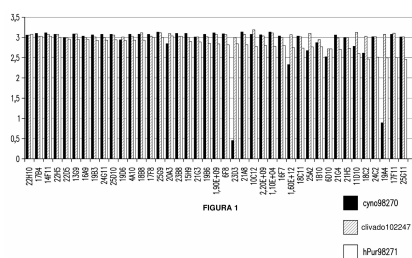
(72) **Inventor(es):** JOHN HOK NIN LOWE; JUNICHIRO SONODA.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019025726 de 04/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/195514 de 10/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 28/09/2020

(57) **Resumo:** MÉTODOS DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, IMUNOENSAIO, KITS PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, ANTICORPO ANTI-FGF21 ISOLADO, ANTICORPO ISOLADO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO E COMPOSIÇÃO". A matéria presentemente divulgada fornece anticorpos que se ligam a FGF21 e métodos de uso destes. Em particular, a presente divulgação fornece métodos de imunoenensaio para detectar e quantificar os níveis de FGF21 ativo e total em uma amostra e kits para executar tais métodos.



“MÉTODOS DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, IMUNOENSAIO, KITS PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, ANTICORPO ANTI-FGF21 ISOLADO, ANTICORPO ISOLADO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO E COMPOSIÇÃO”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos EUA de nº 62/652.701, depositado em 4 de abril de 2018, cuja divulgação é incorporada neste documento por referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida em formato ASCII via EFS-Web e é incorporada por meio deste por referência em sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 2 de abril de 2019, é chamada de 00B206_0809_SL.txt e tem 105.595 bytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se a anticorpos que se ligam a FGF21, bem como a métodos de imunoensaio e kits usando os mesmos.

ANTECEDENTES

[0004] O fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) é um membro endócrino da superfamília FGF e desempenha um papel na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios. O FGF21 requer isoformas do receptor FGF (FGFR) e o correceptor ligado à membrana Klotho-beta (KLB) para sinalização (Ogawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(18):7432-37 (2007); US 2010/0184665). FGF21 é uma proteína modificadora de doença potente que tem efeitos benéficos na homeostase da glicose e sensibilidade à

insulina e que demonstrou reverter a obesidade e diabetes tipo 2 em modelos de doença animal (Kharitonov et al., *J. Clin. Invest.* 115(6):1627-35 (2005)). A administração de FGF21 recombinante demonstrou reduzir os lipídios hepáticos, melhorar a sensibilidade à insulina e normalizar o controle glicêmico em camundongos com deficiência de sinalização de leptina (ob/ob ou db/db) ou camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD) (Dunshee et al., *J. Biol. Chem.* 291(11):5986-96 (2016); US 2015/0218276). A redução da glicose no sangue e melhorias em vários fatores de risco cardiovascular também foram observadas em macacos rhesus obesos e diabéticos tratados diariamente com FGF21 recombinante.

[0005] O FGF21 pode ser clivado proteoliticamente no terminal N e no terminal C, e tal clivagem mostrou afetar a atividade do FGF21. No terminal N, os primeiros quatro aminoácidos, que têm a sequência His-Pro-Ile-Pro (HPIP (SEQ ID NO: 76)) no FGF21 humano podem ser clivados por uma dipeptidil peptidase (Dunshee et al. (2016)). No terminal C, a proteína de ativação de fibroblasto de endopeptidase (FAP) cliva a maioria dos 10 aminoácidos terminais, que têm a sequência de aminoácidos Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser (SQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 77)) em FGF21 humano (Dunshee et al. (2016)). O FGF21 que não tem os quatro aminoácidos com terminais N está totalmente ativo; enquanto que o FGF21 que não possui os últimos dez aminoácidos terminais C não pode se ligar ao correceptor KLB e é inativo (Yie et al., *FEBS Letters* 583:19-24 (2009)).

[0006] Foi proposto que o FGF21 circulante seja um biomarcador para distúrbios metabólicos, tais como diabetes, pois níveis séricos aumentados de FGF21 foram observados em pacientes obesos, em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e em pacientes com diabetes tipo 2 (Zhang et al., *Diabetes* 57(5):1246-1253 (2008); Li et al., *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93(1):10-16 (2011)). Dado o papel significativo do

FGF21 no tratamento e desenvolvimento de distúrbios metabólicos, permanece uma necessidade na técnica de ensaios para determinar a quantidade de proteína FGF21 em um paciente.

DESCRIÇÃO RESUMIDA

[0007] A presente divulgação fornece anticorpos que se ligam ao fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) e o uso de tais anticorpos em métodos de imunoensaio para a detecção e quantificação da proteína FGF21, *por exemplo*, proteína FGF21 total e/ou ativa, em uma amostra.

[0008] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece imunoensaios para determinar a quantidade de proteína FGF21 total em uma amostra. Por exemplo, mas não como limitação, o método para determinar a quantidade de proteína FGF21 total em uma amostra pode incluir colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra, (b) colocar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra e (d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado. Em certas modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[0009] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece imunoensaios para determinar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra. Por exemplo, mas não a título de limitação, o método para determinar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra pode incluir (a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos

de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra, (b) colocar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21, (c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra e (d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

[00010] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece imunoensaios para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra. Por exemplo, mas não como limitação, o método pode incluir (i) colocar um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra, (ii) colocar o primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (iii) detectar o primeiro anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do primeiro anticorpo detector ligado. Em certas modalidades, o método pode incluir ainda (i) colocar um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra, (ii) colocar o segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21, (iii) detectar o segundo anticorpo detector ligado ao material de combinação de

anticorpo de captura-amostra e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do segundo anticorpo detector ligado. Em certas modalidades, o método pode incluir comparar a quantidade calculada de proteína FGF21 total com a quantidade calculada de proteína FGF21 ativa para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total na amostra. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura são o mesmo anticorpo. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a diferentes epítomos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[00011] Em certas modalidades, o método de imunoensaio é um ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA). Em certas modalidades, o método de imunoensaio detecta a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 2 pg/ml a cerca de 20 pg/ml.

[00012] Em certas modalidades, o método de imunoensaio é um ensaio de detecção de molécula única, *por exemplo*, que usa o Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™. Em certas modalidades, o método de imunoensaio detecta a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

[00013] A presente divulgação fornece ainda kits para realizar métodos de imunoensaio para a detecção e quantificação da proteína FGF21. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece kits para determinar a quantidade de proteína FGF21 total em uma amostra. Por exemplo, mas não como limitação, o kit para quantificar a quantidade de proteína FGF21 total inclui (a) um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (b) um anticorpo detector que liga-se a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21

e (c) um agente de detecção. Em certas modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a diferentes epítomos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[00014] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece kits para determinar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra. Por exemplo, mas não como limitação, o kit para quantificar a quantidade de proteína FGF21 ativa inclui (a) um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (b) um anticorpo detector que liga-se a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21 e (c) um agente de detecção.

[00015] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece kits para determinar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra. Por exemplo, mas não como limitação, o kit para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra pode incluir (a) um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (b) um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (c) um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, (d) um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21 e (e) um ou mais agentes de detecção. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura são o mesmo anticorpo. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a diferentes epítomos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[00016] Em certas modalidades, o agente de detecção para detectar o anticorpo detector, primeiro anticorpo detector e/ou segundo anticorpo detector pode ser selecionado a partir de um grupo que consiste em

um conjugado de estreptavidina- β -D-galactopiranosose, um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano e uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o conjugado de estreptavidina- β -D-galactopiranosose tem uma concentração de cerca de 100 pM a cerca de 400 pM.

[00017] Em certas modalidades, um kit da presente divulgação pode incluir ainda resorufina β -D-galactopiranosídeo, tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio ou combinações dos mesmos. Por exemplo, mas não como limitação, um kit da presente divulgação pode incluir um conjugado de estreptavidina- β -D-galactopiranosose como o agente de detecção e pode ainda incluir resorufina β -D-galactopiranosídeo. Em certas modalidades, um kit da presente divulgação pode incluir um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano como o agente de detecção e pode incluir ainda tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio.

[00018] Em certas modalidades, um kit divulgado neste documento detecta a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 2 pg/ml a cerca de 20 pg/ml. Em certas modalidades, um kit divulgado neste documento detecta a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra em uma sensibilidade no poço de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

[00019] Em certas modalidades, o anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura ou segundo anticorpo de captura é imobilizado em uma esfera paramagnética. Em certas modalidades, o anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e/ou segundo anticorpo de captura se liga a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M. Em certas modalidades, o anticorpo detector, primeiro anticorpo detector e segundo anticorpo detector é conjugado com biotina. Em certas modalidades, o anticorpo detector e/ou primeiro anticorpo detector se ligam a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M. Em certas modalidades, o anticorpo detector e/ou primeiro anticorpo

detector para uso na determinação da quantidade de proteína FGF21 total tem uma concentração de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1 µg/ml. Em certas modalidades, o anticorpo detector e/ou segundo anticorpo detector para uso na determinação da quantidade de proteína FGF21 ativa tem uma concentração de cerca de 1 µg/ml a cerca de 3 µg/ml.

[00020] Em certas modalidades, o anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e/ou segundo anticorpo de captura incluem ou se ligam competitivamente a um anticorpo que inclui: (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 26 e 27, *por exemplo*, 26, e suas substituições conservativas, (b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 30 e 31, *por exemplo*, 30, e suas substituições conservativas, (c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 34 e 35, *por exemplo*, 34, e suas substituições conservativas, (d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 38 e 39, *por exemplo*, 38, e suas substituições conservativas, (e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 42 e 43, *por exemplo*, 42, e suas substituições conservativas e (f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 46 e 47, *por exemplo*, 46, e suas substituições conservativas.

[00021] Em certas modalidades, o anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e/ou segundo anticorpo de captura incluem ou se ligam

competitivamente a um anticorpo que inclui: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54, 55, 74 e 75, *por exemplo*, 54, e suas substituições conservativas; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 50, 51, 70 e 71, *por exemplo*, 50, e suas substituições conservativas. Em certas modalidades, o anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e/ou segundo anticorpo de captura incluem ou se ligam competitivamente a um anticorpo que inclui: (a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22, 23, 66 e 67, *por exemplo*, 22, e suas substituições conservativas; e (b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 18, 19, 62 e 63, *por exemplo*, 18, e suas substituições conservativas.

[00022] Em certas modalidades, o anticorpo detector e/ou primeiro anticorpo detector incluem ou se ligam competitivamente a um anticorpo que inclui: (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, *por exemplo*, 29, e suas substituições conservativas, (b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, *por exemplo*, 33, e suas substituições conservativas, (c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, *por exemplo*, 37, e suas substituições conservativas, (d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, *por exemplo*, 41, e suas substituições conservativas, (e) um

domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, *por exemplo*, 45, e suas substituições conservativas e (f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, *por exemplo*, 49, e suas substituições conservativas.

[00023] Em certas modalidades, o anticorpo detector e/ou primeiro anticorpo detector incluem ou se ligam competitivamente a um anticorpo que inclui: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56, 57, 72 e 73, *por exemplo*, 57, e suas substituições conservativas; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52, 53, 68 e 69, *por exemplo*, 53, e suas substituições conservativas. Em certas modalidades, o anticorpo detector e/ou primeiro anticorpo detector incluem ou se ligam competitivamente a um anticorpo que inclui: (a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 24, 25, 64 e 65, *por exemplo*, 25, e suas substituições conservativas; e (b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 20, 21, 60 e 61, *por exemplo*, 21, e suas substituições conservativas.

[00024] Em certas modalidades, um anticorpo usado nos métodos de imunoensaio divulgados pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano. Em certas modalidades, um anticorpo usado nos métodos de imunoensaio divulgados pode ser um fragmento de anticorpo, *por exemplo*, um fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacorpo ou F(ab')₂.

[00025] Em certas modalidades, a amostra sendo analisada é

uma amostra de sangue obtida de um paciente. Em certas modalidades, a amostra é uma amostra de plasma obtida de um paciente.

[00026] A presente divulgação fornece ainda anticorpos anti-FGF21 isolados. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26-29, e suas substituições conservativas; (b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30-33, e suas substituições conservativas; (c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34-37, e suas substituições conservativas; (d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38-41, e suas substituições conservativas; (e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42-45, e suas substituições conservativas; e (f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46-49, e suas substituições conservativas.

[00027] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende: (a) uma sequência de domínio variável de cadeia pesada (VH) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54-57 e 72-75; e (b) uma sequência de domínio variável de cadeia leve (VL) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do

grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 50-53 e 68-71. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende: (a) uma sequência de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22-25 e 64-67; e (b) uma sequência de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 18-21 e 60-63.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00028] Figura 1. Descreve os resultados de uma triagem ELISA de 80 sobrenadantes de hibridoma que expressam anticorpos anti-FGF21.

[00029] Figura 2: Descreve a resposta à dose de detecção de FGF21 intacto versus clivado por ELISA sanduíche usando anticorpos de captura mAb4 ou mAb9 e o anticorpo detector mAb11.

[00030] Figura 3: Descreve a análise da ressonância plasmônica de superfície BIACORE® de anticorpos anti-FGF21 mAb4, mAb9, mAb11 e mAb15.

[00031] Figura 4: Descreve um diagrama esquemático que mostra a ligação do anticorpo anti-FGF21 ao FGF21 (FGF19 é usado como controle negativo).

[00032] Figura 5: Descreve um diagrama esquemático de uma modalidade não limitante de métodos ELISA colorimétricos para detectar FGF21 total e FGF21 ativo.

[00033] Figura 6: Descreve uma modalidade não limitante de um protocolo para a realização de ensaios ELISA de FGF21 total e ativo.

[00034] Figura 7: Descreve os resultados de ensaios ELISA usando anticorpos de captura mAb4 ou mAb11 e vários anticorpos de detecção.

[00035] Figura 8: Descreve uma comparação da sensibilidade de

detecção de FGF21 do tipo selvagem e humano clivado usando ensaios ELISA de FGF21 total e ativo exemplares.

[00036] Figura 9: Descreve a detecção de FGF21 humano usando um ensaio ELISA de FGF21 total exemplar.

[00037] Figura 10: Descreve um ensaio ELISA indicando que os anticorpos anti-FGF21 exemplares não apresentam reação cruzada com o FGF21 de camundongo.

[00038] Figura 11: Descreve uma comparação das sensibilidades dos anticorpos de captura mAb4 e mAb9 em ensaios exemplares de ELISA de FGF21 total e ativo.

[00039] Figura 12: Descreve o efeito do tampão de revestimento e da concentração na sensibilidade de um ensaio ELISA de FGF21 total exemplar usando mAb4 como anticorpo de captura e mAb15 como anticorpo detector.

[00040] Figura 13: Descreve o efeito do tampão de revestimento e da concentração na sensibilidade de um ensaio ELISA de FGF21 ativo exemplar usando mAb4 como o anticorpo de captura e o pAb terminal C de ovelha como o anticorpo detector.

[00041] Figura 14: Descreve o efeito do anticorpo detector conjugado com biotina e a concentração de HRP na sensibilidade de um ensaio ELISA de FGF21 total exemplar usando mAb4 como o anticorpo de captura e mAb15 como o anticorpo detector.

[00042] Figura 15: Descreve um diagrama esquemático de uma modalidade não limitante de métodos de detecção de molécula única para detectar FGF21 total e FGF21 ativo usando o Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™ ("Quanterix Simoa").

[00043] Figura 16: Descreve uma modalidade não limitante de um protocolo de ensaio de duas etapas para ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo

exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00044] Figura 17: Descreve a resposta à dose da detecção de FGF21 intacto versus clivado por ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00045] Figura 18: Descreve uma modalidade não limitante de um protocolo para realizar ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00046] Figura 19: Descreve as curvas padrão em ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00047] Figura 20: Descreve o desempenho da curva padrão em ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00048] Figura 21: Descreve uma comparação da sensibilidade da detecção de FGF21 total e ativo na presença de tampões BA010 e IL-12 em ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00049] Figura 22: Descreve o efeito de concentrações altas de esferas (HB) e concentrações baixas de esferas (LB) na sensibilidade de ensaios de FGF21 ativo e total exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00050] Figura 23: Descreve uma comparação da sensibilidade de detecção de FGF21 total e ativo usando três lotes de esferas paramagnéticas de captura em ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00051] Figura 24: Descreve uma comparação da sensibilidade da detecção de FGF21 total e ativo usando vários anticorpos de detecção em um ensaio de FGF21 total exemplar usando o Quanterix Simoa.

[00052] Figura 25: Descreve uma análise do efeito em gancho em um ensaio de FGF21 total exemplar usando mAb4 como o anticorpo de captura e mAb15 como o anticorpo detector usando o Quanterix Simoa.

[00053] Figura 26: Descreve a detecção de FGF21 total e FGF21

ativo em amostras de plasma e soro de um doador saudável usando ensaios ELISA de FGF21 ativo e total exemplares.

[00054] Figura 27: Descreve a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma ou amostras de plasma tratadas com MS-SAFE de doadores que são hipertensos e doadores que não estão sob medicação usando ensaios ELISA de FGF21 ativo e total exemplares.

[00055] Figura 28A: Descreve a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma de pacientes saudáveis e com diabetes tipo 2 usando ensaios de FGF21 total e ativo exemplares (Dia 1) usando o Quanterix Simoa.

[00056] Figura 28B: Descreve a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma de pacientes saudáveis e com diabetes tipo 2 usando ensaios de FGF21 total e ativo exemplares (Dia 2) usando o Quanterix Simoa.

[00057] Figura 29: Descreve a reprodutibilidade de ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usados para a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma de pacientes saudáveis e com diabetes tipo 2 usando o Quanterix Simoa.

[00058] Figura 30: Descreve a linearidade da diluição de ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usados para a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma de pacientes com diabetes tipo 2 usando o Quanterix Simoa.

[00059] Figura 31: Descreve a determinação do limite inferior da quantificação (LLOQ) em ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usados para a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma de pacientes com diabetes tipo 2 usando o Quanterix Simoa.

[00060] Figura 32: Descreve a especificidade de ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usados para a detecção de FGF21 total e

FGF21 ativo em amostras de plasma de pacientes com diabetes tipo 2 usando o Quanterix Simoa.

[00061] Figura 33: Descreve a detecção de FGF21 total e FGF21 ativo em amostras de plasma preparadas usando P800 ou K₂-EDTA usando ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00062] Figura 34: Descreve uma análise de FGF21 total e FGF21 ativo detectados em amostras de plasma de P800 e K₂-EDTA do estudo GC29819 em ensaios de FGF21 total e ativo exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00063] Figura 35: Descreve uma correlação entre a quantidade de FGF21 total e FGF21 ativo detectados em amostras de plasma de P800 e K₂-EDTA (estudo clínico GC29819) quantificadas usando um ensaio de FGF21 total exemplar usando o Quanterix Simoa.

[00064] Figura 36: Descreve uma correlação entre a quantidade de FGF21 total e FGF21 ativo detectados em amostras de plasma de P800 e K₂-EDTA (estudo GC29819) quantificadas usando um ensaio de FGF21 ativo exemplar usando o Quanterix Simoa.

[00065] Figura 37: Descreve uma avaliação da estabilidade das amostras de plasma de P800 do estudo GC29819 usando ensaios de FGF21 ativo e total exemplares usando o Quanterix Simoa.

[00066] Figura 38: Descreve o efeito do diluente de ensaio contendo 10 µg/ml de IgG de camundongo ou ovelha nos ensaios totais e ativos usando o Quanterix Simoa.

[00067] Figura 39: Descreve o efeito do diluente de ensaio contendo 10 µg/ml de IgG de camundongo e ovelha nos ensaios totais e ativos usando o Quanterix Simoa.

[00068] Figura 40: Descreve o efeito do diluente de ensaio contendo 10 µg/ml de IgG de camundongo ou ovelha nas curvas padrão nos

ensaios totais e ativos usando o Quanterix Simoa.

[00069] Figura 41A: Descreve as sequências das regiões variáveis de cadeia leve de anticorpos anti-FGF21 exemplares. As sequências da região variável de cadeia leve são divulgadas como SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 71, 70, 69 e 68, respectivamente, em ordem de aparecimento. As sequências de CDR-L1 são divulgadas como SEQ ID NOs: 38, 39, 40, 41, 38, 39, 40 e 41, respectivamente, em ordem de aparecimento; as sequências de CDR-L2 são divulgadas como SEQ ID NOs: 42, 43, 44, 45, 42, 43, 44 e 45, respectivamente, em ordem de aparecimento; e as sequências de CDR-L3 são divulgadas como SEQ ID NOs: 46, 47, 48, 49, 46, 47, 48 e 49, respectivamente, em ordem de aparecimento.

[00070] Figura 41B: Descreve as sequências das regiões variáveis de cadeia pesada de anticorpos anti-FGF21 exemplares. As sequências da região variável de cadeia pesada são divulgadas como SEQ ID NOs: 54, 55, 56, 57, 75, 74, 73 e 72, respectivamente, em ordem de aparecimento. As sequências de CDR-H1 são divulgadas como SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 26, 27, 28 e 29, respectivamente, em ordem de aparecimento; as sequências de CDR-H2 são divulgadas como SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 30, 31, 32 e 33, respectivamente, em ordem de aparecimento; e as sequências de CDR-H3 são divulgadas como SEQ ID NOs: 34, 35, 36, 37, 34, 35, 36 e 37, respectivamente, em ordem de aparecimento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00071] Para maior clareza, mas não como forma de limitação, a descrição detalhada da matéria presentemente divulgada é dividida nas seguintes subseções:

- I. Definições;
- II. Imunoensaios;
- III. Anticorpos;

IV. Kits; e

V. Modalidades Exemplares.

I. DEFINIÇÕES

[00072] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por aqueles técnicos no assunto a que esta invenção pertence. As seguintes referências fornecem aos técnicos uma definição geral de muitos dos termos usados nesta invenção: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed., 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª ed., R. Rieger et al., (eds.), Springer Verlag (1991); e Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Conforme usados neste documento, os termos a seguir têm os significados atribuídos a eles abaixo, a menos que especificado de outra forma.

[00073] O termo "cerca de" ou "aproximadamente", conforme usado neste documento, pode significar dentro de uma faixa de erro aceitável para o valor particular, conforme determinado por alguém técnico no assunto, que dependerá em parte de como o valor é medido ou determinado, *por exemplo*, as limitações do sistema de medição. Por exemplo, "cerca de" pode significar dentro de 1 ou mais de 1 desvio padrão, de acordo com a prática no valor fornecido. Onde valores particulares são descritos no pedido e nas reivindicações, a menos que indicado de outra forma, o termo "cerca de" pode significar uma faixa de erro aceitável para o valor particular, tal como $\pm 10\%$ do valor modificado pelo termo "cerca de".

[00074] Os termos "polipeptídeo" e "proteína", conforme usados indistintamente neste documento, referem-se a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados e pode ser interrompido por não

aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero de aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, ou qualquer outra manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de marcação. Estão também incluídos na definição, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Os termos "polipeptídeo" e "proteína", conforme usados neste documento, especificamente abrangem anticorpos.

[00075] O termo "fator de crescimento de fibroblastos 21" ou "FGF21", conforme usado neste documento, refere-se a qualquer FGF21 nativo de qualquer fonte de vertebrados, incluindo mamíferos, tais como primatas (*por exemplo*, humanos) e roedores (*por exemplo*, camundongos e ratos), a menos que indicado de outra forma. O termo abrange FGF21 não processado de "comprimento total", bem como qualquer forma de FGF21 que resulte do processamento na célula. O termo também abrange variantes de ocorrência natural de FGF21, *por exemplo*, variantes de splice ou variantes alélicas, a menos que indicado de outra forma. Um exemplo não limitante de um aminoácido FGF21 humano de comprimento total é mostrado abaixo:

HIIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESELLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPP
GILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 1).

[00076] O termo "FGF21 total", conforme usado neste documento, inclui formas não processadas de FGF21, bem como todas as formas de FGF21 que resultam do processamento celular, *por exemplo*, FGF21 clivado no terminal N e FGF21 clivado no terminal C. Um exemplo não limitante de um aminoácido FGF21 humano que não possui os dez aminoácidos com terminais

C é:

[00077] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRED GTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPE ACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLP PALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGP (SEQ ID NO: 58). Um exemplo não limitante de um aminoácido FGF21 humano que não possui os 4 aminoácidos com terminais N é:

DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQ SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILA PQQPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 59). Por exemplo, mas não como limitação, o termo "FGF21 total" inclui proteínas FGF21 que têm a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 58 ou SEQ ID NO: 59.

[00078] O termo "FGF21 ativo", conforme usado neste documento, refere-se a uma proteína FGF21 que retém seu fragmento terminal C. Em certas modalidades, o termo inclui formas processadas de FGF21, tais como aquelas em que o fragmento terminal N de FGF21, *por exemplo*, resíduos de aminoácidos 1-4 da SEQ ID NO: 1, foi clivado. Por exemplo, mas não como limitação, o termo "FGF21 ativo" inclui proteínas FGF21 que têm a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 1 ou a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 59.

[00079] O termo "anticorpo" deste documento é usado no sentido mais amplo e abrange várias estruturas de anticorpos, incluindo, mas não se limitando a, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (*por exemplo*, anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a atividade de ligação ao antígeno desejada.

[00080] Um "fragmento de anticorpo" refere-se a uma molécula

diferente de um anticorpo intacto que compreende uma porção de um anticorpo intacto que se liga ao antígeno ao qual o anticorpo intacto se liga. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não se limitam a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diácorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de cadeia única (*por exemplo*, scFv); e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

[00081] Um anticorpo "que se liga" a um antígeno de interesse, *por exemplo*, uma proteína FGF21, é aquele que se liga ao antígeno com afinidade suficiente para que o anticorpo seja útil como um reagente de ensaio, *por exemplo*, como um anticorpo de captura ou como um anticorpo de detecção. Normalmente, tal anticorpo não apresenta reação cruzada significativa com outros polipeptídeos. No que diz respeito à ligação de um polipeptídeo a uma molécula alvo, o termo "ligação específica" ou "especificamente se liga a" ou é "específico para" um polipeptídeo específico ou um epítipo em um alvo de polipeptídeo específico significa uma ligação que é diferente de maneira mensurável de uma interação não específica. A ligação específica pode ser medida, *por exemplo*, determinando a ligação de uma molécula alvo em comparação com a ligação de uma molécula de controle, que geralmente é uma molécula de estrutura semelhante que não tem atividade de ligação.

[00082] O termo "anticorpo anti-FGF21" refere-se a um anticorpo que é capaz de se ligar a FGF21 com afinidade suficiente de tal modo que o anticorpo seja útil como um agente no direcionamento de FGF21, *por exemplo*, como um agente nos ensaios descritos no presente documento. Em uma modalidade, a extensão da ligação de um anticorpo anti-FGF21 a uma proteína não-FGF21 não relacionada é menos que cerca de 10% da ligação do anticorpo a FGF21, conforme medido, *por exemplo*, por um radioensaio (RIA). Em certas modalidades, um anticorpo que se liga a FGF21 tem uma

constante de dissociação (K_d) de $\leq 1\text{ M}$, $\leq 100\text{ mM}$, $\leq 10\text{ mM}$, $\leq 1\text{ mM}$, $\leq 100\text{ }\mu\text{M}$, $\leq 10\text{ }\mu\text{M}$, $\leq 1\text{ }\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$ ou $\leq 0,001\text{ nM}$. Em certas modalidades, a K_d de um anticorpo que se liga a FGF21, divulgado neste documento, pode ser de 10^{-3} M ou menos, ou 10^{-8} M ou menos, *por exemplo*, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , *por exemplo*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M . Em certas modalidades, a K_d de um anticorpo que se liga a FGF21, divulgado aqui, pode ser de 10^{-10} M a 10^{-13} M . Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 se liga a um epítipo de FGF21 que é conservado entre FGF21 de diferentes espécies.

[00083] Uma “estrutura aceitadora humana” para os fins descritos neste documento, é uma estrutura que compreende a sequência de aminoácidos de uma estrutura do domínio variável de cadeia leve (VL) ou uma estrutura do domínio variável de cadeia pesada (VH) derivada de uma estrutura de imunoglobulina humana ou de uma estrutura de consenso humana, conforme definido abaixo. Uma estrutura humana aceitadora “derivada de” uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humana pode compreender a mesma sua sequência de aminoácidos, ou pode conter alterações na sequência de aminoácidos. Em algumas modalidades, o número de alterações de aminoácidos é de 10 ou menos, 9 ou menos, 8 ou menos, 7 ou menos, 6 ou menos, 5 ou menos, 4 ou menos, 3 ou menos ou 2 ou menos. Em algumas modalidades, a estrutura humana aceitadora de VL é idêntica na sequência à sequência estrutural de imunoglobulina humana de VL ou sequência estrutural de consenso humana.

[00084] “Afinidade” refere-se à força da soma total de interações não covalentes entre um único local de ligação de uma molécula (*por exemplo*, um anticorpo) e seu parceiro de ligação (*por exemplo*, um antígeno). A menos que indicado de outro modo, como usado neste documento, “afinidade de ligação” refere-se à afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação

1:1 entre membros de um par de ligação (*por exemplo*, anticorpo e antígeno). A afinidade de uma molécula X para seu parceiro Y pode geralmente ser representada pela constante de dissociação (K_d). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos neste documento. Modalidades ilustrativas e exemplos específicos para medir a afinidade de ligação encontram-se descritos a seguir.

[00085] Um anticorpo de "afinidade maturada" refere-se a um anticorpo com uma ou mais alterações em uma ou mais regiões hipervariáveis (CDRs), em comparação com um anticorpo parental que não possui tais alterações, tais alterações resultando em uma melhoria na afinidade do anticorpo para antígeno.

[00086] Um "anticorpo que compete pela ligação" com um anticorpo de referência refere-se a um anticorpo que bloqueia a ligação do anticorpo de referência ao seu antígeno em um ensaio de competição em 50% ou mais e, inversamente, o anticorpo de referência bloqueia a ligação do anticorpo ao seu antígeno em um ensaio de competição em 50% ou mais. Um ensaio de competição exemplar é descrito em "Antibodies", Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

[00087] Um "anticorpo de captura", tal como usado no presente documento, refere-se a um anticorpo que especificamente se liga a uma molécula alvo, *por exemplo*, uma forma de FGF21, em uma amostra. Sob certas condições, o anticorpo de captura forma um complexo com a molécula alvo, de tal modo que o complexo anticorpo-molécula alvo pode ser separado do resto da amostra. Em certas modalidades, tal separação pode incluir a lavagem de substâncias ou material na amostra que não se ligaram ao anticorpo de captura. Em certas modalidades, um anticorpo de captura pode ser anexado a uma superfície de suporte sólido, tal como, *por exemplo*, mas não se limitando a, uma placa ou uma esfera, *por exemplo*, uma esfera

paramagnética.

[00088] Um "anticorpo de detecção", tal como usado no presente documento, refere-se a um anticorpo que especificamente se liga a uma molécula alvo em uma amostra ou em um material de combinação de anticorpo de captura-amostra. Sob certas condições, o anticorpo de detecção forma um complexo com a molécula alvo ou com um complexo de anticorpo de captura-molécula alvo. Um anticorpo de detecção é capaz de ser detectado tanto diretamente por meio de um marcador, que pode ser amplificado, quanto indiretamente, por exemplo, *por* meio do uso de outro anticorpo que é marcado e que se liga ao anticorpo de detecção. Para marcação direta, o anticorpo de detecção é normalmente conjugado a uma fração que é detectável por alguns meios, por exemplo, incluindo, mas não se limitando a, biotina ou rutênio.

[00089] O termo anticorpo "quimérico" refere-se a um anticorpo em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é derivada de uma fonte ou espécie em particular, enquanto o restante da cadeia pesada e/ou leve é derivada a partir de uma fonte ou espécie diferente.

[00090] A "classe" de um anticorpo refere-se ao tipo de domínio constante ou região constante possuída pela sua cadeia pesada. Existem cinco classes principais de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e vários destes podem ser ainda divididos em subclasses (isotipos), *por exemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente.

[00091] O termo "agente citotóxico", tal como usado no presente documento, refere-se a uma substância que inibe ou previne uma função celular e/ou provoca a morte ou destruição celular. Os agentes citotóxicos incluem, mas não estão limitados a, isótopos radioativos (*por exemplo*, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioativos de Lu);

agentes quimioterápicos ou fármacos (*por exemplo*, metotrexato, adriamicina, alcalóides de vinca (vincristina, vinblastina, etoposídeo), doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucila, daunorrubicina ou outros agentes intercalantes); agentes inibidores de crescimento; enzimas e seus fragmentos, tais como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo seus fragmentos e/ou variantes; e os vários agentes antitumorais ou anticancerígenos divulgados abaixo.

[00092] “Funções efetoras” referem-se às atividades biológicas atribuíveis à região Fc de um anticorpo, que variam com o isotipo do anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem: Ligação a C1q e citotoxicidade dependente de complemento (CDC); ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa de receptores da superfície celular (*por exemplo*, receptor de células B); e ativação de células B.

[00093] O termo “região Fc” é usado no presente documento para definir uma região terminal C de uma cadeia pesada de imunoglobulina que contém pelo menos uma porção da região constante. O termo inclui regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Em uma modalidade, uma região Fc de cadeia pesada de IgG humana se estende a partir de Cys226, ou de Pro230, até o terminal carboxila da cadeia pesada. No entanto, a lisina terminal C (Lys447) da região Fc pode ou não estar presente. A menos que especificado de outra forma neste documento, a numeração de resíduos de aminoácidos na região Fc ou região constante está de acordo com o sistema de numeração da UE, também chamado de índice da UE, como descrito em Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

[00094] “Estrutura” (“Framework”) ou “FR” refere-se a resíduos do

domínio variável diferentes dos resíduos da região hipervariável (CDR). A FR de um domínio variável consiste geralmente em quatro domínios FR: FR1, FR2, FR3 e FR4. Por conseguinte, as sequências de CDR e FR geralmente aparecem na seguinte sequência em VH (ou VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[00095] Os termos "anticorpo de comprimento total", "anticorpo intacto" e "anticorpo inteiro" são usados no presente documento indistintamente para referirem-se a um anticorpo tendo uma estrutura substancialmente semelhante a uma estrutura de anticorpo nativo ou tendo cadeias pesadas que contêm uma região Fc, conforme definido neste documento.

[00096] Um "anticorpo humano" é aquele que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde àquela de um anticorpo produzido por uma célula humana ou humano ou derivada de uma fonte não humana que usa repertórios de anticorpos humanos ou outras sequências de codificação de anticorpos humanos. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação ao antígeno não humanos.

[00097] Uma "estrutura de consenso humano" é uma estrutura que representa os resíduos de aminoácidos de ocorrência mais comum em uma seleção de sequências estruturais de VL ou VH de imunoglobulina humana. Geralmente, a seleção de sequências de VL ou VH de imunoglobulina humana é a partir de um subgrupo de sequências de domínio variável. Geralmente, o subgrupo de sequências é um subgrupo conforme em Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, NIH Publication 91-3242, Bethesda, MD, (1991), volumes 1-3. Em uma modalidade, para a VL, o subgrupo é o subgrupo kappa I, conforme em Kabat et al., *supra*. Em uma modalidade, para a VH, o subgrupo é o subgrupo kappa III, conforme em Kabat et al., *supra*.

[00098] Anticorpo “humanizado” refere-se a um anticorpo quimérico compreendendo os resíduos de aminoácidos a partir de HVRs não humanas e resíduos de aminoácidos a partir de FRs humanas. Em certas modalidades, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e normalmente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as CDRs (*por exemplo*, CDRs) correspondem às de um anticorpo não humano, e todas ou substancialmente todas as FRs correspondem às de um anticorpo humano. Um anticorpo humanizado pode compreender opcionalmente pelo menos uma porção de uma região constante de anticorpo derivada de um anticorpo humano. Uma “forma humanizada” de um anticorpo, *por exemplo*, um anticorpo não humano, refere-se a um anticorpo que foi submetido à humanização.

[00099] O termo “região hipervariável” ou “CDR”, tal como usado no presente documento, refere-se a cada uma das regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis em sequência (também referidas neste documento como “regiões determinantes de complementaridade” ou “CDRs”) e/ou que formam alças estruturalmente definidas (“alças hipervariáveis”) e/ou que contém os resíduos entram em contato com o antígeno (“contatos ao antígeno”). A menos que indicado de outra forma, os resíduos de CDR e outros resíduos no domínio variável (*por exemplo*, resíduos de FR) são numerados no presente documento de acordo com Kabat et al., *supra*. Geralmente, os anticorpos compreendem seis HVRs: três na VH (H1, H2, H3) e três na VL (L1, L2, L3). CDRs exemplares deste documento incluem:

(a) alças hipervariáveis que ocorrem nos resíduos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDRs que ocorrem nos resíduos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) (Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contatos ao antígeno que ocorrem nos resíduos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) e 93-101 (H3) (MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); e

(d) combinações de (a), (b), e/ou (c), incluindo resíduos de HVR de aminoácidos 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), e 94-102 (H3).

[000100] Um "imunoconjugado" refere-se a um anticorpo conjugado a uma ou mais molécula(s) heteróloga(s), incluindo, mas não se limitando a um agente citotóxico.

[000101] Um anticorpo "isolado" é um que foi separado de um componente do seu ambiente natural. Em certas modalidades, um anticorpo é purificado para mais de 95% ou 99% de pureza, conforme determinado por, por exemplo, eletroforese (*por exemplo*, SDS-PAGE, focalização isoeletrica (IEF), eletroforese capilar) ou cromatográfica (*por exemplo*, troca iônica ou HPLC de fase reversa). Para revisão dos métodos para avaliação da pureza do anticorpo, vide, *por exemplo*, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

[000102] Um ácido nucleico "isolado" refere-se a uma molécula de ácido nucleico que foi separada de um componente do seu ambiente natural. Um ácido nucleico isolado inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que normalmente contêm a molécula de ácido nucleico, mas a molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromossômica ou em uma localização cromossômica diferente da sua localização cromossômica natural.

[000103] "Ácido nucleico isolado que codifica um anticorpo" (incluindo referências a um anticorpo específico, *por exemplo*, um anticorpo

anti-FGF21) refere-se a uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam cadeias pesadas e leves de anticorpo (ou seus fragmentos), incluindo tal(is) molécula(s) de ácido nucleico em um único vetor ou vetores separados, e tais moléculas de ácido nucleico presentes em um ou mais locais em uma célula hospedeira.

[000104] O termo “anticorpo monoclonal”, como usado no presente documento, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, *ou seja*, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou se ligam ao mesmo epítopo, exceto para possíveis anticorpos variantes, *por exemplo*, contendo mutações de ocorrência natural ou surgindo durante a produção de uma preparação de um anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em quantidades menores. Em contraste com preparações de anticorpos policlonais, que normalmente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante em um antígeno. Assim, o modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser preparados por uma variedade de técnicas, incluindo, mas não se limitando a, métodos de hibridomas, métodos de DNA recombinante, métodos de apresentação em fagos e métodos que usam animais transgênicos que contenham todos ou parte dos loci de imunoglobulina humana, tais métodos e outros métodos exemplares para a preparação de anticorpos monoclonais sendo descritos neste documento.

[000105] Um “anticorpo nu” refere-se a um anticorpo que não

é conjugado com uma fração heteróloga (*por exemplo*, uma fração citotóxica) ou marcador radioativo. O anticorpo nu pode estar presente em uma formulação farmacêutica.

[000106] “Anticorpos nativos” referem-se às moléculas de imunoglobulina de ocorrência natural com estruturas variáveis. Por exemplo, anticorpos de IgG nativos são glicoproteínas heterotetraméricas com cerca de 150.000 daltons, compostas por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas que estão ligadas por dissulfeto. A partir do terminal N para C, cada cadeia pesada tem uma região variável (VH), também chamada de domínio pesado variável ou um domínio variável de cadeia pesada, seguida por três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). Da mesma forma, a partir do terminal N para C, cada cadeia leve tem uma região variável (VL), também chamada de domínio leve variável ou um domínio variável da cadeia leve, seguida por um domínio leve constante (CL). A cadeia leve de um anticorpo pode ser atribuída a um de dois tipos, denominados capa (κ) e lambda (λ), com base na sequência de aminoácidos do seu domínio constante.

[000107] Um polipeptídeo “purificado” (*por exemplo*, anticorpo), tal como usado neste documento, refere-se a um polipeptídeo que foi aumentado em pureza, de tal modo que ele existe em uma forma que é mais pura do que ele existe em seu ambiente natural e/ou quando inicialmente sintetizado e/ou amplificado em condições de laboratório. Pureza é um termo relativo e não significa necessariamente pureza absoluta.

[000108] O termo “bula”, conforme usado neste documento, refere-se a instruções normalmente incluídas em embalagens comerciais que contêm informações sobre o uso dos componentes da embalagem.

[000109] A “porcentagem (%) da identidade de sequência de aminoácidos” com relação à uma sequência de polipeptídeos de referência é definida como a porcentagem dos resíduos de aminoácidos em uma sequência

candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de polipeptídeos de referência, após o alinhamento das sequências e introdução de espaçamentos, se necessário, para atingir a identidade de sequência da porcentagem máxima, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da identidade percentual da sequência de aminoácidos pode ser alcançado de várias maneiras que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, usando software de computador disponível publicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os técnicos no assunto podem determinar parâmetros apropriados para o alinhamento de sequências, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir o alinhamento máximo ao longo do comprimento total das sequências sendo comparadas. Para os propósitos descritos no presente documento, no entanto, os valores da porcentagem da identidade de sequência de aminoácidos são gerados usando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2. O programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2 foi criado pela Genentech, Inc., e o código-fonte foi depositado com documentação do usuário no Copyright Office dos EUA, Washington DC, 20559, em que está registrado sob o registro de direitos autorais dos EUA de nº TXU510087. O programa ALIGN-2 está disponível publicamente na Genentech, Inc., sul de São Francisco, Califórnia, ou pode ser compilado a partir do código-fonte. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para uso em um sistema operacional UNIX, incluindo o digital UNIX V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequência são ajustados pelo programa ALIGN-2 e não variam.

[000110] Em situações em que ALIGN-2 é empregado para comparações de sequência de aminoácidos, a % da identidade de sequência de aminoácidos de uma determinada sequência de aminoácidos A para, com

ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente expressa como uma determinada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma certa % da identidade de sequência de aminoácidos com, com ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B) é calculada como segue:

100 vezes a fração X/Y

- em que X é o número de resíduos de aminoácidos pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequência ALIGN-2 no alinhamento desse programa de A e B, e em que Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Será apreciado que em que o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % da identidade de sequência de aminoácidos de A a B não será igual à % da identidade de sequência de aminoácidos de B a A. A menos que especificamente indicado de outra forma, todos os valores de % de identidade de sequência de aminoácidos usados neste documento são obtidos conforme descrito no parágrafo imediatamente anterior usando o programa de computador ALIGN-2.

[000111] O termo “região variável” ou “domínio variável” refere-se ao domínio de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo que está envolvido na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve (VL e VH, respectivamente) de um anticorpo nativo geralmente têm estruturas semelhantes, com cada domínio compreendendo quatro regiões estruturais conservadas (FR) e três regiões hipervariáveis (CDRs). (Vide, *por exemplo*, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman e Co., página 91 (2007)). Um único domínio VH ou VL pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação ao antígeno. Além disso, os anticorpos que se ligam a um antígeno particular podem ser isolados usando um domínio VH ou VL de um anticorpo que se liga ao antígeno para rastrear

uma biblioteca de domínios VL ou VH complementares, respectivamente. Vide, *por exemplo*, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[000112] Os termos "célula hospedeira", "linhagem celular hospedeira" e "cultura de células hospedeiras", conforme usados indistintamente neste documento, referem-se a células nas quais o ácido nucleico exógeno foi introduzido, incluindo a progênie de tais células. As células hospedeiras incluem "transformantes" e "células transformadas", que incluem a célula primária transformada e a descendência resultante desta, independentemente do número de passagens. A progênie pode não ser completamente idêntica no conteúdo de ácido nucleico a uma célula-mãe, mas pode conter mutações. A progênie mutante que tem a mesma função ou atividade biológica como rastreada ou selecionada na célula originalmente transformada é incluída no presente documento.

[000113] O termo "vetor", como usado no presente documento, refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de propagar um outro ácido nucleico ao qual está ligada. O termo inclui o vetor como uma estrutura de ácido nucleico de autorreplicação, bem como o vetor incorporado no genoma de uma célula hospedeira na qual foi introduzido. Certos vetores são capazes de direcionar a expressão de ácidos nucleicos aos quais eles estão operativamente ligados. Tais vetores são aqui referidos como "vetores de expressão".

[000114] Os termos "marcador" ou "marcador detectável", conforme usados neste documento, referem-se a qualquer fração ou grupo químico que pode ser ligado a uma substância que deve ser detectada ou quantificada, *por exemplo*, um anticorpo. Um marcador é um marcador detectável que é adequado para a detecção sensível ou quantificação de uma substância. Exemplos não limitantes de marcadores detectáveis incluem, mas

não estão limitados a, marcadores luminescentes, *por exemplo*, marcadores fluorescentes, fosforescentes, quimioluminescentes, bioluminescentes e eletroquimioluminescentes, marcadores radioativos, enzimas, partículas, substâncias magnéticas, espécies eletroativas e similares. Alternativamente, um marcador detectável pode sinalizar sua presença participando em reações de ligação específicas. Exemplos não limitantes de tais marcadores incluem haptenos, anticorpos, biotina, estreptavidina, his-tag, ácido nitrilotriacético, glutathione S-transferase, glutathione e similares.

[000115] O termo "meio de detecção", conforme usado neste documento, refere-se a uma fração ou técnica usada para detectar a presença do anticorpo detectável por meio de relatório de sinal que é então lido em um ensaio. Normalmente, um meio de detecção emprega reagentes, *por exemplo*, um agente de detecção, que amplifica um marcador imobilizado, tal como o marcador capturado em uma placa de microtitulação, *por exemplo*, avidina, estreptavidina-HRP ou estreptavidina- β -D-galactopiranosose.

[000116] O termo "detecção" é usado neste documento para incluir medições qualitativas e quantitativas de uma molécula alvo, *por exemplo*, FGF21 ou suas formas processadas. Em certas modalidades, a detecção inclui identificar a mera presença da molécula alvo em uma amostra, bem como determinar se a molécula alvo está presente na amostra em níveis detectáveis.

[000117] Um "paciente" ou "indivíduo", conforme usado indistintamente neste documento, é um mamífero. Os mamíferos incluem, mas não estão limitados a, animais domésticos (*por exemplo*, vacas, ovelhas, gatos, cães e cavalos), primatas (*por exemplo*, primatas humanos e não humanos, tais como macacos), coelhos e roedores (*por exemplo*, camundongos e ratos). Em certas modalidades, o paciente ou indivíduo é um humano.

[000118] Uma "amostra", conforme usado neste documento,

refere-se a uma pequena porção de uma quantidade maior de material. Em certas modalidades, uma amostra inclui, mas não está limitada a, células em cultura, sobrenadantes celulares, lisados celulares, soro, plasma sanguíneo, fluido biológico (*por exemplo*, sangue, plasma, soro, fezes, urina, fluido linfático, ascite, lavagem ductal, saliva e fluido cefalorraquidiano) e amostras de tecido. A fonte da amostra pode ser tecido sólido (*por exemplo*, de um órgão fresco, congelado e/ou preservado, amostra de tecido, biópsia ou aspirado), sangue ou quaisquer constituintes do sangue, fluidos corporais (tais como, *por exemplo*, urina, linfa, fluido cefalorraquidiano, fluido amniótico, fluido peritoneal ou fluido intersticial) ou células do paciente, incluindo células circulantes.

II. IMUNOENSAIOS

[000119] A matéria presentemente divulgada fornece métodos para a detecção e quantificação da proteína FGF21. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece imunoensaios para determinar a quantidade de proteína FGF21 total e/ou FGF21 ativa em uma amostra. A presente divulgação fornece ainda métodos de imunoensaio para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra. Em certas modalidades, os métodos de imunoensaio da presente divulgação usam os anticorpos anti-FGF21 divulgados no presente documento. Exemplos não limitantes de anticorpos anti-FGF21 para uso nos métodos presentemente divulgados são fornecidos nas Tabelas 8-13 e 16-19.

[000120] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece métodos de imunoensaio para a detecção e quantificação da proteína FGF21 humana. Por exemplo, os métodos de imunoensaio podem ser usados para a detecção e quantificação de FGF21, *por exemplo*, proteína FGF21 humana total e/ou FGF21 ativa, em uma amostra. Os métodos de imunoensaio da presente divulgação podem incorporar estratégias conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, ensaio em sanduíche, ensaio de

imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), uma forma digital de ELISA, ensaio de ensaio eletroquímico (ECL) e imunoensaio magnético. Em certas modalidades, o método de imunoensaio é um imunoensaio de molécula única, *por exemplo*, usando uma matriz de molécula única. Por exemplo, mas não como forma de limitação, o método de imunoensaio pode ser realizado usando um instrumento Quanterix, *por exemplo*, um Simoa HD-1 Analyzer™.

[000121] Em certas modalidades, os métodos da presente divulgação compreendem colocar uma amostra obtida de um paciente em contato com um anticorpo anti-FGF21 de captura, tal como aqueles descritos neste documento, sob condições permissivas para a ligação do anticorpo anti-FGF21 de captura à proteína FGF21 na amostra. Por exemplo, mas não como limitação, a amostra pode ser incubada com um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente em FGF21 para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra. As condições para a incubação da amostra e do anticorpo de captura podem ser selecionadas para maximizar a sensibilidade do ensaio e/ou para minimizar a dissociação, bem como para garantir que a proteína FGF21 presente na amostra se liga ao anticorpo de captura.

[000122] Em certas modalidades, os anticorpos de captura usados nos métodos de imunoensaio divulgados aqui podem ser usados em uma concentração de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml. Por exemplo, mas não como limitação, os anticorpos de captura podem ser usados em uma concentração de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 0,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 2,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 2,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 3,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 3,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 4,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 4,5 µg/ml, de cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de

cerca de 1,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 1,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 2,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 2,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 3,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 3,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 4,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 4,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 2,0 µg/ml ou de cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 1,0 µg/ml, *por exemplo*, cerca de 0,5 µg/ml.

[000123] Em certas modalidades, o anticorpo de captura pode ser diluído em um tampão de revestimento. Exemplos não limitantes de tampões de revestimento incluem PBS, um tampão de carbonato, um tampão de bicarbonato ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, o tampão de revestimento é bicarbonato de sódio. Em certas modalidades, o tampão de revestimento é PBS. Em certas modalidades, o tampão de revestimento pode ser usado a uma concentração de cerca de 10 mM a cerca de 1 M. Por exemplo, mas não a título de limitação, o tampão de revestimento pode ser usado a uma concentração de cerca de 10 mM a cerca de 100 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 200 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 300 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 400 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 500 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 600 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 700 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 800 mM, de cerca de 10 mM a cerca de 900 mM, de cerca de 100 mM a cerca de 1 M, de cerca de 200 mM a cerca de 1 M, de cerca de 300 mM a cerca de 1 M, de cerca de 400 mM a cerca de 1 M, de cerca de 500 mM a cerca de 1 M, de cerca de 600 mM a cerca de 1 M, de cerca de 700 mM a cerca de 1 M, de cerca de 800 mM a cerca de 1 M ou de cerca de 900 mM a cerca de 1 M.

[000124] Os anticorpos de captura, como usado no presente documento, podem ser imobilizados em uma fase sólida. Por exemplo, mas não como limitação, a fase sólida pode ser qualquer suporte ou transportador

inerte que seja útil em ensaios imunométricos, incluindo suportes na forma de, *por exemplo*, superfícies, partículas, matrizes porosas, esferas e similares. Exemplos não limitativos de suportes comumente usados incluem pequenas folhas, SEPHADEX®, géis, cloreto de polivinila, esferas de plástico e placas de ensaio ou tubos de ensaio fabricados em polietileno, polipropileno, poliestireno e similares, incluindo placas de microtitulação de 96 poços, bem como materiais particulados, tais como papel de filtro, agarose, dextrano reticulado e outros polissacarídeos. Em certas modalidades, a fase sólida usada para imobilização pode ser esferas. Por exemplo, mas não a título de limitação, um anticorpo de captura divulgado neste documento é imobilizado em esferas paramagnéticas. Em certas modalidades, os anticorpos de captura imobilizados são revestidos em uma placa de microtitulação que pode ser usada para analisar várias amostras ao mesmo tempo.

[000125] Em certas modalidades, as esferas paramagnéticas acopladas ao anticorpo de captura podem ser usadas em uma concentração de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, *por exemplo*, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $1,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $2,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $3,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $4,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $5,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $6,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $7,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $8,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $9,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $1,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $2,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $3,0 \times 10^7$ esferas/ml/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $4,0 \times 10^7$

esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $5,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $6,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $7,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $8,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $9,0 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $1,0 \times 10^7$ esferas/ml, de cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $2,0 \times 10^7$ esferas/ml ou de cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $3,0 \times 10^7$ esferas/ml. Em certas modalidades, as esferas paramagnéticas podem ser usadas em uma concentração de cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $2,0 \times 10^7$ esferas/ml. Em certas modalidades, as esferas paramagnéticas podem ser usadas a uma concentração de cerca de $1,0 \times 10^7$ esferas/ml, *por exemplo*, cerca de $1,22 \times 10^7$ esferas/ml, ou a uma concentração de cerca de $0,5 \times 10^7$ esferas/ml, *por exemplo*, cerca de $0,59 \times 10^7$ esferas/ml.

[000126] Os métodos de imunoensaio divulgados neste documento podem incluir ainda colocar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector. Em certas modalidades, o anticorpo detector se liga a um epítopo presente em FGF21. Em certas modalidades, o anticorpo detector se liga a um epítopo presente no material de combinação de anticorpo de captura-amostra, mas não no anticorpo de captura na ausência de FGF21. Em certas modalidades, o anticorpo detector ligado à combinação de anticorpo de captura-amostra é subsequentemente medido ou quantificado usando um meio de detecção, *por exemplo*, um ou mais agentes de detecção, para o anticorpo de detecção determinar a quantidade de proteína FGF21, *por exemplo*, proteína FGF21 total ou FGF21 ativa, ligada ao anticorpo detector.

[000127] Em certas modalidades, o anticorpo detector pode ser usado em uma concentração de cerca de $0,1 \mu\text{g/ml}$ a cerca de $5,0 \mu\text{g/ml}$.

Por exemplo, mas não como limitação, o anticorpo detector pode ser usado em uma concentração de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 0,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 2,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 2,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 3,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 3,5 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 4,0 µg/ml, de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 4,5 µg/ml, de cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 1,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 1,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 2,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 2,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 3,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 3,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 4,0 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 4,5 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml, de cerca de 1,0 µg/ml a cerca de 3,0 µg/ml, de cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 3,0 µg/ml ou de cerca de 0,5 µg/ml a cerca de 2,0 µg/ml. Em certas modalidades, um imunoensaio para detectar a proteína FGF21 total pode usar um anticorpo detector a uma concentração entre cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1,0 µg/ml, *por exemplo*, cerca de 0,4 µg/ml ou cerca de 0,8 µg/ml. Em certas modalidades, um imunoensaio para detectar a proteína FGF21 ativa pode usar um anticorpo detector a uma concentração entre cerca de 1,0 µg/ml a cerca de 3,0 µg/ml, *por exemplo*, cerca de 1,1 µg/ml ou cerca de 2,1 µg/ml.

[000128] Em certas modalidades, os anticorpos anti-FGF21 para uso nos métodos divulgados podem ser marcados. Os marcadores incluem, mas não se limitam a, marcadores ou frações que são detectadas diretamente, tais como fluorescentes, cromóforos, elétron-densos, quimioluminescentes e marcadores radioativos, bem como frações, tais como enzimas ou ligantes, que são detectados indiretamente, *por exemplo*, por meio de uma reação enzimática ou interação molecular. Exemplos não limitantes de marcadores incluem os radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos, tais

como quelatos de terras raras ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansil, umbeliferona, luciferases, *por exemplo*, luciferase do pirilampo e luciferase bacteriana (*vide* Patente dos EUA de nº 4.737.456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinedionas, peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina, β -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacarídeo oxidases, *por exemplo*, glicose oxidase, galactose oxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase, oxidases heterocíclicas, tais como uricase e xantina oxidase, acopladas a uma enzima que emprega peróxido de hidrogênio para oxidar um precursor de corante, tal como HRP, lactoperoxidase ou microperoxidase, biotina/avidina, marcadores de rotação, marcadores de bacteriófago, radicais livres estáveis e similares. Em certas modalidades, o anticorpo detector é marcado com biotina, *por exemplo*, o anticorpo detector é conjugado com biotina.

[000129] Em certas modalidades, o agente de detecção para o anticorpo detector biotinilado é avidina, estreptavidina-HRP ou estreptavidina- β -D-galactopiranosose (SBG). Em certas modalidades, a leitura do agente de detecção é fluorimétrica ou colorimétrica. Por exemplo, mas não como limitação, tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio podem ser usados como leitura. Em certas modalidades, se o agente de detecção for estreptavidina-HRP, a leitura pode ser colorimétrica usando tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. Alternativamente, em certas modalidades, a resorufina β -D-galactopiranosídeo pode ser usada como leitura. Por exemplo, mas não como forma de limitação, se o agente de detecção for SBG, a leitura pode ser fluorimétrica usando resorufina β -D-galactopiranosídeo.

[000130] Em certas modalidades, o agente de detecção, *por exemplo*, SBG, pode ser usado em uma concentração de cerca de 50 a cerca de 500 pM. Por exemplo, mas não como limitação, o agente de detecção pode ser usado em uma concentração de cerca de 50 a cerca de 100 pM, de cerca de 50 a cerca de 150 pM, de cerca de 50 a cerca de 200 pM, de cerca de 50 a

cerca de 250 pM, de cerca de 50 a cerca de 300 pM, de cerca de 50 a cerca de 350 pM, de cerca de 50 a cerca de 400 pM, de cerca de 50 a cerca de 450 pM, de cerca de 100 a cerca de 500 pM, de cerca de 150 a cerca de 500 pM, de cerca de 200 a cerca de 500 pM, de cerca de 250 a cerca de 500 pM, de cerca de 300 a cerca de 500 pM, de cerca de 350 a cerca de 500 pM, de cerca de 400 a cerca de 500 pM, de cerca de 450 a cerca de 500 pM, de cerca de 100 a cerca de 400 pM ou de cerca de 200 a cerca de 400 pM. Em certas modalidades, o agente de detecção pode ser usado em uma concentração de cerca de 100 pM a cerca de 400 pM, *por exemplo*, SBG pode ser usado em uma concentração de cerca de 110 pM, cerca de 155 pM ou cerca de 310 pM. Em certas modalidades, SBG é usado em uma concentração de cerca de 310 pM. Em certas modalidades, o agente de detecção, *por exemplo*, HRP, pode ser usado em uma diluição de cerca de 1/10 a cerca de 1/1000. Por exemplo, mas não como limitação, o agente de detecção pode ser usado em uma diluição de cerca de 1/10 a cerca de 1/100, de cerca de 1/10 a cerca de 1/500, de cerca de 1/100 a cerca de 1/1000 ou de cerca de 1/500 a cerca de 1/1000. Em certas modalidades, o agente de detecção pode ser usado em uma diluição de cerca de 1/100 a cerca de 1/1000, *por exemplo*, HRP pode ser usado em uma diluição de cerca de 1/100 ou cerca de 1/500.

[000131] Em certas modalidades, os métodos da presente divulgação podem incluir o bloqueio do anticorpo de captura com um tampão de bloqueio. Em certas modalidades, o tampão de bloqueio pode incluir PBS, albumina de soro bovino (BSA) e/ou um biocida, *por exemplo*, ProClin™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Em certas modalidades, o método pode incluir várias etapas de lavagem. Em certas modalidades, a solução usada para a lavagem é geralmente um tampão (*por exemplo*, um "tampão de lavagem"), tal como, mas não limitado a, um tampão PBS que inclui um detergente, *por exemplo*, Tween 20. Por exemplo, mas não como limitação, o anticorpo de

captura pode ser lavado após o bloqueio e/ou a amostra pode ser separada do anticorpo de captura para remover o material não capturado, *por exemplo*, por lavagem.

[000132] Os métodos de imunoensaio da presente divulgação podem ser usados, em certas modalidades, para detectar a quantidade de proteína FGF21 total em uma amostra, *por exemplo*, detectando formas processadas e de comprimento total de FGF21. Por exemplo, mas não como limitação, um método de imunoensaio para a detecção da proteína FGF21 total pode usar um ou mais anticorpos que se ligam a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, *por exemplo*, resíduos de aminoácidos 5-172 da SEQ ID NO: 1. Em certas modalidades, o anticorpo de captura é um anticorpo que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e o anticorpo detector é um anticorpo que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21. Em certas modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo detector são o mesmo anticorpo, enquanto em outras modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo detector são anticorpos diferentes, mas ambos se ligam a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21. Em certas modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21. Por exemplo, mas não como limitação, o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 que não se sobrepõem. Em certas modalidades, o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 que se sobrepõem parcialmente.

[000133] Em certas modalidades, um imunoensaio para determinar a quantidade de proteína FGF21 total em uma amostra pode incluir (a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro

dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (b) colocar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21; (c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

[000134] Em certas modalidades, um método de imunoensaio da presente divulgação pode ser usado para detectar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra, *por exemplo*, detectando a proteína FGF21 que retém seu fragmento terminal C. Em certas modalidades, um método de imunoensaio para a detecção da proteína FGF21 total pode usar um ou mais anticorpos que se ligam a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21, *por exemplo*, resíduos de aminoácidos 173-182 da SEQ ID NO: 1, e um ou mais anticorpos que se ligam a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21. Por exemplo, mas não como limitação, um método de imunoensaio para detectar a quantidade de proteína FGF21 ativa pode usar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21. Em certas modalidades, o anticorpo detector que se liga aos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21 pode ser o anticorpo anti-FGF21 da Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, CA, vendido sob o número de catálogo 31002. Em certas modalidades, o anticorpo detector que se liga aos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21 pode ser o anticorpo anti-FGF21 da Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, CA, vendido sob o número de catálogo 30661. Em certas modalidades, um método de

imunoensaio para determinar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra pode incluir (a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (b) colocar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; (c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

[000135] A presente divulgação fornece ainda métodos de imunoensaio para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra. Por exemplo, mas não como limitação, tais métodos podem envolver a combinação de um imunoensaio para detectar a proteína FGF21 total com um imunoensaio para detectar a proteína FGF21 ativa. Em certas modalidades, os métodos de imunoensaio para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra podem incluir (a) (i) colocar um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (ii) colocar o primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21; (iii) detectar o primeiro anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do primeiro anticorpo detector ligado; e (b) (i) colocar um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de

FGF21 em contato com a amostra para gerar um segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (ii) colocar o segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; (iii) detectar o segundo anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do segundo anticorpo detector ligado. Os métodos podem incluir ainda comparar a quantidade de proteína FGF21 total conforme determinado pela etapa (a) com a quantidade de proteína FGF21 ativa conforme determinado pela etapa (b) para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total na amostra. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura são o mesmo anticorpo. Alternativamente, em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura são anticorpos diferentes, mas ambos se ligam a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21. Por exemplo, mas não como limitação, o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 que não se sobrepõem. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 que se sobrepõem parcialmente.

[000136] Em certas modalidades, os métodos de imunoensaio divulgados neste documento têm uma sensibilidade de detecção, *por exemplo*, uma sensibilidade no poço, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 20 pg/ml. Por exemplo, mas não como limitação, um imunoensaio divulgado neste

documento tem uma sensibilidade de cerca de 2 pg/ml a cerca de 3 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 4 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 5 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 6 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 7 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 8 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 10 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 11 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 12 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 13 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 14 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 15 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 16 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 17 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 18 pg/ml, de cerca de 2 pg/ml a cerca de 19 pg/ml, de cerca de 3 pg/ml a cerca de 15 pg/ml, de cerca de 3 pg/ml a cerca de 10 pg/ml ou de cerca de 3 pg/ml a cerca de 5 pg/ml. Em certas modalidades, um imunoensaio divulgado neste documento tem uma sensibilidade de cerca de 2 pg/ml ou mais, 1 pg/ml ou mais ou 0,5 pg/ml ou mais. Em certas modalidades, um imunoensaio divulgado neste documento tem uma sensibilidade de detecção, *por exemplo*, uma sensibilidade no poço, de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 2,0 pg/ml, *por exemplo*, de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml, de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 1,0 pg/ml ou de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 1,5 pg/ml. Por exemplo, mas não como limitação, um imunoensaio divulgado neste documento, *por exemplo*, um imunoensaio de molécula única usando o Simoa HD-1 Analyzer™, tem uma sensibilidade, *por exemplo*, uma sensibilidade no poço, de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

[000137] As amostras analisadas pelos métodos de imunoensaio da presente divulgação podem ser amostras clínicas, células em cultura, sobrenadantes celulares, lisados celulares, amostras de soro, amostras de plasma sanguíneo, outras amostras de fluido biológico (*por exemplo*, fluido linfático) ou amostras de tecido. Em certas modalidades, a fonte da amostra pode ser tecido sólido (*por exemplo*, de um órgão fresco, congelado e/ou preservado, amostra de tecido, soro, plasma sanguíneo, biópsia ou aspirado)

ou células de um paciente. Em certas modalidades, a amostra é uma amostra de sangue. Em certas modalidades, a amostra é uma amostra de plasma. Em certas modalidades, a amostra, *por exemplo*, amostra de sangue ou plasma, pode ser obtida de um paciente e tratada com um ou mais inibidores de protease, esterase, DDP-IV e/ou fosfatase. Por exemplo, mas não como limitação, uma amostra pode ser tratada com um coquetel de inibidores de protease e fosfatase, *por exemplo*, MS-SAFE (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Em certas modalidades, a amostra é tratada com um anticoagulante ou coletada em um tubo que contém um anticoagulante, *por exemplo*, K₂-EDTA. Em certas modalidades, a amostra pode ser coletada usando o Sistema de Coleta de Sangue P800 (BD Biosciences, San Jose, CA).

III. ANTICORPOS

[000138] A presente divulgação fornece ainda anticorpos que se ligam a FGF21, *por exemplo*, FGF21 humano. Os anticorpos da presente divulgação são úteis para detectar e quantificar os níveis de proteína FGF21 em uma amostra. Em certas modalidades, os anticorpos da presente divulgação podem ser usados em métodos de imunoensaio para a detecção e quantificação da proteína FGF21, divulgados no presente documento. Por exemplo, mas não como limitação, os anticorpos da presente divulgação podem ser usados para detectar os níveis de proteína FGF21 total e/ou proteína FGF21 ativa em uma amostra.

[000139] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser humanizado. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação compreende uma estrutura humana aceitadora, *por exemplo*, uma estrutura de imunoglobulina humana ou uma estrutura de consenso humana. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser um anticorpo monoclonal, incluindo um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. Por exemplo, mas não como limitação, um

anticorpo da presente divulgação pode ser quimérico. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser um fragmento de anticorpo, *por exemplo*, um fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacorpo ou F(ab')₂. Em certas modalidades, o anticorpo é uma IgG. Em certas modalidades, o anticorpo é selecionado de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Em outra modalidade, o anticorpo é um anticorpo de comprimento total, *por exemplo*, um anticorpo de IgG1 intacto ou outra classe ou isotipo de anticorpo, tal como definido neste documento. Em certas modalidades, os anticorpos anti-FGF21 divulgados neste documento podem ser marcados, *por exemplo*, conjugados com biotina. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode incorporar qualquer uma das características, isoladamente ou em combinação, conforme descrito nas Seções 1-7, detalhadas abaixo.

A. ANTICORPOS ANTI-FGF21 EXEMPLARES

[000140] A presente divulgação fornece anticorpos isolados que se ligam a uma proteína FGF21. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode se ligar a um epítipo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, *por exemplo*, resíduos de aminoácidos 5-172 da SEQ ID NO: 1. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode se ligar a um epítipo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21, *por exemplo*, resíduos de aminoácidos 173-182 da SEQ ID NO: 1. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação não se liga a um epítipo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 1-4 de FGF21, *por exemplo*, resíduos de aminoácidos 1-4 da SEQ ID NO: 1. Exemplos não limitantes de anticorpos anti-FGF21 são divulgados nas Tabelas 8-13 e 16-19 e na Figura 41A-B.

[000141] A presente divulgação fornece anticorpos anti-FGF21 compreendendo, em certas modalidades, pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco ou seis CDRs selecionadas a partir de (a) CDR-H1

compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 26 -29 e suas substituições conservativas; (b) CDR-H2 compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 30-33 e suas substituições conservativas; (c) CDR-H3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 34-37 e suas substituições conservativas; (d) CDR-L1 compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 38-41 e suas substituições conservativas; (e) CDR-L2 compreendendo SEQ ID NOs: 42-45 e suas substituições conservativas; e (f) CDR-L3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 46-49 e suas substituições conservativas.

[000142] A presente divulgação fornece anticorpos anti-FGF21 que, em certas modalidades, compreendem: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26 e suas substituições conservativas; (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30 e suas substituições conservativas; (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34 e suas substituições conservativas; (d) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38 e suas substituições conservativas; (e) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e (f) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46 e suas substituições conservativas.

[000143] A presente divulgação fornece anticorpos anti-FGF21 que, em certas modalidades, compreendem: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27 e suas substituições conservativas; (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31 e suas substituições conservativas; (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35; (d) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39 e suas

substituições conservativas; (e) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43 e suas substituições conservativas; e (f) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47 e suas substituições conservativas.

[000144] A presente divulgação fornece anticorpos anti-FGF21 que, em certas modalidades, compreendem: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28 e suas substituições conservativas; (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32 e suas substituições conservativas; (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36 e suas substituições conservativas; (d) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 40 e suas substituições conservativas; (e) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44 e suas substituições conservativas; e (f) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48 e suas substituições conservativas.

[000145] A presente divulgação fornece anticorpos anti-FGF21 que, em certas modalidades, compreendem: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29 e suas substituições conservativas; (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33 e suas substituições conservativas; (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37 e suas substituições conservativas; (d) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41 e suas substituições conservativas; (e) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45 e suas substituições conservativas; e (f) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49 e suas substituições conservativas.

[000146] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de domínio variável de

cadeia pesada (VH) tendo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 54-57 e 72-75. Em certas modalidades, uma sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade contém substituições (*por exemplo*, substituições conservativas), inserções ou deleções relativas à sequência de referência, mas um anticorpo anti-FGF21 compreendendo essa sequência retém a capacidade de se ligar a FGF21. Em certas modalidades, um total de 1 a 10 aminoácidos foram substituídos, inseridos e/ou deletados. Em determinadas modalidades, as substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das CDRs (*ou seja*, nas FRs). Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de VH que compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 54-57 e 72-75.

[000147] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de domínio variável de cadeia leve (VL) tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 50-53 e 68-71. Em certas modalidades, uma sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade contém substituições (*por exemplo*, substituições conservativas), inserções ou deleções relativas à sequência de referência, mas um anticorpo anti-FGF21 compreendendo essa sequência retém a capacidade de se ligar a FGF21. Em certas modalidades, um total de 1 a 10 aminoácidos foram substituídos, inseridos e/ou deletados. Em determinadas modalidades, as substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das CDRs (*ou seja*, nas FRs). Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende

uma sequência de VL compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 50-53 e 68-71.

[000148] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54. Em outro aspecto, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46.

[000149] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 55. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 51. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, (b) CDR-

H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47.

[000150] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 56. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 52. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48.

[000151] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57.

Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49.

[000152] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:26, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:30, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:34. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:38, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID

NO:42, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:46.

[000153] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47.

[000154] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-

H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:28, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:32, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:36. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:40, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:48.

[000155] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VH tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de VL tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 68. Em uma modalidade particular, a VH compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:29, (b) CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:33, e (c) CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:37. Em uma modalidade particular, a VL compreende uma, duas ou três CDRs selecionadas a partir de: (a) CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:41, (b) CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:45, e (c) CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:49.

[000156] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de cadeia pesada (HC) de comprimento total tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 22-25 e 64-67. Em certas modalidades, uma sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade contém substituições (*por exemplo*, substituições conservativas), inserções ou deleções relativas à sequência de referência, mas um anticorpo anti-FGF21 compreendendo essa sequência retém a capacidade de se ligar a FGF21. Em certas modalidades, um total de 1 a 10 aminoácidos foram substituídos, inseridos e/ou deletados. Em determinadas modalidades, as substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das CDRs (*ou seja*, nas FRs). Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de HC compreendendo uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 22-25 e 64-67.

[000157] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de cadeia leve (LC) de comprimento total tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 18-21 e 60-63. Em certas modalidades, uma sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade contém substituições (*por exemplo*, substituições conservativas), inserções ou deleções relativas à sequência de referência, mas um anticorpo anti-FGF21 compreendendo essa sequência retém a capacidade de se ligar a FGF21. Em certas modalidades, um total de 1 a 10 aminoácidos foram substituídos, inseridos e/ou deletados. Em determinadas modalidades, as substituições, inserções ou deleções ocorrem em regiões fora das CDRs (*ou seja*, nas FRs). Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende uma sequência de LC compreendendo uma sequência de aminoácidos de

qualquer uma das SEQ ID NOs: 18-21 e 60-63.

[000158] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18.

[000159] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 19.

[000160] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20.

[000161] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de

identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21.

[000162] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 67. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63.

[000163] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 62.

[000164] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 65. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61.

[000165] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de HC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 64. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação compreende a sequência de LC tendo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 60.

[000166] Em certas modalidades, é fornecido um anticorpo anti-FGF21, em que o anticorpo compreende uma VH como em qualquer uma das modalidades fornecidas acima, e uma VL como em qualquer uma das modalidades fornecidas acima. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 é fornecido, em que o anticorpo compreende uma HC de comprimento total como em qualquer uma das modalidades fornecidas acima e uma LC de comprimento total como em qualquer uma das modalidades fornecidas acima.

1. AFINIDADE DE ANTICORPO

[000167] Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação pode ter uma constante de dissociação (K_d) de ≤ 1 M, ≤ 100 mM, ≤ 10 mM, ≤ 1 mM, ≤ 100 μ M, ≤ 10 μ M, ≤ 1 μ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM, $\leq 0,01$ nM ou $\leq 0,001$ nM. Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ter uma K_d de cerca de 10^{-3} ou menos, ou 10^{-8} M ou menos, *por exemplo*, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, *por exemplo*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M. Em certas modalidades, um anticorpo anti-FGF21, divulgado neste documento, pode ter uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M. Por exemplo, mas não a título de limitação, um anticorpo de captura ou um anticorpo detector da presente divulgação se liga a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

[000168] Em uma modalidade, a K_D é medida por um ensaio

radiomarcado de ligação ao antígeno (RIA). Em uma modalidade, um RIA é realizado com a versão Fab de um anticorpo de interesse e o seu antígeno. Por exemplo, mas não como limitação, uma afinidade de ligação da solução de Fabs para o antígeno é medida equilibrando Fab com uma concentração mínima de antígeno marcado com ^{125}I na presença de uma série de titulação de antígeno não marcado, então capturando o antígeno ligado com uma placa revestida com anticorpo anti-Fab (ver, *por exemplo*, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para estabelecer as condições para o ensaio, placas de múltiplos poços MICROTITER® (Thermo Scientific) são revestidas durante a noite com 5 µg/ml de um anticorpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) em carbonato de sódio de 50 mM (pH 9,6), e subsequentemente bloqueadas com Albumina de soro bovino a 2% (p/v) em PBS por duas a cinco horas em temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Em uma placa não adsorvente (Nunc #269620), 100 pM ou 26 pM de antígeno com ^{125}I são misturados com diluições em série de um Fab de interesse (*por exemplo*, consistente com a avaliação do anticorpo anti-VEGF, Fab-12, em Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). O Fab de interesse é então incubado durante a noite; no entanto, a incubação pode continuar por um período mais longo (*por exemplo*, cerca de 65 horas) para garantir que o equilíbrio seja alcançado. Depois disso, as misturas são transferidas para a placa de captura para incubação à temperatura ambiente (*por exemplo*, por uma hora). A solução é então removida e a placa lavada oito vezes com 0,1% de polissorbato 20 (TWEEN-20®) em PBS. Quando as placas tiverem secas, 150 µl/poço de cintilante (MICROSCINT-20™; Packard) são adicionados e as placas são contadas em um contador gama TOPCOUNT™ (Packard) por dez minutos. As concentrações de cada Fab que dão menos ou igual a 20% da ligação máxima são escolhidas para uso em ensaios de ligação competitiva.

[000169] Em certas modalidades, a K_d pode ser medida

usando um ensaio de ressonância de plasmon de superfície BIACORE®. Por exemplo, mas não como limitação, um ensaio usando um BIACORE®-2000, um BIACORE®-3000, um BIACORE X100 ou uma unidade de processamento BIACORE T200 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) é realizado a 25 °C com chips de antígeno CM5 imobilizado em ~ 10 unidades de resposta (RU). Em certas modalidades, os chips biossensores de dextrano carboximetilado (CM5, Biacore, Inc.) são ativados com cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antígeno é diluído com acetato de sódio a 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes da injeção a uma taxa de fluxo de 5 µl/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção de antígeno, etanolamina a 1 M é injetada para bloquear os grupos que não reagiram. Para medições de cinética, diluições em série de Fab (0,78 nM a 500 nM) são injetadas em PBS com 0,05% de surfactante polissorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a uma taxa de fluxo de aproximadamente 25 µl/min. As taxas de associação (kon) e as taxas de dissociação (koff) são calculadas usando um modelo de ligação Langmuir simples um-para-um (BIACORE® Evaluation Software versão 3.2) ajustando simultaneamente os sensorgramas de associação e dissociação. A constante de equilíbrio de dissociação (K_d) pode ser calculada como a razão koff/kon. Vide, *por exemplo*, Chen et al., *J. Mol. Biol.*, 293:865-881 (1999). Se a taxa de ativação exceder $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pelo ensaio de ressonância de plasmon de superfície acima, a taxa de associação pode ser determinada usando uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou diminuição na intensidade de emissão de fluorescência (excitação = 295 nm ; emissão = 340 nm, passagem de banda de 16 nm) a 25°C de um anticorpo anti-antígeno de 20 nM (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes de antígeno, conforme medido em um espectrômetro, tal um espectrofotômetro

equipado com stop-flow (Aviv Instruments) ou um espectrofotômetro SLM-AMINCO™ da série 8000 (ThermoSpectronic) com uma cubeta agitada.

2. FRAGMENTOS DE ANTICORPO

[000170] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação é um fragmento de anticorpo. Os fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, fragmentos de Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv e scFv e outros fragmentos descritos abaixo. Para uma revisão de certos fragmentos de anticorpo, vide Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para uma revisão dos fragmentos scFv, vide, *por exemplo*, Pluckthün, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., (Springer-Verlag, Nova Iorque), pp. 269-315 (1994); vide também WO 93/16185; e Patentes dos EUA de nºs 5.571.894 e 5.587.458. Para a discussão de fragmentos Fab e F(ab')₂ compreendendo resíduos do epítipo de ligação ao receptor de salvamento e tendo um aumento na meia vida *in vivo*, vide Patente dos EUA de nº 5.869.046.

[000171] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser um diacorpo. Os diacorpos são fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação ao antígeno que podem ser bivalentes ou biespecíficos. *Vide*, *por exemplo*, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); e Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993). Triacorpos e tetracorpos, que são fragmentos de anticorpos adicionais dentro do escopo dos anticorpos da presente divulgação, também são descritos em Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[000172] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser um anticorpo de domínio único. Os anticorpos de domínio único são fragmentos de anticorpo compreendendo toda ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada ou toda ou uma porção do domínio variável da cadeia leve de um anticorpo. Em certas modalidades, um anticorpo de

domínio único é um anticorpo de domínio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; vide, *por exemplo*, a Patente dos EUA de nº US 6.248.516 B1).

[000173] Os fragmentos de anticorpo podem ser feitos através de várias técnicas, incluindo, mas não se limitando a, digestão proteolítica de um anticorpo intacto, bem como a produção em células hospedeiras recombinantes (*por exemplo*, *E. coli* ou fago), como descrito neste documento.

3. ANTICORPOS QUIMÉRICOS E HUMANIZADOS

[000174] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação é um anticorpo quimérico. Certos anticorpos quiméricos são descritos, *por exemplo*, na Patente dos EUA de nº 4.816.567; e Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Em certas modalidades, um anticorpo quimérico da presente divulgação compreende uma região variável não humana (*por exemplo*, uma região variável derivada de um camundongo, rato, hamster, coelho ou primata não humano, tal como um macaco) e uma região constante humana. Em um outro exemplo, um anticorpo quimérico é um anticorpo de “classe trocada” em que a classe ou a subclasse foi alterada a partir do anticorpo parental. Os anticorpos quiméricos incluem fragmentos de ligação ao antígeno.

[000175] Em certas modalidades, um anticorpo quimérico da presente divulgação pode ser um anticorpo humanizado. Normalmente, um anticorpo não humano é humanizado para reduzir a imunogenicidade para os humanos, embora mantendo a especificidade e afinidade do anticorpo não humano parental. Geralmente, um anticorpo humanizado compreende um ou mais domínios variáveis em que CDRs, *por exemplo*, CDRs (ou porções das mesmas) são derivadas de um anticorpo não humano, e FRs (ou porções das mesmas) são derivadas de sequências de anticorpos humanos. Um anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de

uma região constante humana. Em algumas modalidades, alguns resíduos de FR em um anticorpo humanizado são substituídos por resíduos correspondentes de um anticorpo não humano (*por exemplo*, o anticorpo a partir do qual os resíduos de CDR são derivados), *por exemplo*, para restaurar ou melhorar a especificidade ou a afinidade do anticorpo.

[000176] Anticorpos humanizados e métodos para fabricá-los são revisados, *por exemplo*, em Almagro e Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), e são descritos adicionalmente, *por exemplo*, em Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989); Patentes dos EUA de nºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 e 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods*, 36:25-34 (2005) (descrevendo o enxerto da região determinante da especificidade (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.*, 28:489-498 (1991) (descrevendo "ressurgimento"); Dall'Acqua et al., *Methods*, 36:43-60 (2005) (descrevendo "embaralhamento de FR"); e Osbourn et al., *Methods*, 36:61-68 (2005) e Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (descrevendo a abordagem de "seleção guiada" para embaralhamento de FR).

[000177] As regiões estruturais humanas que podem ser usadas para humanização incluem, mas não estão limitadas a: regiões estruturais selecionadas usando o método de "melhor ajuste" (vide, *por exemplo*, Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)); regiões estruturais derivadas da sequência de consenso de anticorpos humanos de um subgrupo particular de regiões variáveis de cadeia leve ou pesada (vide, *por exemplo*, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); e Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiões estruturais maduras (mutadas somaticamente) humanas ou regiões estruturais da linhagem germinativa humana (vide, *por exemplo*, Almagro e Fransson, *Front. Biosci.*, 13:1619-1633 (2008)); e regiões estruturais derivadas da triagem de bibliotecas de FR (vide,

por exemplo, Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272:10678-10684 (1997) e Rosok et al., *J. Biol. Chem.*, 271:22611-22618 (1996)).

4. ANTICORPOS HUMANOS

[000178] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser um anticorpo humano. Os anticorpos humanos podem ser produzidos usando várias técnicas conhecidas na técnica. Os anticorpos humanos são descritos geralmente em van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) e Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450-459 (2008).

[000179] Os anticorpos humanos podem ser preparados por administrar um imunógeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir anticorpos humanos intactos ou anticorpos intactos com regiões variáveis humanas em resposta ao desafio antigênico. Tais animais normalmente contêm todos ou uma porção dos loci de imunoglobulina humana, que substituem os loci de imunoglobulina endógena, ou que estão presentes de forma extracromossomical ou integrados aleatoriamente nos cromossomos do animal. Em tais camundongos transgênicos, os loci de imunoglobulina endógena geralmente foram inativados. Para uma revisão de métodos para obter anticorpos humanos a partir de animais transgênicos, vide Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). *Vide também, por exemplo*, as patentes dos EUA de nºs 6.075.181 e 6.150.584, que descrevem a tecnologia XENOMOUSE™; patente dos EUA de nº 5.770.429, que descreve a tecnologia HUMAB®; Patente dos EUA de nº 7.041.870, que descreve a tecnologia K-M MOUSE® e Publicação de Pedido de Patente dos EUA de nº 2007/0061900, que descreve a tecnologia ELOCIMOUSE®). As regiões variáveis humanas de anticorpos intactos geradas por tais animais podem ser adicionalmente modificadas, *por exemplo*, através da combinação com uma região constante humana diferente.

[000180] Os anticorpos humanos também podem ser produzidos por métodos à base de hibridoma. Linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma de camundongo-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas. (*Vide, por exemplo*, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987); e Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991)). Anticorpos humanos gerados por meio de tecnologia de hibridoma de células B humanas também são descritos em Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Métodos adicionais incluem aqueles descritos, por exemplo, na Patente dos EUA de nº 7.189.826 (descrevendo a produção de anticorpos IgM humanos monoclonais a partir de linhagens celulares de hibridoma) e em Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (descrevendo hibridomas humano-humano). A tecnologia de hibridoma humano (tecnologia Trioma) é também descrita em Vollmers e Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) e Vollmers e Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[000181] Os anticorpos humanos também podem ser gerados isolando sequências de domínio variável de clone Fv selecionadas a partir de bibliotecas de exibição em fago derivadas de humanos. Essas sequências de domínio variável podem então ser combinadas com um domínio constante humano desejado. As técnicas para a seleção de anticorpos humanos a partir de bibliotecas de anticorpos são descritas abaixo.

5. ANTICORPOS DERIVADOS DE BIBLIOTECA

[000182] Os anticorpos da presente divulgação podem ser isolados por triagem de bibliotecas combinatórias para anticorpos com a atividade ou atividades desejadas. Por exemplo, uma variedade de métodos são conhecidos na técnica para gerar bibliotecas de exibição em fagos e

triagem de tais bibliotecas para anticorpos possuindo as características de ligação desejadas. Tais métodos são revisados, *por exemplo*, em Hoogenboom et al., em *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) e descrito mais detalhadamente, *por exemplo*, em 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 e Bradbury, em *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); e Lee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2):119-132 (2004).

[000183] Em certos métodos de exibição em fagos, os repertórios dos genes de VH e VL são clonados separadamente por reação em cadeia da polimerase (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas em fagos, que podem então ser rastreadas quanto a fagos de ligação ao antígeno, conforme descrito em Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Os fagos apresentam normalmente fragmentos de anticorpo, tanto como fragmentos Fv de cadeia única (scFv) ou como fragmentos Fab. Bibliotecas de fontes imunizadas fornecem anticorpos de alta afinidade para o imunógeno sem a necessidade de construir hibridomas. Alternativamente, o repertório virgem pode ser clonado (*por exemplo*, de humano) para fornecer uma única fonte de anticorpos para uma ampla faixa de antígenos não próprios e também próprios sem qualquer imunização, conforme descrito por Griffiths et al., *EMBO J*, 12:725 -734 (1993). Em certas modalidades, as bibliotecas virgens também podem ser feitas sinteticamente por clonagem de segmentos do gene V não rearranjados de células-tronco e usando iniciadores de PCR contendo sequência aleatória para codificar as regiões CDR3 altamente variáveis e para realizar o rearranjo *in vitro*, conforme descrito por Hoogenboom e Winter, J.

Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Publicações de patentes que descrevem bibliotecas em fagos de anticorpos humanos incluem, por exemplo: Patente dos EUA de nº 5.750.373 e Publicações de Patente dos EUA de nºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 e 2009/0002360.

[000184] Os anticorpos ou fragmentos de anticorpos isolados de bibliotecas de anticorpos humanos são considerados anticorpos humanos ou fragmentos de anticorpos humanos neste documento.

6. ANTICORPOS MULTIESPECÍFICOS

[000185] Em certas modalidades, um anticorpo da presente divulgação pode ser um anticorpo multiespecífico, *por exemplo*, um anticorpo biespecífico. Os anticorpos multiespecíficos são anticorpos monoclonais que têm especificidades de ligação para pelo menos dois epítomos diferentes. Em certas modalidades, uma das especificidades de ligação é para um epítomo presente em FGF21 e a outra é para qualquer outro antígeno. Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos.

[000186] As técnicas para a produção de anticorpos multiespecíficos incluem, mas não estão limitados a, coexpressão recombinante de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina tendo especificidades diferentes (*vide* Milstein e Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), WO 93/08829, e Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655 (1991)), e engenharia de "knob-in-hole" (*vide, por exemplo*, Patente dos EUA de nº 5.731.168). Os anticorpos multiespecíficos também podem ser produzidos por engenharia de efeitos de direcionamento eletrostático para a produção de moléculas heterodiméricas Fc de anticorpo (WO 2009/089004A1); reticulação de dois ou mais anticorpos ou fragmentos (*vide, por exemplo*, Patente dos EUA de nº 4.676.980 e Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)); uso de zíperes de

leucina para produzir anticorpos biespecíficos (vide, *por exemplo*, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992)); uso de tecnologia de "diacorpo" para fazer fragmentos de anticorpo biespecífico (vide, *por exemplo*, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); e uso dímeros Fv (sFv) de cadeia única (vide, *por exemplo*, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); e preparação de anticorpos triespecíficos como descrito, *por exemplo*, em Tutt et al. *J. Immunol.* 147:60 (1991).

[000187] Anticorpos projetados com três ou mais locais de ligação ao antígeno funcionais, incluindo "anticorpos de polvo", também estão incluídos neste documento (vide, *por exemplo*, US 2006/0025576A1).

7. VARIANTES DE ANTICORPO

[000188] A matéria presentemente divulgada fornece ainda variantes de sequência de aminoácidos dos anticorpos divulgados. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As variantes da sequência de aminoácidos de um anticorpo podem ser preparadas introduzindo modificações apropriadas na sequência de nucleotídeos que codifica o anticorpo ou por síntese de peptídeos. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas a, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição pode ser feita para chegar ao construto final, desde que o anticorpo final, *ou seja*, modificado, possua as características desejadas, *por exemplo*, ligação ao antígeno.

a) VARIANTES DE SUBSTITUIÇÃO, INSERÇÃO E EXCLUSÃO

[000189] As variantes de anticorpo podem ter uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos. Os locais de interesse para tal variação incluem, mas não estão limitados a, CDRs e FRs. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1, sob o título

"substituições preferidas". Exemplos não limitantes de mudanças mais substanciais são fornecidos na Tabela 1 sob o título de "substituições exemplares" e conforme descrito abaixo em referência às classes de cadeia lateral de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem ser introduzidas em um anticorpo de interesse e os produtos selecionados para uma atividade desejada, *por exemplo*, ligação ao antígeno retida/melhorada, imunogenicidade diminuída, citotoxicidade dependente de complemento melhorada (CDC) ou citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC).

TABELA 1

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições 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
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

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[000190] Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com propriedades comuns de cadeia lateral:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) resíduos que influenciam na orientação de cadeia: Gly, Pro; e
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[000191] Em certas modalidades, as substituições não conservativas implicarão na troca de um membro de uma dessas classes por outra classe.

[000192] Em certas modalidades, um tipo de variante substitucional envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental, *por exemplo*, um anticorpo humanizado ou humano. Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para estudo posterior terá(ão) modificações, *por exemplo*, melhorias, em certas propriedades biológicas, tais como, mas não se limitando a, afinidade aumentada, imunogenicidade reduzida, em relação ao anticorpo parental e/ou terá(ão) substancialmente retido certas propriedades biológicas do anticorpo original. Um exemplo não limitante de uma variante substitucional é um anticorpo amadurecido por afinidade, que pode ser convenientemente gerado, *por exemplo*, usando técnicas de maturação por afinidade baseadas em exibição em fago, tais como aquelas descritas neste documento. Em suma, um ou mais resíduos de CDR são mutados, os anticorpos variantes são exibidos no fago e rastreados para uma atividade biológica particular (*por exemplo*, afinidade de ligação).

[000193] Em certas modalidades, alterações (*por exemplo*, substituições) podem ser feitas em CDRs, *por exemplo*, para melhorar a afinidade do anticorpo. Tais alterações podem ser feitas em "pontos de acesso" de CDR, *ou seja*, resíduos codificados por códons que sofrem mutação em alta frequência durante o processo de maturação somática (vide, *por exemplo*, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), e/ou resíduos que entram em contato com o antígeno, com a VH ou VL variante resultante sendo testada quanto à afinidade de ligação. A maturação por afinidade por construção e resseleção de bibliotecas secundárias foi descrita, *por exemplo*, em Hoogenboom et al., em *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). Em certas modalidades de maturação por afinidade, a diversidade pode ser introduzida nos genes variáveis escolhidos para maturação por qualquer um de uma variedade de métodos (*por exemplo*, PCR propensa a erros, embaralhamento de cadeia ou mutagênese direcionada por oligonucleotídeo). É então criada uma biblioteca secundária. A biblioteca é então rastreada para identificar quaisquer variantes de anticorpos com a afinidade desejada. Outro método para introduzir diversidade envolve abordagens direcionadas a CDR, nas quais vários resíduos de CDR (*por exemplo*, 4-6 resíduos de cada vez) são randomizados. Os resíduos de CDR envolvidos na ligação ao antígeno podem ser especificamente identificados, *por exemplo*, usando mutagênese ou modelagem de varredura de alanina. CDR-H3 e CDR-L3 em particular são frequentemente direcionadas.

[000194] Em certas modalidades, substituições, inserções e/ou deleções podem ocorrer dentro de uma ou mais CDRs, desde que tais alterações não reduzam substancialmente a capacidade do anticorpo de se ligar ao antígeno. Por exemplo, alterações conservativas (*por exemplo*, substituições conservativas como fornecidas aqui) que não reduzem substancialmente a afinidade de ligação podem ser feitas em CDRs. Tais

alterações podem, por exemplo, estar fora de resíduos de contato ao antígeno nas CDRs. Em certas modalidades da variante de sequências de VH e VL fornecidas acima, cada CDR é inalterada, ou não contém mais do que uma, duas ou três substituições de aminoácidos.

[000195] Um método útil para identificação de resíduos ou regiões de um anticorpo que pode ser direcionado para mutagênese é chamado "mutagênese de varredura de alanina", como descrito por Cunningham e Wells, (1989), *Science*, 244:1081-1085. Neste método, um resíduo ou grupo de resíduos alvo (*por exemplo*, resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lys e glu) são identificados e substituídos por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (*por exemplo*, alanina ou polialanina) para determinar se a interação do anticorpo com o antígeno é afetada. Substituições adicionais podem ser introduzidas nos locais de aminoácidos demonstrando sensibilidade funcional às substituições iniciais. Alternativamente ou adicionalmente, é fornecida uma estrutura cristalina de um complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos podem ser direcionados ou eliminados como candidatos para substituição. As variantes podem ser rastreadas para determinar se contêm as propriedades desejadas.

[000196] As inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões de terminal amino e/ou carboxila variando em comprimento de um resíduo a polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequência de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo de metionila com terminal N. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo a uma enzima (*por exemplo*, para terapia dirigida por anticorpo-enzima-pró-fármaco (ADEPT)) ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida sérica do anticorpo.

b) VARIANTES DE GLICOSILAÇÃO

[000197] Os anticorpos da presente divulgação podem, em certas modalidades, ser alterados para aumentar ou diminuir a extensão em que o anticorpo é glicosilado. Por exemplo, mas não como limitação, a adição ou deleção de locais de glicosilação de um anticorpo pode ser convenientemente realizada alterando a sequência de aminoácidos de tal modo que um ou mais locais de glicosilação sejam criados ou removidos.

[000198] Quando os anticorpos da presente divulgação compreendem uma região Fc, o carboidrato ligado a ela, se presente, pode ser alterado. Anticorpos nativos produzidos por células de mamíferos normalmente compreendem um oligossacarídeo biantenário ramificado que é geralmente ligado por uma ligação N a Asn297 do domínio CH2 da região Fc. Vide, *por exemplo*, Wright et al., *TIBTECH*, 15:26-32 (1997). O oligossacarídeo pode incluir vários carboidratos, *por exemplo*, manose, N-Acetilglicosamina (GlcNAc), galactose e ácido siálico, bem como uma fucose ligada a um GlcNAc na "haste" da estrutura do oligossacarídeo biantenário. Em certas modalidades, as modificações do oligossacarídeo em um anticorpo da presente divulgação podem ser feitas a fim de criar variantes de anticorpo com certas propriedades melhoradas.

[000199] Em certas modalidades, as variantes de anticorpos são fornecidas tendo uma estrutura de carboidrato que não tem fucose ligada (direta ou indiretamente) a uma região Fc. Por exemplo, a quantidade de fucose em tal anticorpo pode ser de cerca de 1% a cerca de 80%, de cerca de 1% a cerca de 65%, de cerca de 5% a cerca de 65% ou de cerca de 20% a cerca de 40% e valores em entre.

[000200] Em certas modalidades, a quantidade de fucose pode ser determinada calculando a quantidade média de fucose dentro da cadeia de açúcar em Asn297, em relação à soma de todas as glicoestruturas

ligadas a Asn 297 (*por exemplo*, estruturas complexas, híbridas e de alta manose) conforme medido por Espectrometria de massa MALDI-TOF, conforme descrito em WO 2008/077546, *por exemplo*. Asn297 refere-se ao resíduo de asparagina localizado próximo da posição 297 na região Fc (numeraçãoda UE dos resíduos da região Fc); no entanto, Asn297 também pode estar localizado a cerca de ± 3 aminoácidos a montante ou a jusante da posição 297, *ou seja*, entre as posições 294 e 300, devido a pequenas variações de sequência em anticorpos. Tais variantes de fucosilação podem ter função ADCC melhorada. *Vide, por exemplo*, Publicação de Patente dos EUA de nº US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Exemplos de publicações relacionadas a variantes de anticorpo "desfucosiladas" ou "deficientes em fucose" incluem: 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).

[000201] Os anticorpos desfucosilados podem ser produzidos em qualquer linhagem celular que seja deficiente na fucosilação de proteínas. Exemplos não limitantes de linhagens celulares incluem células Lec13 CHO deficientes em fucosilação de proteína (Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Pedido de Patente dos EUA 2003/0157108 A1, Presta, L; e WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente no Exemplo 11), e linhagens celulares de nocaute, tais como gene alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, células CHO de nocaute (*vide, por exemplo*, Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); e WO2003/085107).

[000202] As variantes de anticorpo são ainda fornecidas com

oligossacarídeos bissectados, *por exemplo*, em que um oligossacarídeo biantenário ligado à região Fc do anticorpo é bissectado por GlcNAc. Tais variantes de anticorpo podem ter fucosilação reduzida e/ou função ADCC melhorada. Exemplos não limitantes de tais variantes de anticorpo são descritos, *por exemplo*, em WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patente dos EUA de nº 6.602.684 (Umana et al.); e US 2005/0123546 (Umana et al.). Variantes de anticorpo com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacarídeo ligado à região Fc também são fornecidas. Tais variantes de anticorpo podem ter função CDC melhorada. Tais variantes de anticorpo são descritas, *por exemplo*, em WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); e WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) VARIANTES DA REGIÃO Fc

[000203] Em certas modalidades, uma ou mais modificações de aminoácidos podem ser introduzidas na região Fc de um anticorpo fornecido neste documento, gerando assim uma variante da região Fc. A variante da região Fc pode compreender uma sequência da região Fc humana (*por exemplo*, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) compreendendo uma modificação de aminoácidos (*por exemplo*, uma substituição) em uma ou mais posições de aminoácidos.

[000204] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece variantes de anticorpo que possuem algumas, mas não todas as funções efetoras. Tal função efetora limitada pode tornar as variantes de anticorpo candidatas desejáveis para aplicações nas quais a meia-vida do anticorpo *in vivo* é importante, embora certas funções efetoras (tais como complemento e ADCC) sejam desnecessárias ou deletérias. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* podem ser realizados para confirmar a redução/depleção das atividades CDC e/ou ADCC. Por exemplo, os ensaios de ligação ao receptor Fc (FcR) podem ser realizados para garantir que o

anticorpo não possua ligação a FcγR (portanto, provavelmente sem atividade ADCC), mas mantém a capacidade de ligação a FcRn. As células primárias para mediar células ADCC e NK expressam somente FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR em células hematopoiéticas está em suma na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991). Exemplos não limitantes de ensaios *in vitro* para avaliar a atividade ADCC de uma molécula de interesse são descritos na Patente dos EUA de nº 5.500.362 (vide, *por exemplo*, Hellstrom, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7059-7063 (1986)) e Hellstrom, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1499-1502 (1985); Patente dos EUA de nº 5.821.337 (vide Bruggemann, et al., *J. Exp. Med.*, 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, métodos de ensaios não radioativos podem ser empregados (vide, *por exemplo*, ensaio de citotoxicidade não radioativa ACTI™ para citometria de fluxo (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; e ensaio de citotoxicidade não radioativa CYTOTOX 96® (Promega, Madison, WI). As células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células Natural Killer (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, *por exemplo*, em um modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:652-656 (1998). Os ensaios de ligação a C1q também podem ser realizados para confirmar que o anticorpo é incapaz de se ligar a C1q e, portanto, não possui atividade CDC. Vide, *por exemplo*, ELISA de ligação a C1q e C3c em WO 2006/029879 e WO 2005/100402. Para avaliar a ativação de complemento, um ensaio de CDC pode ser realizado (vide, *por exemplo*, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996); Cragg, MS et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); e Cragg, MS e MJ Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). A ligação a FcRn e as determinações de eliminação/meia-vida *in vivo* também podem ser realizadas usando métodos conhecidos na técnica

(vide, por exemplo, Petkova, SB et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)). Em certas modalidades, as alterações podem ser feitas na região Fc que resulta na ligação a C1q alterada (*ou seja*, melhorada ou diminuída) e/ou Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC), *por exemplo*, conforme descrito na Patente dos EUA de nº 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

[000205] Anticorpos com função efetora reduzida incluem aqueles com substituição de um ou mais dos resíduos da região Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 e 329 (Patente dos EUA de nº 6.737.056). Tais mutantes Fc incluem mutantes Fc com substituições em duas ou mais posições de aminoácidos 265, 269, 270, 297 e 327, incluindo o denominado mutante Fc "DANA" com substituição dos resíduos 265 e 297 por alanina (Patente dos EUA de nº 7.332.581).

[000206] Certas variantes de anticorpo com ligação melhorada ou diminuída a FcRs são descritas. *Vide, por exemplo*, Patente dos EUA de nº 6.737.056; WO 2004/056312, e Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 9(2):6591-6604 (2001).

[000207] Em certas modalidades, as variantes de anticorpo da presente divulgação compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições de aminoácidos que melhoram ADCC, *por exemplo*, substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração da UE de resíduos).

[000208] Em certas modalidades, a alteração feita na região Fc de um anticorpo, *por exemplo*, um anticorpo biespecífico, divulgado aqui, pode produzir um anticorpo variante com meia-vida aumentada e ligação melhorada ao receptor Fc neonatal (FcRn), que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), são descritos em US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esses anticorpos compreendem uma região

Fc com uma ou mais substituições na mesma, o que melhora a ligação da região Fc a FcRn. Tais variantes Fc incluem aquelas com substituições em um ou mais dos resíduos da região Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ou 434, por exemplo, substituição de resíduo 434 da região Fc (Patente dos EUA de nº 7.371.826).

[000209] *Vide também Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); Patente dos EUA de nº 5.648.260; Patente dos EUA de nº 5.624.821; e WO 94/29351 relativo a outros exemplos de variantes da região Fc.*

d) VARIANTES DE ANTICORPO MANIPULADAS COM CISTEÍNA

[000210] Em certas modalidades, pode ser desejável criar anticorpos projetados com cisteína, *por exemplo*, "tioMAbs", em que um ou mais resíduos de um anticorpo são substituídos por resíduos de cisteína. Em modalidades particulares, os resíduos substituídos ocorrem em locais acessíveis do anticorpo. Ao substituir esses resíduos por cisteína, os grupos tiol reativos são posicionados em locais acessíveis do anticorpo e podem ser usados para conjugar o anticorpo a outras frações, tais como frações de fármaco ou frações de ligante-fármaco, para criar um imunoconjugado, conforme descrito mais adiante neste documento. Em certas modalidades, qualquer um ou mais dos seguintes resíduos podem ser substituídos por cisteína: V205 (numeração de Kabat) de cadeia leve; A118 (numeração da UE) de cadeia pesada; e S400 (numeração da UE) da região Fc de cadeia pesada. Os anticorpos projetados com cisteína podem ser gerados conforme descrito, *por exemplo*, na Patente dos EUA de nº 7.521.541.

e) DERIVADOS DE ANTICORPO

[000211] Em certas modalidades, os anticorpos da presente divulgação podem ser ainda modificados para conter frações não proteicas adicionais que são conhecidas na técnica e prontamente disponíveis. As

frações adequadas para derivatização do anticorpo incluem, mas não estão limitadas a, polímeros solúveis em água. Exemplos não limitantes de polímeros solúveis em água incluem, mas não estão limitados a, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etilenoglicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros ou copolímeros aleatórios) e dextrano ou poli(n-vinil pirrolidona) polietilenoglicol, homopolímeros de propilenoglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polióis polioxiethylados (*por exemplo*, glicerol), álcool polivinílico e misturas dos mesmos. O propionaldeído de polietilenoglicol pode apresentar vantagens na fabricação devido à sua estabilidade em água. O polímero pode ter qualquer peso molecular e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligados ao anticorpo pode variar, e se mais de um polímero estiver ligado, eles podem ser moléculas iguais ou diferentes. Em geral, o número e/ou tipo de polímeros usados para derivatização pode ser determinado com base em considerações, incluindo, mas não se limitando a, as propriedades ou funções particulares do anticorpo a serem melhoradas, se o derivado de anticorpo será usado em uma terapia sob condições definidas, etc.

[000212] Em certas modalidades, são fornecidos conjugados de um anticorpo e fração não proteica que podem ser seletivamente aquecidos por exposição à radiação. Em uma modalidade, a fração não proteica é um nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11600-11605 (2005)). Em certas modalidades, a radiação pode ser de qualquer comprimento de onda e inclui, mas não está limitada a, comprimentos de onda que não prejudicam as células comuns, mas que aquecem a fração não proteica a uma temperatura na qual as células próximas à fração não proteica do anticorpo são mortas.

B. MÉTODOS PARA PRODUZIR ANTICORPOS

[000213] Os anticorpos divulgados aqui podem ser produzidos usando qualquer técnica disponível ou conhecida na técnica. Por exemplo, mas não como forma de limitação, os anticorpos podem ser produzidos usando métodos e composições recombinantes, *por exemplo*, como descrito na Patente dos EUA de nº 4.816.567. Os procedimentos detalhados para gerar anticorpos são descritos nos Exemplos abaixo.

[000214] A matéria presentemente divulgada fornece ainda um ácido nucleico isolado que codifica um anticorpo divulgado neste documento. Por exemplo, o ácido nucleico isolado pode codificar uma sequência de aminoácidos que inclui a VL e/ou uma sequência de aminoácidos compreendendo a VH do anticorpo, *por exemplo*, as cadeias leve e/ou pesada do anticorpo. Em certas modalidades, o ácido nucleico isolado pode incluir uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 54 e/ou uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 50. Em certas modalidades, o ácido nucleico isolado pode incluir uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 57 e/ou uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 53.

[000215] Em certas modalidades, o ácido nucleico pode estar presente em um ou mais vetores, *por exemplo*, vetores de expressão. Conforme usado neste documento, o termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que refere-se a uma alça de DNA de fita dupla circular na qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro

tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (*por exemplo*, vetores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vetores epissomais de mamíferos). Outros vetores (*por exemplo*, vetores de mamíferos não epissômicos) são integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e, portanto, são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores, vetores de expressão, são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão operacionalmente ligados. Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos (vetores). No entanto, a matéria divulgada se destina a incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (*por exemplo*, retrovírus com replicação defeituosa, adenovírus e vírus adeno-associados) que servem a funções equivalentes.

[000216] Em certas modalidades, o ácido nucleico que codifica um anticorpo da presente divulgação e/ou um ou mais vetores, incluindo o ácido nucleico, pode ser introduzido em uma célula hospedeira. Em certas modalidades, a introdução de um ácido nucleico em uma célula pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a, transfecção, eletroporação, microinjeção, infecção com um vetor viral ou bacteriófago contendo as sequências de ácido nucleico, fusão de células, transferência de genes mediada por cromossomos, transferência de genes mediada por microcélulas, fusão de esferoplastos, etc. Em certas modalidades, uma célula hospedeira, *por exemplo*, foi transformada com: (1) um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos que compreende a VL do anticorpo e uma sequência de aminoácidos que compreende a VH do anticorpo, ou (2) um primeiro vetor

compreendendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos compreendendo a VL do anticorpo e um segundo vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos compreendendo a VH do anticorpo. Em certas modalidades, a célula hospedeira é eucariótica, *por exemplo*, uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou célula linfóide (*por exemplo*, célula Y0, NS0, Sp20).

[000217] Em certas modalidades, os métodos de produção de um anticorpo anti-FGF21 divulgado podem incluir a cultura de uma célula hospedeira, na qual um ácido nucleico que codifica o anticorpo foi introduzido, sob condições adequadas para a expressão do anticorpo e, opcionalmente, a recuperação do anticorpo da célula hospedeira e/ou meio de cultura da célula hospedeira. Em certas modalidades, o anticorpo é recuperado da célula hospedeira por meio de técnicas de cromatografia.

[000218] Para a produção recombinante de um anticorpo da presente divulgação, um ácido nucleico que codifica um anticorpo, *por exemplo*, como descrito acima, pode ser isolado e inserido em um ou mais vetores para posterior clonagem e/ou expressão em uma célula hospedeira. Tal ácido nucleico pode ser facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (*por exemplo*, usando sondas de oligonucleotídeos que são capazes de especificamente se ligarem a genes que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo).

[000219] As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão de vetores que codificam anticorpos incluem células procarióticas ou eucarióticas descritas aqui. Por exemplo, os anticorpos podem ser produzidos em bactérias, em particular, quando a glicosilação e a função efetora de Fc não são necessárias. Para a expressão de fragmentos de anticorpos e polipeptídeos em bactérias, *vide, por exemplo*, Patentes dos EUA de nº 5.648.237, 5.789.199 e 5.840.523. (*Vide também* Charlton, *Methods in*

Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, descrevendo a expressão de fragmentos de anticorpo em *E. coli*). Após a expressão, o anticorpo pode ser isolado da pasta de células bacterianas em uma fração solúvel e pode ser posteriormente purificado.

[000220] Além de procariotas, micróbios eucarióticos, tais como fungos filamentosos ou leveduras, são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vetores que codificam anticorpos, incluindo estirpes de fungos e leveduras cujas vias de glicosilação foram "humanizadas", resultando na produção de um anticorpo com um padrão de glicosilação totalmente ou parcialmente humano. *Vide* Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); e Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006). As células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos glicosilados também podem ser derivadas de organismos multicelulares (invertebrados e vertebrados). Exemplos de células de invertebrados incluem células vegetais e de insetos. Numerosas estirpes de baculovirais foram identificadas, as quais podem ser usadas em conjunto com células de inseto, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

[000221] As células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos glicosilados também são derivadas de organismos multicelulares (invertebrados e vertebrados). Exemplos de células de invertebrados incluem células vegetais e de insetos. Numerosas estirpes de baculovirais foram identificadas, as quais podem ser usadas em conjunto com células de inseto, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

[000222] Em certas modalidades, as culturas de células vegetais podem ser usadas como células hospedeiras. *Vide, por exemplo*, as Patentes dos EUA de nºs US 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 e 6.417.429 (descrevendo a tecnologia PLANTIBODIES™ para produzir

anticorpos em plantas transgênicas).

[000223] Em certas modalidades, as células de vertebrados também podem ser usadas como hospedeiros. Por exemplo, as linhagens celulares de mamíferos que são adaptadas para crescer em suspensão podem ser úteis. Os exemplos não limitantes de linhagens celulares hospedeiras de mamíferos úteis são a linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7); linhagem de rim embrionário humano (células 293 ou 293, como descrito, *por exemplo*, em Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK); células de Sertoli de camundongo (células TM4, conforme descrito, *por exemplo*, em Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1); células de rim de macaco verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células renais caninas (MDCK; células de fígado de rato búfalo (BRL 3A); células de pulmão humano (W138); células de fígado humano (Hep G2); tumor mamário de camundongo (MMT 060562); células TRI, conforme descrito, *por exemplo*, em Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; e células FS4. Outras linhagens celulares hospedeiras de mamíferos úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), incluindo células DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 77:4216 (1980)); e linhagens celulares de mieloma, tais como Y0, NS0 e Sp2/0. Para uma revisão de certas linhagens celulares hospedeiras de mamíferos adequadas para a produção de anticorpos, *vide, por exemplo*, Yazaki, P. e Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

[000224] Em certas modalidades, as técnicas para a produção de anticorpos biespecíficos e/ou multiespecíficos incluem, mas não estão limitadas a, coexpressão recombinante de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina tendo especificidades diferentes (*vide* Milstein e

Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), Pedido de Patente PCT de nº WO 93/08829, e Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), e engenharia de "nob-in-hole" (*vide, por exemplo*, Patente dos EUA de nº 5.731.168). Os anticorpos biespecíficos também podem ser produzidos por engenharia de efeitos de direção eletrostática para a produção de moléculas heterodiméricas de Fc de anticorpo (WO 2009/089004A1); reticulação de dois ou mais anticorpos ou fragmentos (*vide, por exemplo*, Patente dos EUA de nº 4.676.980 e Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)); uso de zíperes de leucina para produzir anticorpos biespecíficos (*vide, por exemplo*, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); uso de tecnologia de "diacorpo" para fazer fragmentos de anticorpos biespecíficos (*vide, por exemplo*, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); uso de dímeros Fv (sFv) de cadeia simples (*vide, por exemplo*, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); e preparação de anticorpos triespecíficos como descrito, *por exemplo*, em Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

[000225] Moléculas biespecíficas e multiespecíficas da presente divulgação também podem ser feitas usando técnicas químicas (*vide, por exemplo*, Kranz (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807), técnicas de "polidoma" (*vide, por exemplo*, Patente dos EUA de nº 4.474.893) ou técnicas de DNA recombinante. Moléculas biespecíficas e multiespecíficas da matéria presentemente divulgada também podem ser preparadas conjugando as especificidades de ligação a constituintes, *por exemplo*, especificidades de ligação a um primeiro epítipo e a um segundo epítipo, usando métodos conhecidos na técnica e como descritos aqui. Por exemplo, mas não a título de limitação, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica e multiespecífica pode ser gerada separadamente e, em seguida, conjugada entre si. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação pode ser usada para

a conjugação covalente. Exemplos não limitantes de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodi-imida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) e 4-(N-maleimidometil)ciclohaxano-1-carboxilato de sulfosuccinimidila (sulfo-SMCC) (*vide, por exemplo*, Karpovsky (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu (1985) *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos por Paulus (*Behring Ins. Mitt.* (1985) No. 78, 118-132; Brennan (1985) *Science* 229:81-83), Glennie (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). Quando as especificidades de ligação são anticorpos (*por exemplo*, dois anticorpos humanizados), elas podem ser conjugadas via ligação sulfidríla das regiões de dobradiça do terminal C das duas cadeias pesadas. Em certas modalidades, a região de dobradiça pode ser modificada para conter um número ímpar de resíduos sulfidríla, *por exemplo*, um, antes da conjugação.

[000226] Em certas modalidades, ambas as especificidades de ligação de um anticorpo biespecífico podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente útil quando a molécula biespecífica e multiespecífica é uma proteína de fusão MAb x MAb, MAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x Fab. Em certas modalidades, um anticorpo biespecífico da presente divulgação pode ser uma molécula de cadeia única, tal como um anticorpo biespecífico de cadeia única, uma molécula biespecífica de cadeia única compreendendo um anticorpo de cadeia única e um determinante de ligação ou uma molécula biespecífica de cadeia única compreendendo dois determinantes de ligação. Moléculas biespecíficas e multiespecíficas também podem ser moléculas de cadeia única ou podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Os métodos para a preparação de moléculas bi e multiespecíficas são descritos, por exemplo, na Patente dos EUA de nº 5.260.203; Patente dos EUA de nº 5.455.030; Patente dos EUA de nº 4,881,175; Patente dos EUA de nº

5.132.405; Patente dos EUA de nº 5.091.513; Patente dos EUA de nº 5,476,786; Patente dos EUA de nº 5.013.653; Patente dos EUA de nº 5.258.498; e Patente dos EUA de nº 5.482.858. Anticorpos projetados com três ou mais locais de ligação ao antígeno funcionais (*por exemplo*, locais de ligação ao epítipo), incluindo "anticorpos de Polvo", também estão incluídos aqui (vide, *por exemplo*, US 2006/0025576A1).

[000227] Em certas modalidades, um sistema animal pode ser usado para produzir um anticorpo da presente divulgação. Um sistema animal para a preparação de hibridomas é o sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de fusão (*por exemplo*, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos (vide, *por exemplo*, Harlow e Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

C. ENSAIOS DE COMPETIÇÃO DE LIGAÇÃO

[000228] Os anticorpos anti-FGF21 da presente divulgação fornecidos neste documento podem ser identificados, rastreados ou distinguidos por suas propriedades físicas/químicas e/ou atividades biológicas por vários ensaios conhecidos na técnica e fornecidos aqui.

1. ENSAIOS DE LIGAÇÃO E OUTROS ENSAIOS

[000229] Um anticorpo da presente divulgação pode ser testado quanto à sua atividade de ligação ao antígeno por métodos conhecidos, tal como ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), um radioimunoensaio (RIA) ou um ensaio de Western Blot. Cada um desses ensaios geralmente detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de particular interesse, empregando um reagente marcado (*por exemplo*, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os

complexos de anticorpo-FGF21 podem ser detectados usando, *por exemplo*, um anticorpo ligado a enzima ou fragmento de anticorpo que reconhece e especificamente se liga aos complexos de anticorpo-FGF21. Alternativamente, os complexos podem ser detectados usando qualquer um de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado radioativamente e usado em um radioimunoensaio (RIA) (*vide, por exemplo*, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, março de 1986, que é incorporado aqui por referência). O isótopo radioativo pode ser detectado por tais meios como o uso de um contador Geiger ou um contador de cintilação ou por autorradiografia.

[000230] Em certas modalidades, os ensaios de competição podem ser usados para identificar um anticorpo que compete com um anticorpo anti-FGF21 da presente divulgação, *por exemplo*, mAb4 ou mAb15, para ligação a FGF21. Em certas modalidades, tal anticorpo competidor se liga ao mesmo epítopo (*por exemplo*, um epítopo linear ou conformacional) que é ligado por mAb4 ou mAb15. Métodos exemplares detalhados para mapear um epítopo ao qual um anticorpo se liga são fornecidos em Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," em *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

[000231] Em um exemplo não limitante de um ensaio de competição, o FGF21 imobilizado pode ser incubado em uma solução compreendendo um primeiro anticorpo marcado que se liga a FGF21 (*por exemplo*, mAb4 ou mAb15) e um segundo anticorpo não marcado que está sendo testado quanto à sua capacidade de competir com o primeiro anticorpo para ligação a FGF21. O segundo anticorpo pode estar presente em um sobrenadante de hibridoma. Como controle, o FGF21 imobilizado é incubado em uma solução que compreende o primeiro anticorpo marcado, mas não o

segundo anticorpo não marcado. Após a incubação sob condições permissivas para a ligação do primeiro anticorpo a FGF21, o excesso de anticorpo não ligado é removido e a quantidade de marcador associada a FGF21 imobilizado é medida. Se a quantidade de marcador associada a FGF21 imobilizado for substancialmente reduzida na amostra de teste em relação à amostra de controle, então isso indica que o segundo anticorpo está competindo com o primeiro anticorpo pela ligação a FGF21. *Vide Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

D. IMUNOCONJUGADOS

[000232] A matéria presentemente divulgada fornece ainda imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado a um ou mais agentes citotóxicos, tais como agentes quimioterápicos ou fármacos, agentes inibidores de crescimento, toxinas (*por exemplo*, toxinas de proteínas, toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos das mesmas) ou isótopos radioativos. Por exemplo, um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno da matéria divulgada pode ser funcionalmente ligado (*por exemplo*, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou por outra forma) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação.

[000233] Em um exemplo, um imunoconjugado é um conjugado anticorpo-fármaco (ADC) no qual um anticorpo é conjugado a um ou mais fármacos, incluindo, mas não se limitando a, um maitansinóide (*vide* Patentes dos EUA de nºs 5.208.020, 5.416.064 e Patente Europeia EP 0 425 235); uma auristatina, tal como frações de fármacos DE e DF de monometilauristatina (MMAE e MMAF) (*vide* Patentes dos EUA de nºs 5.635.483 e 5.780.588, e 7.498.298); uma dolastatina; uma caliqueamicina ou

derivado da mesma (vide Patentes dos EUA de nºs 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 e 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); e Lode et al., *Cancer Res.*, 58:2925-2928 (1998)); uma antraciclina, tal como daunomicina ou doxorubicina (vide 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. Letters*, 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.*, 45:4336-4343 (2002); e Patente dos EUA de nº 6.630.579); metotrexato; vindesina; um taxano, tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel e ortataxel; um tricoteceno; e CC1065.

[000234] Em certas modalidades, um imunoconjugado compreende um anticorpo como descrito aqui conjugado a uma toxina enzimaticamente ativa ou fragmento da mesma, incluindo, mas não se limitando a, cadeia A da difteria, fragmentos ativos não vinculativos da toxina da difteria, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A da ricina, cadeia A de abrina, cadeia A da modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas dianthin, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor da momordica charantia, curcina, crotina, inibidor da sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos.

[000235] Em certas modalidades, um imunoconjugado compreende um anticorpo como descrito aqui conjugado a um átomo radioativo para formar um radioconjugado. Uma variedade de isótopos radioativos está disponível para a produção de radioconjugados. Os exemplos incluem At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioativos de Lu. Quando o radioconjugado é usado para detecção, ele pode incluir um átomo radioativo para estudos cintilográficos, por exemplo, tc99m ou I^{123} , ou um

marcador de rotação para imagem por ressonância magnética nuclear (NMR) (também conhecida como imagem por ressonância magnética, mri), tal como iodo -123, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, nitrogênio-15, oxigênio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

[000236] Os conjugados de um anticorpo e agente citotóxico podem ser feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncional, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometil) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como HCl de adipimidato de dimetila), ésteres ativos (tais como suberato de disuccinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como hexanodiamina de bis(p-azidobenzoil)), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazôniobenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada conforme descrito em Vitetta et al., *Science*, 238:1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminapenta-acético marcado com carbono 14 (MX-DTPA) é um agente quelante exemplar para a conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. *Vide* WO94/11026. O ligante pode ser um "ligante clivável" facilitando a liberação de um fármaco citotóxico na célula. Por exemplo, um ligante lábil a ácidos, ligante sensível a peptidase, ligante fotolábil, ligante dimetílico ou ligante contendo dissulfeto (Chari et al., *Cancer Res.*, 52:127-131 (1992); Patente dos EUA de nº 5.208.020) podem ser usados.

[000237] Os imunuoconjugados divulgados neste documento expressamente contemplam, mas não estão limitados a, tais conjugados preparados com reagentes de reticulação incluindo, mas não se limitando a, 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, and sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que estão comercialmente disponíveis (*por exemplo*, da Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EUA).

IV. Kits

[000238] A matéria presentemente divulgada fornece ainda kits contendo materiais úteis para realizar os imunoensaios divulgados aqui. Em certas modalidades, o kit inclui um recipiente contendo um anticorpo anti-FGF21 divulgado neste documento. Exemplos não limitantes de recipientes adequados incluem garrafas, tubos de ensaio, frascos e placas de microtitulação. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. Em certas modalidades, o kit inclui ainda uma bula que fornece instruções para o uso do anticorpo anti-FGF21 nos métodos de imunoensaio divulgados.

[000239] Em certas modalidades, o kit pode incluir um ou mais recipientes contendo um ou mais anticorpos anti-FGF21. Exemplos não limitantes de anticorpos anti-FGF21 são divulgados nas Tabelas 8-13 e 16-19 e Figura 41A e B. Por exemplo, mas não como limitação, o kit pode incluir pelo menos um recipiente que inclui um anticorpo de captura anti-FGF21 e pelo menos um recipiente que inclui um anticorpo detector anti-FGF21.

[000240] Em certas modalidades, um kit para detectar a proteína FGF21 total em uma amostra inclui um primeiro recipiente contendo um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, um segundo recipiente contendo um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e um terceiro recipiente contendo um agente de detecção.

[000241] Em certas modalidades, um kit para detectar a proteína FGF21 ativa em uma amostra inclui um primeiro recipiente contendo

um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, um segundo recipiente contendo um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21 e um terceiro recipiente contendo um agente de detecção.

[000242] Em certas modalidades, um kit para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra inclui um primeiro recipiente contendo um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, um segundo recipiente contendo um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, um terceiro recipiente contendo um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21, um quarto recipiente contendo um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21 e um quinto recipiente contendo um agente de detecção. Em certas modalidades, o primeiro e o segundo anticorpos de captura são o mesmo anticorpo e podem ser fornecidos em um único recipiente. Alternativamente, o primeiro e o segundo anticorpos de captura são anticorpos diferentes e podem ser fornecidos em recipientes separados.

[000243] Em certas modalidades, o anticorpo de captura e/ou o anticorpo detector podem ser fornecidos em um kit da presente divulgação a uma concentração de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 5,0 µg/ml. Em certas modalidades, o anticorpo detector pode ser marcado, *por exemplo*, com biotina.

[000244] Em certas modalidades, o agente de detecção fornecido em um kit da presente divulgação pode ser avidina, estreptavidina-HRP ou estreptavidina-β-D-galactopiranosse (SBG). Em certas modalidades, um kit da presente divulgação pode incluir ainda tetrametilbenzidina, peróxido de

hidrogênio e/ou resorufina β -D-galactopiranosídeo. Em certas modalidades, se o kit inclui estreptavidina-HRP, então o kit pode incluir ainda tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. Em certas modalidades, se o kit inclui SBG, então o kit pode incluir ainda resorufina β -D-galactopiranosídeo. Em certas modalidades, a SBG pode ser fornecida em um kit a uma concentração de cerca de 100 pM a cerca de 400 pM.

[000245] Em certas modalidades, o anticorpo de captura pode ser fornecido ligado à superfície de suporte sólido, tal como, por exemplo, mas não se limitando a, uma placa ou esfera, *por exemplo*, uma esfera paramagnética. Alternativamente ou adicionalmente, o kit pode incluir ainda uma superfície de suporte sólido que pode ser acoplada ao anticorpo de captura. Em certas modalidades, o suporte sólido pode ser esferas paramagnéticas e pode ser fornecido em uma concentração de cerca de $0,1 \times 10^7$ esferas/ml a cerca de $10,0 \times 10^7$ esferas/ml.

[000246] Alternativamente ou adicionalmente, o kit pode incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes e filtros. Em certas modalidades, o kit pode incluir materiais para coleta e/ou processamento de amostras de sangue.

V. MODALIDADES EXEMPLARES

[000247] A. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um método de imunoensaio para determinar a quantidade de proteína FGF21 total em uma amostra que compreende:

(a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra;

(b) colocar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um

epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e

(d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

[000248] A1. O método de imunoensaio anterior de acordo com A, em que o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[000249] B. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um método de imunoensaio para determinar a quantidade de proteína FGF21 ativa em uma amostra que compreende:

(a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra;

(b) contatar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21;

(c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e

(d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

[000250] C. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um método de imunoensaio para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra que compreende:

(a) (i) colocar um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em

contato com a amostra para gerar um primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (ii) colocar o primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21; (iii) detectar o primeiro anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do primeiro anticorpo detector ligado;

(b) (i) colocar um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (ii) colocar o segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; (iii) detectar o segundo anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do segundo anticorpo detector ligado; e

(c) comparar a quantidade de proteína FGF21 total conforme determinado pela etapa (a) com a quantidade de proteína FGF21 ativa conforme determinado pela etapa (b) para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total na amostra.

[000251] C1. O método de imunoensaio anterior de acordo com C, em que o primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura são o mesmo anticorpo.

[000252] C2. O método de imunoensaio anterior de acordo com C, em que o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de

FGF21.

[000253] C3. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C2, em que o imunoensaio é um ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).

[000254] C4. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C3, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura são imobilizados em uma esfera paramagnética.

[000255] C5. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C4, em que um ou mais do anticorpo detector, primeiro anticorpo detector e segundo anticorpo detector são conjugados com biotina.

[000256] C6. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C5, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura se ligam a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

[000257] C7. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A e C-C6, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector se ligam a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

[000258] C8. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C7, em que a amostra é uma amostra de sangue.

[000259] C9. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C7, em que a amostra é uma amostra de plasma.

[000260] C10. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C9, em que o método detecta a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 2 pg/ml a cerca de 20 pg/ml.

[000261] C11. O método de imunoensaio anterior de acordo

com qualquer uma de A-C9, em que o método de imunoensaio é realizado usando um instrumento de detecção de molécula única.

[000262] C12. O método de imunoensaio anterior de acordo com C11, em que o instrumento de detecção de molécula única é o Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™.

[000263] C13. O método de imunoensaio anterior de acordo com C11 e C12, em que o método detecta a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

[000264] C14. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C13, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3

compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

[000265] C15. O imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C13, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54, 55, 74 e 75, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 50, 51, 70 e 71, e suas substituições conservativas.

[000266] C16. O imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C13, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22, 23, 66 e 67, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 18, 19, 62 e 63, e suas substituições conservativas.

[000267] C17. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A e C-C13, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo

que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

[000268] C18. O imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A e C-C13, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56, 57, 72 e 73, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52, 53, 68 e 69, e suas substituições conservativas.

[000269] C19. O imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A e C-C13, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 24, 25, 64 e 65, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 20, 21, 60 e 61, e suas substituições conservativas.

[000270] C20. O método de imunoensaio anterior de acordo com C14, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, e suas substituições conservativas.

[000271] C21. O método de imunoensaio anterior de acordo com C20, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e suas substituições conservativas.

[000272] C22. O método de imunoensaio anterior de acordo com C21, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e suas substituições conservativas.

[000273] C23. O método de imunoensaio anterior de acordo com C17, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e suas substituições conservativas.

[000274] C24. O método de imunoensaio anterior de acordo com C23, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e suas substituições conservativas.

[000275] C25. O método de imunoensaio anterior de acordo com C24, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e suas substituições conservativas.

[000276] C26. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A-C13, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura se ligam competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

[000277] C27. O método de imunoensaio anterior de acordo com qualquer uma de A e C-C13, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector se ligam competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

[000278] D. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um kit para detectar a proteína FGF21 total em uma amostra que compreende:

(a) um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(b) um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21; e

(c) um agente de detecção.

[000279] D1. O kit anterior de acordo com D, em que o anticorpo de captura e o anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[000280] E. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um kit para detectar a proteína FGF21 ativa em uma amostra que compreende:

(a) um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(b) um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; e

(c) um agente de detecção.

[000281] F. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um kit para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra que compreende:

(a) (i) um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e (ii) um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(b) (i) um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e (ii) um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; e

(c) um ou mais agentes de detecção.

[000282] F1. O kit anterior de acordo com F, em que o primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura são o mesmo anticorpo.

[000283] F2. O kit anterior de acordo com F, em que o primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector se ligam a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

[000284] F3. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F2, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura são imobilizados em uma esfera paramagnética.

[000285] F4. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F3, em que um ou mais do anticorpo detector, primeiro anticorpo detector e segundo anticorpo detector são conjugados com biotina.

[000286] F5. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F4, em que o agente de detecção é selecionado a partir do grupo que

consiste em um conjugado de estreptavidina- β -D-galactopiranosose, um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano e uma combinação dos mesmos.

[000287] F6. O kit anterior de acordo com F5 compreendendo ainda resorufina β -D-galactopiranosídeo, tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio ou combinações dos mesmos.

[000288] F7. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F6, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura se ligam a FGF21 com uma Kd de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

[000289] F8. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D e F-F7, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector se ligam a FGF21 com uma Kd de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

[000290] F9. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D e F-F8, em que o anticorpo detector ou primeiro anticorpo detector tem uma concentração de cerca de 0,1 μ g/ml a cerca de 1 μ g/ml.

[000291] F10. O kit anterior de acordo com qualquer uma de E-F7, em que um ou mais do anticorpo detector ou segundo anticorpo detector tem uma concentração de cerca de 1 μ g/ml a cerca de 3 μ g/ml.

[000292] F11. O kit anterior de acordo com F5, em que o conjugado de estreptavidina- β -D-galactopiranosose tem uma concentração de cerca de 100 pM a cerca de 400 pM.

[000293] F12. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F11, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

[000294] F13. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F11, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54, 55, 74 e 75, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 50, 51, 70 e 71, e suas substituições conservativas.

[000295] F14. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F11, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de

aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 22, 23, 66 e 67, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 18, 19, 62 e 63, e suas substituições conservativas.

[000296] F15. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D e F-F11, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

[000297] F16. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D e F-F11, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo

detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56, 57, 72 e 73, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52, 53, 68 e 69, e suas substituições conservativas.

[000298] F17. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D e F-F11, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 24, 25, 64 e 65, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 20, 21, 60 e 61, e suas substituições conservativas.

[000299] F18. O kit anterior de acordo com F12, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, e suas substituições conservativas.

[000300] F19. O kit anterior de acordo com F18, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e suas substituições conservativas.

[000301] F20. O kit anterior de acordo com F19, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e suas substituições conservativas.

[000302] F21. O kit anterior de acordo com F15, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e suas substituições conservativas.

[000303] F22. O kit anterior de acordo com F21, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e suas substituições conservativas.

[000304] F23. O kit anterior de acordo com F22, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreendem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO: 25, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e suas substituições conservativas.

[000305] F24. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F11, em que um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura se ligam competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

[000306] F25. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D e F-F11, em que um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector se ligam competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

[000307] F26. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F25, em que a amostra é uma amostra de sangue.

[000308] F27. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F25, em que a amostra é uma amostra de plasma.

[000309] F28. O kit anterior de acordo com qualquer uma de D-F27, em que o kit detecta a quantidade de proteína FGF21 ativa ou total na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

[000310] G. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um anticorpo anti-FGF21 isolado, ou

uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26-29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30-33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34-37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38-41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42-45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46-49, e suas substituições conservativas.

[000311] G1. O anticorpo isolado anterior de acordo com G, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, e suas substituições conservativas.

[000312] G2. O anticorpo isolado anterior de acordo com G, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47, e suas substituições conservativas.

[000313] G3. O anticorpo isolado anterior de acordo com G, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 40, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia CDR3 leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48, e suas substituições conservativas.

[000314] G4. O anticorpo isolado anterior de acordo com G, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo,

compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e suas substituições conservativas.

[000315] G5. O anticorpo isolado anterior de acordo com G1, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e suas substituições conservativas.

[000316] G6. O anticorpo isolado anterior de acordo com G2, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 55, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 51, e suas substituições conservativas.

[000317] G7. O anticorpo isolado anterior de acordo com G3, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 56, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 52 e suas substituições conservativas.

[000318] G8. O anticorpo isolado anterior de acordo com G4, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e suas substituições conservativas.

[000319] G9. O anticorpo isolado anterior de acordo com

G1, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71, e suas substituições conservativas.

[000320] G10. O anticorpo isolado anterior de acordo com G2, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70, e suas substituições conservativas.

[000321] G11. O anticorpo isolado anterior de acordo com G3, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69, e suas substituições conservativas.

[000322] G12. O anticorpo isolado anterior de acordo com G4, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo,

compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 68, e suas substituições conservativas.

[000323] G13. O anticorpo isolado anterior de acordo com G5, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e suas substituições conservativas.

[000324] G14. O anticorpo isolado anterior de acordo com G6, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 19, e suas substituições conservativas.

[000325] G15. O anticorpo isolado anterior de acordo com G7, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20, e suas substituições conservativas.

[000326] G16. O anticorpo isolado anterior de acordo com G8, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e suas substituições conservativas.

[000327] G17. O anticorpo isolado anterior de acordo com G9, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 67, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63, e suas substituições conservativas.

[000328] G18. O anticorpo isolado anterior de acordo com G10, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 62, e suas substituições conservativas.

[000329] G19. O anticorpo isolado anterior de acordo com G11, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 65, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61, e suas substituições conservativas.

[000330] G20. O anticorpo isolado anterior de acordo com G12, em que o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 64, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 60, e suas substituições conservativas.

[000331] H. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um ácido nucleico isolado que codifica o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma de G-G20.

[000332] I. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico de H.

[000333] J. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece um método para produzir um anticorpo que compreende a cultura da célula hospedeira de I de modo que o anticorpo seja produzido.

[000334] J1. O método anterior de acordo com J, compreendendo ainda recuperar o anticorpo da célula hospedeira.

[000335] K. Em certas modalidades não limitantes, a matéria presentemente divulgada fornece uma composição compreendendo um ou mais anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos, de acordo com qualquer uma de G-G20.

EXEMPLOS

[000336] Os exemplos a seguir são meramente ilustrativos da matéria divulgada atualmente e não devem ser considerados como limitações de forma alguma.

EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-FGF21

[000337] Os anticorpos monoclonais foram gerados imunizando camundongos SJL e Balb/c com FGF21 humano recombinante. 80 sobrenadantes de hibridoma foram selecionados por ELISA (Figura 1). 20 hibridomas foram selecionados com base na ligação a FGF21 humano intacto (PUR 98271), FGF21 de cinomolgo intacto (PUR 98270) e FGF21 humano clivado (PUR 102247) gerada por digestão de FGF21 humano intacto por FAP humano.

EXEMPLO 2: DISTINÇÃO DO ANTICORPO ANTI-FGF21

[000338] As IgG obtidas a partir dos 20 hibridomas selecionados identificados no Exemplo 1 foram ainda distinguidas por ELISA. ELISA foi realizado da seguinte forma: A placa MaxiSorp de 96 poços (439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY) foi revestida com 1 µg/mL de anti-FGF21 mAbs ou anti-FGF21 pAbs de ovelha (nº Cat RD184108100, Biovendor, Asheville, NC) em tampão de revestimento (Carbonato de sódio a 50 mM, pH 9,6) durante a noite a 4°C. No dia seguinte, após o bloqueio com PBS contendo 0,5% de BSA e 10 ppm de ProClin, pH 7,4, e lavagem com o tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween 20, pH 7,2), a placa foi incubada com 0,00000186-2000 pg/mL de FGF21 humano intacto (comprimento total, FGF21 não clivado; nº Cat 2539-FG, R&D Systems) ou FGF21 humano clivado por FAP em tampão de ensaio (25 mM de HEPES, pH 7,2, 150 mM de NaCl, 0,2 mM de CaCl₂, 0,1% de albumina de soro bovino (BSA), 0,05% de Tween 20) por 1-2 h à temperatura ambiente. Após lavagem com o tampão de lavagem, a placa foi incubada com 0,5 µg/ml do anticorpo secundário (R&D Systems, anti-FGF21 pAb biotinilado de cabra BAF2539) por 1-2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão de lavagem, a placa foi incubada com estreptavidina-HRP de alta sensibilidade (PIERCE nº Cat 21130) diluída

1:1.000 em tampão de ensaio. Após lavagem com o tampão de lavagem, a ligação do anti-FGF21 ao FGF21 recombinante foi avaliada pela adição do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBE 1000, Moss; Pasadena, MD). Os valores médios de absorbância de poços duplicados foram plotados como uma função da concentração de anticorpos e os dados foram ajustados a uma equação de três parâmetros para calcular os valores de concentração efetiva máxima (EC_{50}) para cada anticorpo usando Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) (Tabela 2).

TABELA 2. VALORES DE EC_{50} PARA CADA ANTICORPO FGF21

Ab primário	Ab secundário	EC_{50} de FGF21 intacto (pg/ml)	EC_{50} de FGF21 clivado (pg/ml)	Razão de EC_{50} (Clivado/Intacto)
mAb1	anti-FGF21 pAb de cabra	126	228	1,8
mAb2	anti-FGF21 pAb de cabra	2108	3187	1,5
mAb3	anti-FGF21 pAb de cabra	292	450	1,5
mAb4	anti-FGF21 pAb de cabra	90	170	1,9
mAb5	anti-FGF21 pAb de cabra	5506	19331	3,5
mAb6	anti-FGF21 pAb de cabra	1993	4813	2,4
mAb7	anti-FGF21 pAb de cabra	8797	25403	2,9
mAb8	anti-FGF21 pAb de cabra	503	777	1,5
mAb9	anti-FGF21 pAb de cabra	855	1385	1,6

Ab primário	Ab secundário	EC₅₀ de FGF21 intacto (pg/ml)	EC₅₀ de FGF21 clivado (pg/ml)	Razão de EC₅₀ (Clivado/Intacto)
mAb10	anti-FGF21 pAb de cabra	136	249	1,8
mAb11	anti-FGF21 pAb de cabra	149	318	2,1
mAb12	anti-FGF21 pAb de cabra	5633	30386	5,4
mAb13	anti-FGF21 pAb de cabra	169	300	1,8
pAb de ovelha	anti-FGF21 pAb de cabra	48	84	1,7

[000339] Com base na detecção diferencial dos valores de FGF21 intacto versus clivado e valores de EC₅₀ absolutos, os anticorpos mAb5, mAb6, mAb7 e mAb12 foram excluídos de análises adicionais. Os anticorpos mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb8, mAb9, mAb10, mAb11, mAb13, mAb15 e mAb16 foram biotinilados usando o kit de biotilação de fase sólida NHS-PEG EZ-Link™ (PIERCE nº Cat 21450) e o ELISA sanduíche foi conduzido de uma maneira combinatória em pares usando FGF21 intacto (Tabelas 3 e 4). O anti-FGF21 pAb BAF2539 de cabra biotinilado (R&D Systems) foi usado como um controle positivo.

TABELA 3. COMPATIBILIDADE DE ANTI-FGF21 MABS EM ELISA SANDUÍCHE

	BIO-1	BIO-10	BIO-11	BIO-4	BIO-9	BIO-13	BIO-2	BIO-3	BIO-8	BAF2539
mAb1				XX	XX					XX
mAb10				XX	XX	X				XX
mAb11				XX	XX	X				XX
mAb4	XX	XX	XX							XX
mAb9	XX	XX	XX							XX
mAb13	X	X	X							XX
mAb8	XX	XX	XX	XX		X		X		XX

	BIO-1	BIO-10	BIO-11	BIO-4	BIO-9	BIO-13	BIO-2	BIO-3	BIO-8	BAF2539
mAb2										XX
mAb3										XX
pAb de ovelha										XX

XX: sinal forte com OD>1, X: sinal forte com OD<1

TABELA 4. COMPATIBILIDADE DE ANTI-FGF21 MABS EM ELISA SANDUÍCHE

	BIO-4	BIO-11	BIO-15	BIO-16
mAb4		XX	XX	X
mAb8	-	-	-	
mAb9		XX	XX	X
mAb11	XX		XX	
mAb15	XX	X		
mAb16	-			

XX: sinal forte com OD>1,5, X: sinal forte com 0,5<OD<1,5, -: OD<0,5 quando 653 pg/mL de FGF21 foi usado. O valor médio com FGF21 intacto e FGF21 clivado por FAP foi usado para gerar a tabela.

[000340] Com base nos resultados fornecidos na Tabela 3, os anticorpos mAb2, 3 e 13 foram excluídos de análises adicionais. Os resultados da Tabela 3 colocaram os anticorpos mAb1, 4, 8, 9, 10 e 11 em três bins de epítomos (Tabela 5).

TABELA 5. BINNING DE EPÍTOPO

Bin de Epítopo	mAb
1	1, 10, 11
2	4, 9
3	8

[000341] Os anticorpos mAb1, 4, 8, 9, 10 e 11 foram então testados em ELISA usando FGF21 humano intacto (nº Cat 2539-FG, R&D Systems) de uma maneira combinatória. Os valores de absorbância foram plotados como uma função da concentração de anticorpo e os dados foram ajustados a uma equação de três parâmetros para calcular os valores da

metade de concentração efetiva máxima (EC_{50}) para cada anticorpo usando Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) (Tabela 6). Como mostrado na Tabela 6, melhor potência foi observada quando os anticorpos mAb4 ou 9 foram usados como o anticorpo de captura e os anticorpos mAb10 ou 11 foram usados como o anticorpo detector para FGF21 humano intacto.

TABELA 6. VALORES DE EC_{50} COM VÁRIAS COMBINAÇÕES DE ANTI-FGF21 MAB EM

ELISA SANDUÍCHE

mAb de captura	mAb detector	EC_{50} (ng/ml)
4	10	108
4	11	133
9	11	156
9	10	161
11	4	161
10	4	172
8	10+4	182
10	9	191
4	1	193
11	9	195
8	11+4	198
8	1+4	202
1	4	222
8	4	228
8	10	237
9	1	249
8	11	303
8	1	308
1	9	323

[000342] Os anticorpos mAb4, 8, 9, 10, 11, 15 e 16 foram então testados em ELISA usando FGF21 humano intacto (nº Cat 2539-FG, R&D systems) ou o FGF21 humano clivado por FAP de uma maneira combinatória. Os valores de absorbância foram plotados como uma função da concentração de anticorpos e os dados foram ajustados a uma equação de três parâmetros para cada anticorpo usando Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La

Jolla, CA). O resultado mais consistente foi observado quando os anticorpos mAb4 ou 9 foram usados como o anticorpo de captura e os anticorpos mAb11 ou mAb15 foram usados como o anticorpo detector (Figura 2 e Tabela 7). Portanto, mAb8 e 16 foram removidos de análises adicionais. A Figura 2 mostra que os anticorpos se ligam igualmente ao FGF21 intacto e clivado por FAP (cFGF21), o que é importante para detectar a concentração de FGF21 total (*ou seja*, intacto e clivado por FAP).

TABELA 7. VALORES DE EC₅₀ COM VÁRIAS COMBINAÇÕES DE ANTI-FGF21 MAb EM

ELISA SANDUÍCHE

mAb de captura	mAb de detecção	EC ₅₀ (pg/ml) com FGF21 intacto	EC ₅₀ (pg/ml) com FGF21 clivado por FAP
9	11	165,8	156,3
4	11	194,7	148
11	4	204,5	203,8
4	15	232,1	262,6
9	15	431,4	362,6
15	4	536,8	561,7
11	15	774,4	630,1
4	16	1246	7044
15	11	1388	1239
9	16	1451	6234
16	4	4893	15750
8	11	40272	106195
8	15	42549	78857
8	4	44411	121300000

[000343] Os anticorpos mAb4, 9, 11 e 15 foram posteriormente analisados por ressonância de plasmon de superfície BIACORE® para determinar a K_d. Como mostrado na Figura 3, mAb4 tem uma K_d de 3,689 x 10¹⁰, mAb9 tem uma K_d de 8,895 x 10¹⁰, mAb11 tem uma K_d de 2,704 x 10¹⁰ e mAb15 tem uma K_d de 3,955 x 10¹².

EXEMPLO 3: ANÁLISE DE EPÍTOPO

[000344] O mapeamento de epítomos foi conduzido

expressando proteínas quiméricas FGF19, FGF21 ou FGF19-FGF21 como proteínas marcadas com FLAG em sobrenadante de cultura HEK293 transfectada transientemente e testando a ligação de anticorpos mAb4, 9, 11 e 15 por ELISA. Para ELISA, uma placa de 96 poços MaxiSorp (439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY) foi revestida com uma mistura de 15 µl de sobrenadante de cultura contendo proteína secretada e 135 µl de tampão de revestimento 1x (50 mM de carbonato de sódio, pH 9,6) durante a noite a 4 °C. Os anticorpos comerciais R5 e R9, que se ligam ao terminal C de FGF21, foram usados como controles positivos.

FGF19 HUMANO:

[000345] RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFL
RIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLL
QYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL
PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK
(SEQ ID NO: 2).

FGF21 HUMANO:

[000346] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIRED
GTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPE
ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
PALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 1).

**PROTEÍNAS QUIMÉRICAS FGF21-19 HUMANAS (A PORÇÃO DE FGF21 ESTÁ EM
ITÁLICO E A PORÇÃO DE FGF19 ESTÁ SUBLINHADA):**

[000347] *HPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFL*RIR
ADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQY
SEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPM
LPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ
ID NO: 3);

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRADGVVDCA
RGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLO YSEEDCAFE
EEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 4)
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGVVDCARGQSAHSL
LEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLO YSEEDCAFEEEEIRPDGYN
VYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 5);

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLO YSEEDCAFEE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPE
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 6);

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLEIKAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLO YSEEDCAFEE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPE
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 7);

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVH SVRYLCMGADGKMQGLLO YSEEDCAFE
EEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 8);

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCMGADGKMQGLLO YSEEDCAFEE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPE
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 9);

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 10);

RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
 GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACS
 FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALP
 EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 11);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIREDG
 TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEA
 CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
 ALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 12);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG
 TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEA
 CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
 ALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 13);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG
VVDCARGQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEA
 CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
 ALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 14);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG
VVDCARGQSAHSLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEA
 CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
 ALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 15);

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG
VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCQRPDGALYGSLHFDPEA
 CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP
 ALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 16); e

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG
VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEE
DCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPLPGL
 PPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 17).

[000348] Como mostrado na Figura 4, os anticorpos mAb4, 9, 11 e 15 se ligam às dobras do núcleo FGF de FGF21 humano e não se ligam às regiões flexíveis terminais N ou terminais C.

EXEMPLO 4: ENSAIO ELISA DE FGF21

[000349] A utilidade dos anticorpos mAb4 e 11 como anticorpos de captura na detecção de FGF21 intacto foi testada em combinação com um anti-FGF21 pAb específico terminal C (nº Cat 30661, Epitope Diagnostics, San Diego, CA; também referido aqui como “pAb C-ter”)) biotinilado usando o kit de biotinilação de fase sólida NHS-PEG EZ-Link™ (PIERCE #21450). Um diagrama esquemático dos imunoenaios para determinar os níveis de FGF21 total e FGF21 ativo é mostrado na Figura 5.

[000350] O ensaio ELISA foi realizado da seguinte forma: Uma placa MaxiSorp de 96 poços (nº Cat 439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY) foi revestida com 0,5 µg/mL de anti-FGF21 mAbs em tampão de revestimento (50 mM de carbonato de sódio, pH 9,6) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, após o bloqueio com PBS contendo 0,5% de BSA e 10 ppm de Proclin, pH 7,4, e lavagem com tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween 20, pH 7,2), a placa foi incubada com 0,0004-32000 pg/mL de FGF21 humano intacto (2539-FG, R&D systems) em tampão de ensaio (25 mM de HEPES, pH 7,2, 150 mM de NaCl, 0,2 mM de CaCl₂, albumina sérica bovina a 0,1% [BSA], Tween-20 a 0,05%) por 1-2 h à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão de lavagem, a placa foi incubada com 0,5 µg/ml do Ab secundário (anti-FGF21 pAb 30661 terminal C biotinilado ou anti-FGF21 mAb11 ou 15) em tampão Magic (1X PBS, pH 7,4, BSA a 0,5%, Tween 20 a 0,05%, BgG a 0,2%, CHAPS a 0,25%, 5 mM de EDTA, 0,35 M de NaCl, 10PPM de Proclin) por 1-2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão de lavagem, a placa foi incubada com estreptavidina-HRP de alta sensibilidade (PIERCE #21130) diluída 1:1.000 em tampão de ensaio. Após lavagem com tampão de lavagem,

a ligação de anti-FGF21 ao FGF21 recombinante foi avaliada pela adição do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBE-1000, Moss; Pasadena, MD). Um protocolo mais detalhado é fornecido na Figura 6. Os valores médios de absorbância de poços duplicados foram plotados como uma função da concentração de anticorpos e os dados foram ajustados a uma equação de três parâmetros usando Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) (Figura 7).

[000351] Como mostrado na Figura 8, o ensaio ELISA de FGF21 total teve uma sensibilidade no poço de 5 pg/ml e o ensaio ELISA de FGF21 ativo teve uma sensibilidade no poço de 28 pg/ml. O ensaio ELISA de FGF21 ativo não detectou a forma clivada de FGF21 que não contém os últimos 10 aminoácidos com terminais C.

[000352] Outros experimentos foram realizados para determinar o efeito do soro no ensaio ELISA de FGF21 total. Os ensaios ELISA de FGF21 usando mAb4 como anticorpo de captura e mAb15 como anticorpo detector foram realizados. Conforme mostrado na Figura 9, houve interferência mínima do soro no ensaio. A especificidade do ensaio para FGF21 humano também foi testada. Como mostrado na Figura 9, o ensaio para FGF21 total detectou FGF21 humano que foi expresso em camundongos de nocaute para FGF21 humano em comparação com camundongos de controle. A Figura 10 também mostra que o ensaio usando os anticorpos divulgados foi específico para FGF21 humano e não detectou FGF21 de camundongo.

[000353] Com base nestes dados, 4 anticorpos, mAb4, mAb9, mAb11 e mAb15, foram escolhidos para clonagem de cDNA para expressão recombinante. As sequências de aminoácidos destes anticorpos são fornecidas nas Tabelas 8-13 e Figuras 41A e 41B. Os mAbs recombinantes foram expressos em 100 mL de cultura de CHO no cenário de IgG2a murino.

**TABELA 8. SEQUÊNCIAS DE CADEIA LEVE (LC) DE COMPRIMENTO TOTAL PARA
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-FGF21 MURINOS**

Anticorpo	Sequência de aminoácidos de cadeia leve de comprimento total
4	QIVLTQSPAISAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYR TTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTF GGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 18)
9	DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAWEYQQKQKSPQLLVNIR TLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSP IVKSFNRECE (SEQ ID NO: 19)
11	QIVLTQSPALMSASPGERVTMTCSAGSSVSVMYQYQQKPRSSPKPWIIYLT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPRTFGG GKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 20)
15	DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKL LIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYCYFQGSHPVYTF GGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO: 21)

TABELA 9. SEQUÊNCIAS DE CADEIA PESADA (HC) DE COMPRIMENTO TOTAL PARA**ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-FGF21 MURINOS**

Anticorpo	Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de comprimento total
4	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVA TISTGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHD LVDWYFDVWGTGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ

Anticorpo	Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de comprimento total
	ID NO: 22)
9	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYMGWVKQSHGKSLEWIG DINPNNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGY GGALDYWGQGTSTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMS LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS LPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 23)
11	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIG EIYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSD YGFDDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMS LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS LPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 24)
15	QVQLIQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTGAIHWVRQSPGKGLEWLGM WKSNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYD YEFVYWGQGTTLTVSAAKTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV HPASSTKVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMS SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS LPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE MTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMY SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 25)

**TABELA 10. SEQUÊNCIAS DA REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE (VL) PARA
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-FGF21 MURINOS**

Anticorpo	Sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve
4	QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYR TTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 50)
9	DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAWEYQQKQKSPQLLVYNIR TLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 51)
11	QIVLTQSPALMSASPGERTMTCSAGSSVSIMYQYQQKPRSSPKPWIYLT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPRTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 52)
15	DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKL LIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 53)

TABELA 11. SEQUÊNCIAS DA REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA (VH) PARA ANTICORPOS MONOCLONAIIS ANTI-FGF21 MURINOS

Anticorpo	Sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada
4	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVA TISTGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSED TAMYYCARHD LVDWYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 54)
9	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIG DINPNNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGY GGALDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 55)
11	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIG EIYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSD YGFFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 56)
15	QVQLIQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTGAIHWVRQSPGKGLEWLGMI WKS GNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYD YEFVYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 57)

TABELA 12. SEQUÊNCIAS DE CDR DE CADEIA PESADA PARA ANTICORPOS MONOCLONAIIS ANTI-FGF21 MURINOS

Anticorpo	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4	SYGMS (SEQ ID NO: 26)	TISTGGGYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 30)	HDLVDWYFDV (SEQ ID NO: 34)
9	DYYMG (SEQ ID NO: 27)	DINPNNGVTINNQNFKG (SEQ ID NO: 31)	GYGGALDY (SEQ ID NO: 35)
11	NYGIS (SEQ ID NO: 28)	EIYPRSDNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 32)	SDYGFFDY (SEQ ID NO: 36)
15	GYAIH (SEQ ID NO: 29)	MIWKSGNTDYNAAFMS (SEQ ID NO: 33)	NGYDYEFVY (SEQ ID NO: 37)

TABELA 13. SEQUÊNCIAS DE CDR DE CADEIA LEVE PARA ANTICORPOS MONOCLONAIS**ANTI-FGF21 MURINOS**

Anticorpo	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 38)	RTTNLAS (SEQ ID NO: 42)	HQYHRSPPTWT (SEQ ID NO: 46)
9	RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 39)	NIRTLAE (SEQ ID NO: 43)	QHHYDSPWT (SEQ ID NO: 47)
11	SAGSSVSYMY (SEQ ID NO: 40)	LTSNLAS (SEQ ID NO: 44)	QQWSSNPRT (SEQ ID NO: 48)
15	RSSQIIVHNNGDTYLE (SEQ ID NO: 41)	KISNRFS (SEQ ID NO: 45)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 49)

EXEMPLO 5: OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO ELISA DE FGF21

[000354] O Ensaio ELISA de FGF21 descrito no Exemplo 4 foi ainda otimizado para melhorar a sensibilidade do ensaio.

[000355] Diferentes anticorpos de captura foram comparados para determinar qual anticorpo de captura resultou em uma detecção mais superior. Os anticorpos mAb4 e mAb9 foram testados como o anticorpo de captura. Conforme mostrado na Figura 11, uma melhor sensibilidade do ensaio

foi obtida usando mAb4 como o anticorpo de captura em comparação com mAb9.

[000356] Diferentes tipos de tampões de revestimento e diferentes concentrações de anticorpo de revestimento na concentração fixa da detecção do anticorpo foram analisados para o ensaio de FGF21 total e o ensaio de FGF21 ativo. Um tampão de revestimento de bicarbonato e um tampão de revestimento de PBS foram analisados em diferentes concentrações de anticorpo de revestimento. Como mostrado na Figura 12, para o ensaio de FGF21 total, sensibilidades semelhantes no poço foram observadas para o bicarbonato de sódio e o tampão de revestimento de PBS, mesmo em diferentes concentrações de anticorpo de revestimento. Por exemplo, o revestimento de 2 µg/mL de mAb4 em PBS teve uma sensibilidade no poço de 2 pg/mL e o revestimento de 2 µg/mL de mAb4 teve uma sensibilidade no poço de 3 pg/mL.

[000357] Para o ensaio de FGF21 ativo, sensibilidades semelhantes nos poços foram observadas para o bicarbonato de sódio e o tampão de revestimento de PBS (Figura 13).

[000358] Experimentos adicionais foram realizados para determinar os efeitos que a concentração de anticorpo detector (mAb15) e a concentração de peróxido de rábano (HRP) tiveram na sensibilidade do ensaio de FGF21 total. As concentrações de 0,2, 1 e 2 µg/ml foram testadas para o anticorpo detector e as diluições de 1/100 e 1/500 foram testadas para HRP. Conforme mostrado na Figura 14, concentrações mais altas do anticorpo detector e HRP não melhoraram significativamente a sensibilidade dos ensaios.

EXEMPLO 6: ENSAIOS DE DETECÇÃO DE FGF21 USANDO QUANTERIX SIMOA

[000359] Com base nas otimizações do formato ELISA, conforme discutido no Exemplo 5, um ensaio usando o Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™ foi adaptado para usar mAb4 como o anticorpo de captura

e tanto mAb15 biotinilado (para detectar FGF21 total) quanto pAb C-ter biotinilado (para detectar FGF21 ativo) como os anticorpos detectores. Um diagrama esquemático do ensaio é mostrado na Figura 15.

[000360] É fornecido um sumário do imunoensaio. O imunoensaio Quanterix Simoa começa com a captura e marcação de FGF21 total com um conjugado de enzima (estreptavidina β -galactosidase (SBG)), usando um protocolo de ensaio de 2 etapas (Figura 16). FGF21 total capturado com esferas magnéticas conjugadas com mAb4 e anticorpo de detecção biotinilado (seja mAb15-Biotina para FGF21 total ou pAb C-ter-Biotina para FGF21 ativo) são adicionados para formar um sanduíche de analito capturado na primeira etapa, então SBG é adicionada para detecção na segunda etapa. Entre cada etapa, as esferas são lavadas. Durante cada ciclo de lavagem, o instrumento usa um ímã para formar esferas antes da aspiração automática do sobrenadante. Após o ciclo de lavagem final, as esferas de captura são ressuspensas em substrato de resorufina β -D-galactopiranosídeo (RGP). As esferas são então transferidas para a porta de entrada de um disco Simoa em preparação para a imagem e quantificação do analito.

[000361] Após a captura e marcação de FGF21, as esferas de captura são carregadas em uma matriz contendo 216.000 poços 40-fL que foram dimensionados para conter não mais do que uma esfera por poço (4,25 μ m de largura, 3,25 μ m de profundidade). A suspensão da esfera é puxada através do canal de entrada e sobre a matriz. As esferas foram permitidas assentar nos poços por meio de gravidade por aproximadamente 90 segundos. Uma alíquota de óleo é dispensada no canal de entrada da matriz e puxada sobre a matriz, prendendo as esferas e o substrato RGP nos micropoços, bem como removendo o excesso de esferas da superfície. Se uma molécula FGF21 foi capturada e marcada, o

SBG hidrolisa o substrato RGP no produto fluorescente resorufina. O produto fluorescente se acumula dentro dos micropoços selados, permitindo a detecção de moléculas individuais.

[000362] As esferas de captura multiplex foram preparadas usando um protocolo de acoplamento EDAC de duas etapas (Simoa Homebrew 2.0 Multiplex Bead Coating Protocol USER-213-11). As esferas são acopladas com 0,5 mg/mL de mAb4 e 0,25 mg/mL de EDAC. A reação de acoplamento ocorre entre os grupos amino primários do anticorpo e os grupos carboxila nas esferas.

[000363] O ensaio Quanterix Simoa foi realizado em placas de 96 poços MicroWell™ de 96 poços Nunc™ de polipropileno (fundo em V, Thermo Scientific Nunc 249944, Rochester, NY). Para a curva padrão, FGF21 humano intacto recombinante (iFGF21) e FGF21 humano clivado (cFGF21) foram diluídos em série em tampão Simoa (PBS, pH 7,4, BSA a 2% (Fração B, Livre de Protease), Tween a 0,1%, 5 mM de EDTA) de 0,200-500 pg/mL (Figura 17) ou tampão Magic (BA010) (Figura 19-25, 28-32 e 33-37). Para determinar a concentração desconhecida de FGF21 (*por exemplo*, em plasma ou soro), as amostras de teste foram diluídas a 1:5-1:20 em tampão Simoa ou tampão Magic. A placa de ensaio, juntamente com os reagentes recomendados necessários, foram carregados no analisador Simoa HD-1. Em cada poço, para cada reação, 32 µL de esferas de captura conjugadas com mAb 4, 32 µL de anticorpos detectores a 1 µg/mL (mAb15-Biotina ou pAb C-ter-Biotina) e 110 µL de SBG foram usados. Para cada poço, o ensaio foi realizado em duplicado. O Ensaio Homebrew padrão do fabricante foi selecionado como o programa para os procedimentos automatizados. Informações adicionais sobre o protocolo de ensaio são fornecidas na Figura 18.

[000364] Como mostrado na Figura 19, o ensaio com base

no Quanterix Simoa (QSA) de FGF21 total (T) detectou FGF21 intacto (do tipo selvagem (WT)) com uma sensibilidade no poço (com base em 2 x AEB média de poços em branco) de 0,3 pg/ml e a forma clivada (CL) de FGF21, que não tem os últimos 10 aminoácidos com terminais C, com uma sensibilidade no poço de 0,6 pg/ml. O QSA de FGF21 ativo (A) detectou FGF21 intacto com uma sensibilidade no poço de 1,8 pg/mL. Uma melhoria significativa na sensibilidade do ensaio foi observada tanto no QSA de FGF21 total quanto no QSA de FGF21 ativo, em comparação com o ELISA tradicional. A Figura 20 mostra um representante do desempenho da curva padrão para os ensaios de FGF21 total e ativo. Foi observado um bom desempenho da curva padrão.

EXEMPLO 7: OTIMIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DETECÇÃO DE FGF21 USANDO

QUANTERIX SIMOA

[000365] Os QSAs de FGF21 descritos no Exemplo 6 foram ainda otimizados para melhorar a sensibilidade do ensaio.

[000366] Foi analisado o efeito do tipo de diluente do ensaio na sensibilidade dos ensaios. Dois diluentes diferentes foram testados, o diluente BA010 (PBS, BSA a 0,5%, CHAPS a 0,25%, 5mM de EDTA, 0,35M de NaCl, Tween-20 a 0,05%, Proclin 300 a 0,05%, pH 7,4) e o diluente IL-12 (PBS, BSA a 1,5%, Tween-20 a 0,15%, Proclin 300 a 0,05%, pH 7,4). O diluente BA010 funcionou bem para os ensaios de FGF21 total e ativo, e resultou em cenário inferior e sensibilidade melhorada (Figura 21).

[000367] O efeito da concentração das esferas paramagnéticas na sensibilidade do ensaio também foi analisado. Duas concentrações diferentes foram testadas, uma concentração “alta” de esferas de $1,22 \times 10^7$ esferas/ml e uma concentração “baixa” de esferas de $0,59 \times 10^7$ esferas/ml. Como mostrado na Figura 22, a sensibilidade do ensaio semelhante foi observada entre altas concentrações de esferas e baixas concentrações de

esferas para o ensaio de FGF21 total. No entanto, a sensibilidade melhorada foi observada na baixa concentração de esferas para o ensaio de FGF21 ativo (Figura 22). Em particular, o ensaio de FGF21 ativo teve uma sensibilidade no poço de 1,2 pg/ml quando a alta concentração de esferas foi usada em comparação com a sensibilidade no poço de 0,6 pg/ml, que foi observada com a baixa concentração de esferas. Três diferentes lotes de esferas paramagnéticas também foram analisados. Como mostrado na Figura 23, curvas de ligação semelhantes e sensibilidade do ensaio foram observadas com os lotes atuais e novos de esferas paramagnéticas de captura. Os parâmetros de ensaio otimizados são mostrados na Tabela 14.

TABELA 14. PARÂMETROS DE ENSAIO OTIMIZADOS

Reagente	Concentração
Diluyente de Ensaio (BA010)	1X
Esfera	$0,59 \times 10^7$ esferas/ml
Anticorpo detector (total, ativo)	0,8µg/mL, 2,2µg/mL
SBG	310pM

[000368] Diferentes anticorpos detectores foram testados para o ensaio de FGF21 total. Os anticorpos mAb11, mAb15 e pAb C-ter foram testados. Sensibilidades semelhantes foram observadas com os vários anticorpos detectores no ensaio de FGF21 total (Figura 24). No entanto, a curva para mAb15 teve o cenário mais baixo.

[000369] A partir dos resultados mostrados nas Figuras 14, 19 e 22, as concentrações otimizadas dos anticorpos detectores e SBG para os ensaios de FGF21 total e ativo foram determinadas (Tabela 15). A sensibilidade do ensaio para o ensaio de FGF21 total e FGF21 ativo foi melhorada quando as concentrações de anticorpo detector e SBG foram aumentadas. A sensibilidade do ensaio de FGF21 total melhorou com uma concentração de anticorpo detector de 0,8 µg/mL e uma concentração de SBG de 310 pM, e a sensibilidade do ensaio de FGF21 ativo melhorou com uma

concentração de anticorpo detector de 2,2 µg/mL e uma concentração de SBG de 310 pM.

TABELA 15. OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS DETECTORES E SBG

Sensibilidade total do ensaio de FGF21 (pg/ml)		
Anticorpo Detector (µg/mL)	SBG (pM)	
	310	155
0,8	0,1	0,4
0,4	0,7	0,3
Sensibilidade do ensaio de FGF21 ativo (pg/ml)		
Anticorpo Detector (µg/mL)	SBG (pM)	
	310	155
2,2	0,5	1,1
1,1	2,2	1,4

[000370] O ensaio de FGF21 total foi posteriormente analisado para determinar se um efeito gancho é observado. Um efeito gancho é normalmente observado quando uma grande quantidade de analito está presente em uma amostra e o valor observado é falsamente mais baixo. Os ensaios foram realizados como se segue: para o ensaio total, a captura foi realizada por esferas paramagnéticas conjugadas com mAb4 a uma concentração de $0,59 \times 10^7$ esferas/ml e a detecção foi realizada usando 0,8 µg/mL de mAb15 biotinilado; para o ensaio ativo, a captura foi realizada usando esferas paramagnéticas conjugadas com mAb4 a uma concentração de $0,59 \times 10^7$ esferas/ml e a detecção foi realizada usando 2,2 µg/mL de pAb C-term anti-FGF21 biotinilado de ovelha. Conforme mostrado na Figura 25, nenhum efeito gancho foi observado com o ensaio de FGF21 total. Além disso, o ensaio de FGF21 total detectou FGF21 humano intacto e FGF21 humano clivado por FAP (CL hFGF21) com sensibilidades semelhantes (Figura 25).

EXEMPLO 8: ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA USANDO QSA DE FGF21

[000371] Os QSAs de FGF21 ativo e total foram usados para analisar amostras obtidas e recém-preparadas de um doador humano

saudável. Os ensaios foram realizados conforme descrito no Exemplo 6. Conforme mostrado na Figura 26, o ensaio foi capaz de detectar baixos níveis de FGF21 ativo na amostra de soro do doador saudável. Experimentos adicionais foram realizados em doadores que eram hipertensos ou não tomavam nenhum medicamento e foram comparados com o uso de MS-SAFE, um coquetel inibidor de protease (Figura 27). Experimentos adicionais foram realizados em pacientes com diabetes tipo 2. Conforme mostrado na Figura 28A-B, de 14 amostras, FGF21 foi detectado em todas as amostras (100%) usando o ensaio de FGF21 total. Para o ensaio de FGF21 ativo, a proteína FGF21 foi detectada em 12/14 amostras (86%) (Figura 28A-B). Os resultados obtidos nos ensaios foram reproduzíveis (Figura 29). A reprodutibilidade foi aceitável dentro de $\pm 30\%$ de diferença em ambos os ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo.

[000372] A linearidade da diluição foi analisada para os ensaios de FGF21 total e ativo. A linearidade da diluição era aceitável dentro de $\pm 30\%$ de alteração da diluição mínima necessária (MRD) (diluição 1:20) para o FGF21 total e na diluição 1:40 no ensaio de FGF21 ativo (Figura 30). Observou-se uma tendência de maior concentração na MRD inicial. O LLOQ foi determinado para os ensaios de FGF21 total e ativo. O LLOQ preliminar foi determinado como sendo 3,15 pg/ml e 10,94 pg/ml para os ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo, respectivamente, com base na recuperação aceitável dentro de $\pm 30\%$ da concentração média calculada no fator de diluição mais alto (Figura 31).

[000373] A especificidade dos ensaios foi analisada posteriormente. Como mostrado na Figura 32, a especificidade foi demonstrada por mais de 90% de inibição dos valores de AEB de todas as seis amostras de plasma diabético tipo 2 na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de mAb4 nos ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo.

[000374] O uso do sistema de coleta de sangue P800, que inclui uma combinação de inibidores de protease, esterase e DPP-IV e inclui o anticoagulante K₂-EDTA, foi comparado com o uso de K₂-EDTA sozinho (Figura 33). Resultados comparáveis dentro de uma diferença aceitável de $\pm 30\%$ entre as amostras de plasma de rastreio de P800 e K₂EDTA foram observados nos ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo (Figura 34). Uma boa correlação entre amostras de plasma de rastreio de P800 e K₂-EDTA foram observadas nos ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo (Figuras 35-36). A estabilidade das amostras de plasma após serem armazenadas a 2-8°C foi analisada. Como mostrado na Figura 37, a estabilidade da amostra dentro de uma recuperação aceitável de $\pm 30\%$ da amostra de estabilidade de 2-8 °C foi observada nos ensaios de FGF21 total e FGF21 ativo.

[000375] Conforme mostrado nas Figuras 38 e 39, uma razão ativa superior a 100% foi observada em amostras de plasma de rastreio de K₂-EDTA que foram analisadas pelos ensaios de FGF21 total e ativo sugerindo interferência por anticorpos heterofílicos. Em particular, uma razão ativa superior a 100% foi observada nas amostras de plasma de rastreio de K₂-EDTA 16 e 17, mas não 9 e 10 no estudo GC29819 quando o diluente de ensaio foi usado sozinho. As amostras 16 e 17, que tinham uma razão ativa superior a 100%, continham anticorpos humanos anticamundongo (HAMA) e anticorpos humanos antiovelha (HASA), indicando que a presença de HAMA e HASA nas amostras de plasma do paciente interferiu na precisão dos ensaios total e ativo. Conforme mostrado nas Figuras 38 e 39, HAMA afetou tanto o ensaio total quanto o ativo; enquanto que HASA afetou somente o ensaio ativo. A adição de 10 µg/ml de IgG de camundongo ao diluente do ensaio total e a adição de 10 µg/ml de IgG de ovelha no diluente do ensaio ativo removeu efetivamente a interferência de HAMA e HASA, respectivamente, e resolveu a razão ativa superior a 100% que foi observada (Figura 38 e 39). Como

mostrado na Figura 40, a presença de 10 µg/ml de IgG anticamundongo ou IgG antiovelha no diluente do ensaio não afetou a curva padrão dos ensaios total e ativo, respectivamente.

EXEMPLO 9: ANTICORPOS ANTI-FGF21 QUIMÉRICOS

[000376] Os anticorpos mAb4, mAb9, mAb11 e mAb15 foram enxertados em estruturas de IgG1 humana com uma mutação K149C para gerar anticorpos anti-FGF21 quiméricos de camundongo/humano que têm as regiões VH e VL de camundongo e a região constante humana com a mutação K149C. As sequências de aminoácidos para os anticorpos quiméricos são fornecidas abaixo nas Tabelas 16-19 e Figuras 41A e 41B.

TABELA 16

Ab4 quimérico (FGF21.GN36.4.hlgG1; PRO418189)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia leve de comprimento total</u> QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTN LASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWCVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO: 63)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de comprimento total</u> EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMWVRQTPDKRLEWVATIST GGGYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHDLVDWYF DVWGTGTTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 67)
<u>Região Variável de Cadeia Leve</u> QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTN LASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO: 71)

Ab4 quimérico (FGF21.GN36.4.hlgG1; PRO418189)
<u>Região Variável de Cadeia Pesada</u> EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATIST GGGYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARHDLVDWYF DVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 75)

TABELA 17

Ab9 quimérico (FGF21.GN36.9.hlgG1; PRO418190)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia leve de comprimento total</u> DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNIRTLAE GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCYQHHDSPWTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWCVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 62)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de comprimento total</u> EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINP NNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGYGGALDY WGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)
<u>Região Variável de Cadeia Leve</u> DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNIRTLAE GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCYQHHDSPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
<u>Região Variável de Cadeia Pesada</u> EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINP NNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGYGGALDY WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 74)

TABELA 18

Ab11 quimérico (FGF21.GN36.11.hlgG1; PRO418191)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia leve de comprimento total</u>

Ab11 quimérico (FGF21.GN36.11.hlgG1; PRO418191)
QIVLTQSPALMSASPGERVMTMTCSAGSSVS MYWYQQKPRSSPKPWIYLT SNL ASGV PARFSGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de comprimento total</u> QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYP RSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYGFFDY WGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65)
<u>Região Variável de Cadeia Leve</u> ALMSASPGERVMTMTCSAGSSVS MYWYQQKPRSSPKPWIYLT SNLASGV PARF SGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 69)
<u>Região Variável de Cadeia Pesada</u> QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYP RSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYGFFDY WGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 73)

TABELA 19

Ab15 quimérico (FGF21.GN36.15.hlgG1; PRO418192)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia leve de comprimento total</u> DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKI SNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 60)
<u>Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de comprimento total</u> QVQLIQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTG YAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKS GNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDYEFVYW

Ab15 quimérico (FGF21.GN36.15.hlgG1; PRO418192)
GQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)
<u>Região Variável de Cadeia Leve</u> DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKI SNRFGSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO: 68)
<u>Região Variável de Cadeia Pesada</u> QVQLIQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTGYAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKS GNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDYEFVYW GQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 72)

[000377] Além das várias modalidades representadas e reivindicadas, a matéria divulgada também é direcionada a outras modalidades com outras combinações das características divulgadas e reivindicadas neste documento. Como tal, as características particulares apresentadas neste documento podem ser combinadas umas com as outras de outras maneiras dentro do escopo da matéria divulgada, de tal modo que a matéria divulgada inclua qualquer combinação adequada das características divulgadas neste documento. A descrição anterior de modalidades específicas da matéria divulgada foi apresentada para fins de ilustração e descrição. Não se destina a ser exaustivo ou a limitar a matéria divulgada às modalidades divulgadas.

[000378] Será evidente para aqueles técnicos no assunto que várias modificações e variações podem ser feitas nas composições e métodos da matéria divulgada sem se afastar do espírito ou escopo da matéria divulgada. Assim, pretende-se que a matéria divulgada inclua modificações e variações que estão dentro do escopo das reivindicações anexas e seus

equivalentes.

[000379] Várias publicações, patentes e pedidos de patentes são citados neste documento, cujos conteúdos são incorporados neste documento por referência em sua totalidade.

REINVIDICAÇÕES

1. MÉTODO DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 TOTAL em uma amostra, caracterizado por compreender:

(a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra;

(b) colocar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e

(d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

2. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo anticorpo de captura e o anticorpo detector ligarem-se a diferentes epítopos dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

3. MÉTODO DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 ATIVA em uma amostra, caracterizado por compreender:

(a) colocar um anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um material de combinação de anticorpo de captura-amostra;

(b) contatar o material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um anticorpo detector que se liga a um

epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21;

(c) detectar o anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e

(d) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do anticorpo detector ligado.

4. MÉTODO DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A RAZÃO da proteína fgf21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra, caracterizado por compreender:

(a) (i) colocar um primeiro anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (ii) colocar o primeiro material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um primeiro anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21; (iii) detectar o primeiro anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 total presente na amostra com base no nível do primeiro anticorpo detector ligado;

(b) (i) colocar um segundo anticorpo de captura que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 em contato com a amostra para gerar um segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra; (ii) colocar o segundo material de combinação de anticorpo de captura-amostra em contato com um segundo anticorpo detector que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; (iii) detectar o segundo anticorpo detector ligado ao material de combinação de anticorpo de captura-amostra; e (iv) calcular uma quantidade de proteína FGF21 ativa presente na amostra com base no nível do segundo anticorpo detector ligado; e

(c) comparar a quantidade de proteína FGF21 total conforme determinado pela etapa (a) com a quantidade de proteína FGF21 ativa conforme determinado pela etapa (b) para determinar a razão da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total na amostra.

5. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector ligarem-se a epítopos diferentes dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

6. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura serem o mesmo anticorpo.

7. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo imunoensaio ser um ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).

8. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura serem imobilizados em uma esfera paramagnética.

9. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector, primeiro anticorpo detector e segundo anticorpo detector serem conjugados com biotina.

10. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura ligarem-se a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

11. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4 a 9, caracterizado por um ou mais do anticorpo

detector e primeiro anticorpo detector ligarem-se a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

12. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pela amostra ser uma amostra de sangue.

13. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pela amostra ser uma amostra de plasma.

14. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo método detectar a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra com uma sensibilidade no poço de cerca de 2 pg/ml a cerca de 20 pg/ml.

15. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo método de imunoensaio ser realizado usando um instrumento de detecção de molécula única.

16. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo instrumento de detecção de molécula única ser o Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™.

17. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo método detectar a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra em uma sensibilidade no poço de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

18. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo

que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

19. IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54, 55, 74 e 75, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 50, 51, 70 e 71, e suas substituições conservativas.

20. IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22, 23, 66 e 67, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 18, 19, 62 e 63, e suas substituições conservativas.

21. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

22. IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 e 4 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56, 57, 72 e 73, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52, 53, 68 e 69, e suas substituições conservativas.

23. IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 24, 25, 64 e 65, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 20, 21, 60 e 61, e suas substituições conservativas.

24. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e suas

substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, e suas substituições conservativas.

25. IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e suas substituições conservativas.

26. IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e suas substituições conservativas.

27. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro

anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e suas substituições conservativas.

28. IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e suas substituições conservativas.

29. IMUNOENSAIO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e suas substituições conservativas.

30. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura ligarem-se competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo

que consiste nas SEQ ID NOS: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

31. MÉTODO DE IMUNOENSAIO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 4 a 17, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector ligarem-se competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

32. KIT PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 TOTAL em uma amostra, caracterizado por compreender:

(a) um anticorpo de captura, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(b) um anticorpo detector, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21; e

(c) um agente de detecção.

33. KIT, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo anticorpo de captura e o anticorpo detector ligarem-se a epítopos diferentes dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

34. KIT PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 ATIVA em uma amostra, caracterizado por compreender:

(a) um anticorpo de captura, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(b) um anticorpo detector, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; e

(c) um agente de detecção.

35. KIT PARA DETERMINAR A RAZÃO da proteína FGF21 ativa para a proteína FGF21 total em uma amostra, caracterizado por compreender:

(a) (i) um primeiro anticorpo de captura, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e (ii) um primeiro anticorpo detector, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21;

(b) (i) um segundo anticorpo de captura, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo presente dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21 e (ii) um segundo anticorpo detector, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um epítopo

presente dentro dos resíduos de aminoácidos 173-182 de FGF21; e

(c) um ou mais agentes de detecção.

36. KIT, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo primeiro anticorpo de captura e o segundo anticorpo de captura serem o mesmo anticorpo.

37. KIT, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo primeiro anticorpo de captura e o primeiro anticorpo detector ligarem-se a epítomos diferentes dentro dos resíduos de aminoácidos 5-172 de FGF21.

38. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 37, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura serem imobilizados em uma esfera paramagnética.

39. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 38, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector, primeiro anticorpo detector e segundo anticorpo detector serem conjugados com biotina.

40. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 39, caracterizado pelo agente de detecção ser selecionado a partir do grupo que consiste em um conjugado de estreptavidina- β -D-galactopiranosose, um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano e uma combinação dos mesmos.

41. KIT, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por compreender ainda resorufina β -D-galactopiranosídeo, tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio ou combinações dos mesmos.

42. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 41, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura ligarem-se a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

43. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e

35 a 42, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector ligarem-se a FGF21 com uma K_d de cerca de 10^{-10} M a 10^{-13} M.

44. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 35 a 43, caracterizado pelo anticorpo detector ou primeiro anticorpo detector ter uma concentração de cerca de 0,1 µg/ml a cerca de 1 µg/ml.

45. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 42, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector ou segundo anticorpo detector ter uma concentração de cerca de 1 µg/ml a cerca de 3 µg/ml.

46. KIT, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo conjugado de estreptavidina-β-D-galactopiranosose ter uma concentração de cerca de 100 pM a cerca de 400 pM.

47. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2

compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

48. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54, 55, 74 e 75, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 50, 51, 70 e 71, e suas substituições conservativas.

49. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22, 23, 66 e 67, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 18, 19, 62 e 63, e suas substituições conservativas.

50. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 35 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo

que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

51. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 35 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56, 57, 72 e 73, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52, 53, 68 e 69, e suas substituições conservativas.

52. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 35 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 24, 25, 64 e 65, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 20, 21, 60 e 61, e suas substituições conservativas.

53. KIT, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, e suas substituições conservativas.

54. KIT, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado por

um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e suas substituições conservativas.

55. KIT, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e suas substituições conservativas.

56. KIT, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e suas substituições conservativas.

57. KIT, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e suas substituições conservativas.

58. KIT, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector compreenderem:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e suas substituições conservativas.

59. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo de captura, primeiro anticorpo de captura e segundo anticorpo de captura ligarem-se competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26 e 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30 e 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 e 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38 e 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42 e 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46 e 47, e suas substituições conservativas.

60. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 35 a 46, caracterizado por um ou mais do anticorpo detector e primeiro anticorpo detector ligarem-se competitivamente a um anticorpo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 28 e 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32 e 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 36 e 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 40 e 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44 e 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 48 e 49, e suas substituições conservativas.

61. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 60, caracterizado pela amostra ser uma amostra de sangue.

62. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 60, caracterizado pela amostra ser uma amostra de plasma.

63. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 62, caracterizado pelo kit detectar a quantidade de proteína FGF21 total ou ativa na amostra em uma sensibilidade no poço de cerca de 0,2 pg/ml a cerca de 0,5 pg/ml.

64. ANTICORPO ANTI-FGF21 ISOLADO, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado por compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 26-29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 30-33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34-37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 38-41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42-45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 46-49, e suas substituições conservativas.

65. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2

compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, e suas substituições conservativas.

66. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 43, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47, e suas substituições conservativas.

67. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo,

compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 40, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia CDR3 leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48, e suas substituições conservativas.

68. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29, e suas substituições conservativas;

(b) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 33, e suas substituições conservativas;

(c) um domínio da região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37, e suas substituições conservativas;

(d) um domínio da região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, e suas substituições conservativas;

(e) um domínio da região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45, e suas substituições conservativas; e

(f) um domínio da região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49, e suas substituições conservativas.

69. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 54, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50, e suas substituições conservativas.

70. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 55, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 51, e suas substituições conservativas.

71. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 56, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 52 e suas substituições conservativas.

72. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 57, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 53, e suas substituições conservativas.

73. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71, e suas substituições

conservativas.

74. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 70, e suas substituições conservativas.

75. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69, e suas substituições conservativas.

76. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 72, e suas substituições conservativas; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 68, e suas substituições conservativas.

77. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 18, e suas substituições conservativas.

78. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 19, e suas substituições conservativas.

79. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20, e suas substituições conservativas.

80. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21, e suas substituições conservativas.

81. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 67, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 63, e suas substituições conservativas.

82. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 62, e suas substituições conservativas.

83. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 65, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 61, e suas substituições conservativas.

84. ANTICORPO ISOLADO, de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 64, e suas substituições conservativas; e

(b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 60, e suas substituições conservativas.

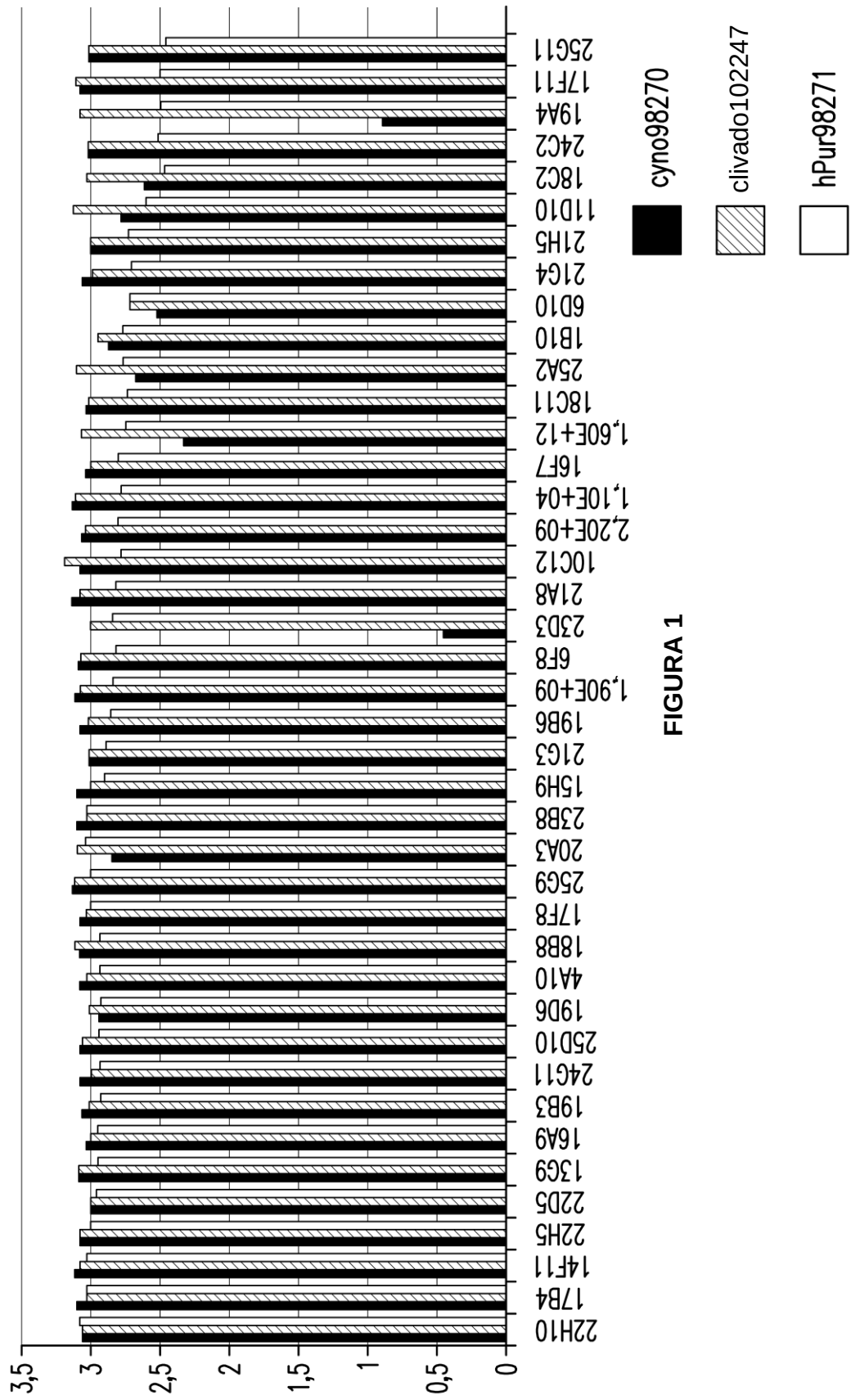
85. ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, caracterizado por codificar o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 64 a 84.

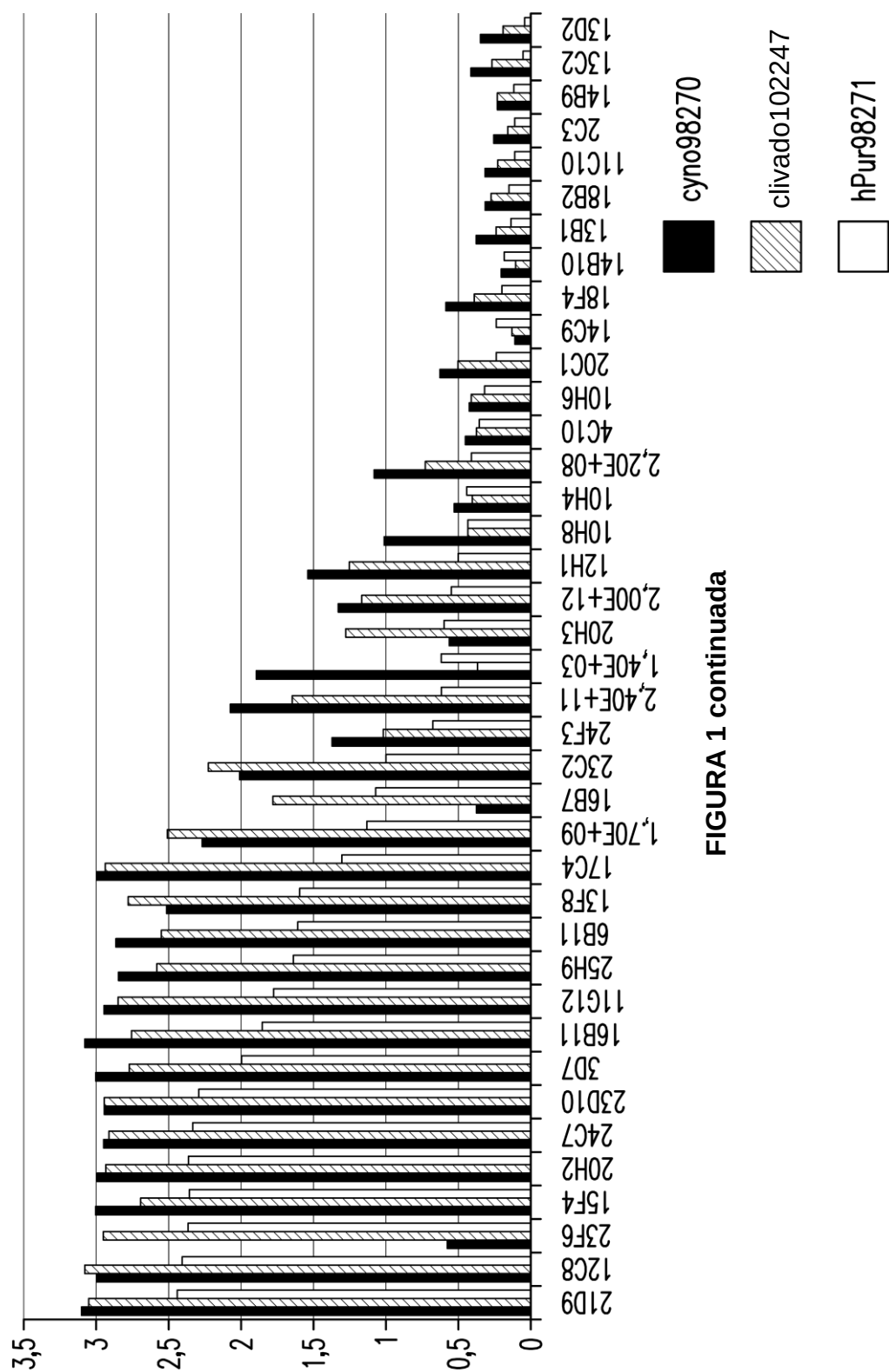
86. CÉLULA HOSPEDEIRA, caracterizada por compreender o ácido nucleico conforme definido na reivindicação 85.

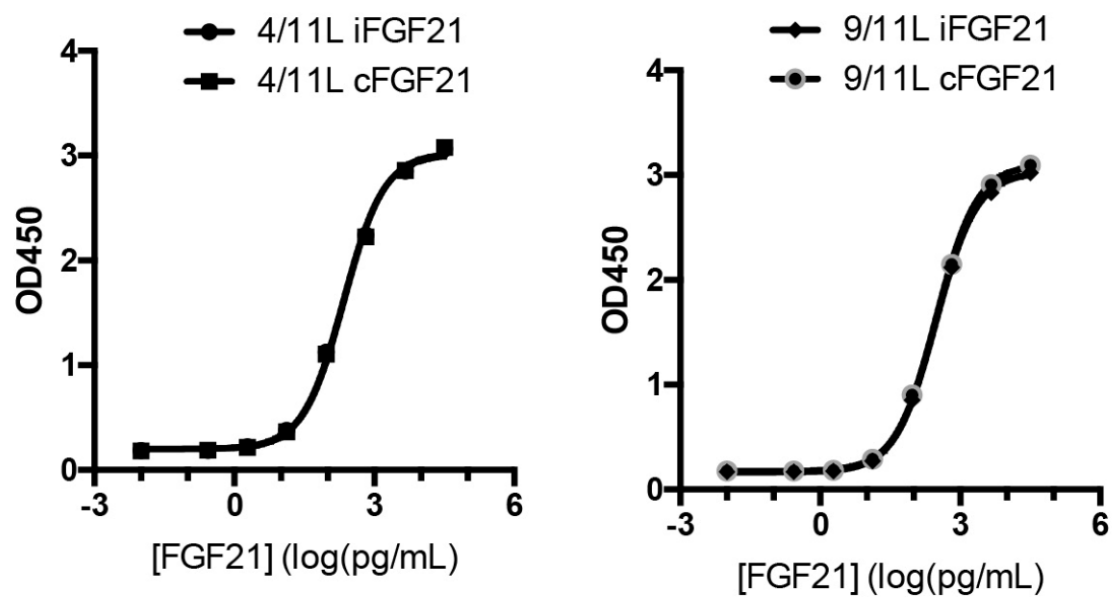
87. MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, caracterizado por compreender a cultura da célula hospedeira conforme definida na reivindicação 86, de modo que o anticorpo seja produzido.

88. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado por compreender ainda recuperar o anticorpo da célula hospedeira.

89. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender um ou mais anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos, conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 64 a 84.







iFGF21: FGF21 intacto

cFGF21: FGF21 clivado

FIGURA 2

Arquivo: Execução real de Anti-FGF21 Hyb

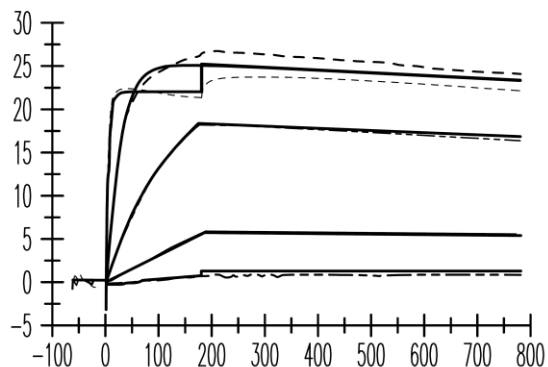
Item: FGF214

Ligante Hyb 4

Amostra: FGF21

Curva: Fc=2-1

Temperatura: 25 °C



Modelo: 1:1 Binding

k_a (1/Ms): $3,816E+5$

KD (M): $3,689E-10$

k_d (1/s): $1,408E-4$



Arquivo: Execução real de Anti-FGF21 Hyb

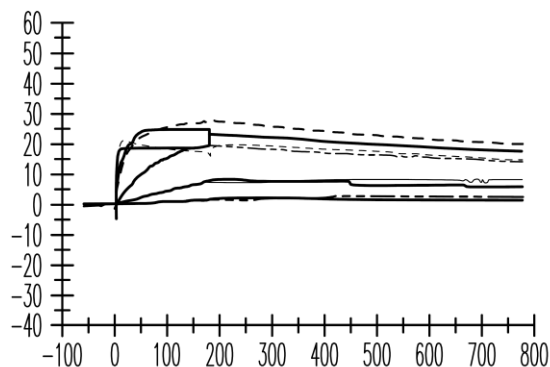
Item: FGF216

Ligante Hyb 9

Amostra: FGF21

Curva: Fc=4-1

Temperatura: 25 °C



Modelo: 1:1 Binding

k_a (1/Ms): $5,813E+5$

KD (M): $8,895E-10$

k_d (1/s): $5,171E-4$



Arquivo: Execução real de Anti-FGF21 Hyb

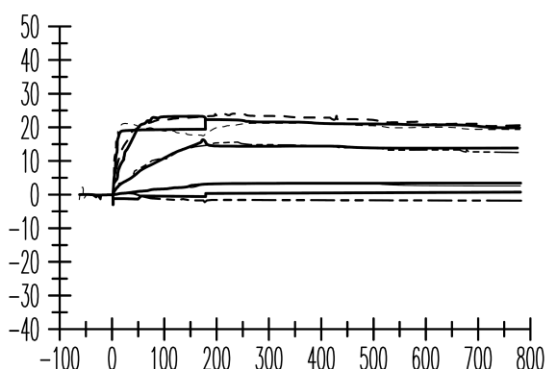
Item: FGF213

Ligante Hyb 11

Amostra: FGF21

Curva: Fc=4-1

Temperatura: 25 °C



Modelo: 1:1 Binding

k_a (1/Ms): $7,075E+5$

KD (M): $2,704E-10$

k_d (1/s): $1,913E-4$



Arquivo: Execução real de Anti-FGF21 Hyb

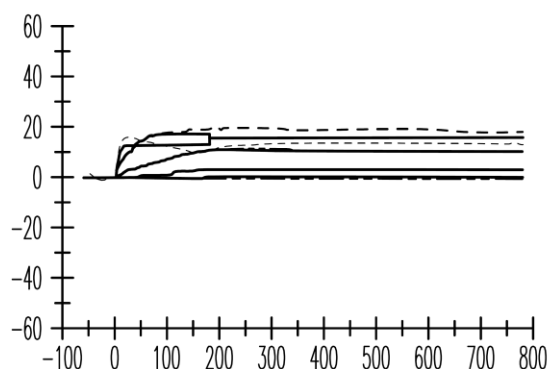
Item: FGF219

Ligante Hyb 15

Amostra: FGF21

Curva: Fc=4-1

Temperatura: 25 °C



Modelo: 1:1 Binding

k_a (1/Ms): $6,216E+5$

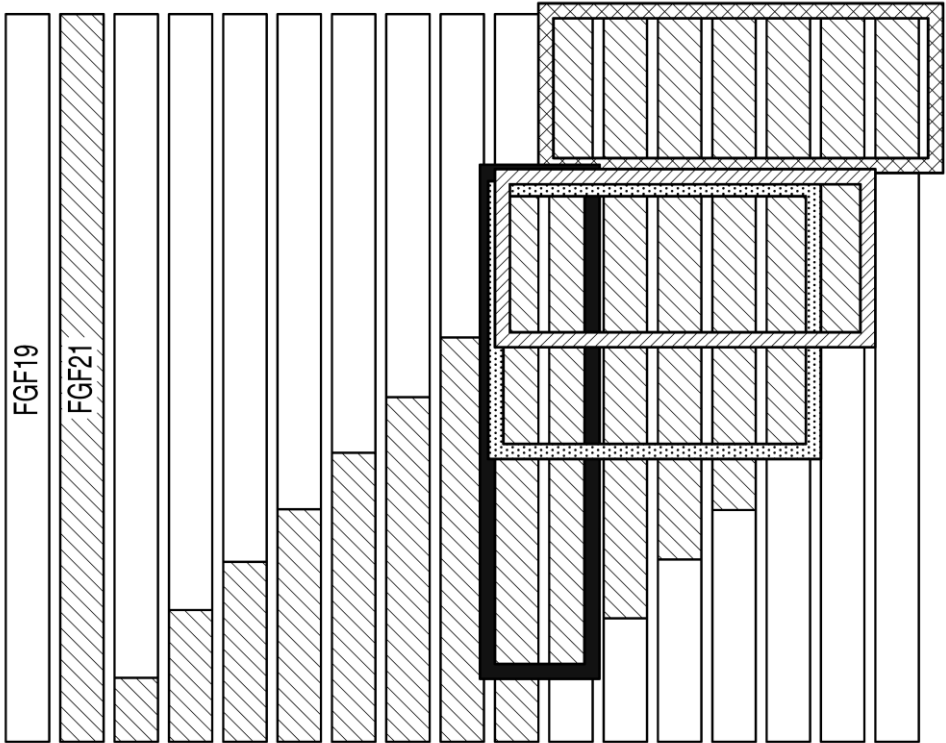
KD (M): $3,955E-12$

k_d (1/s): $2,459E-6$



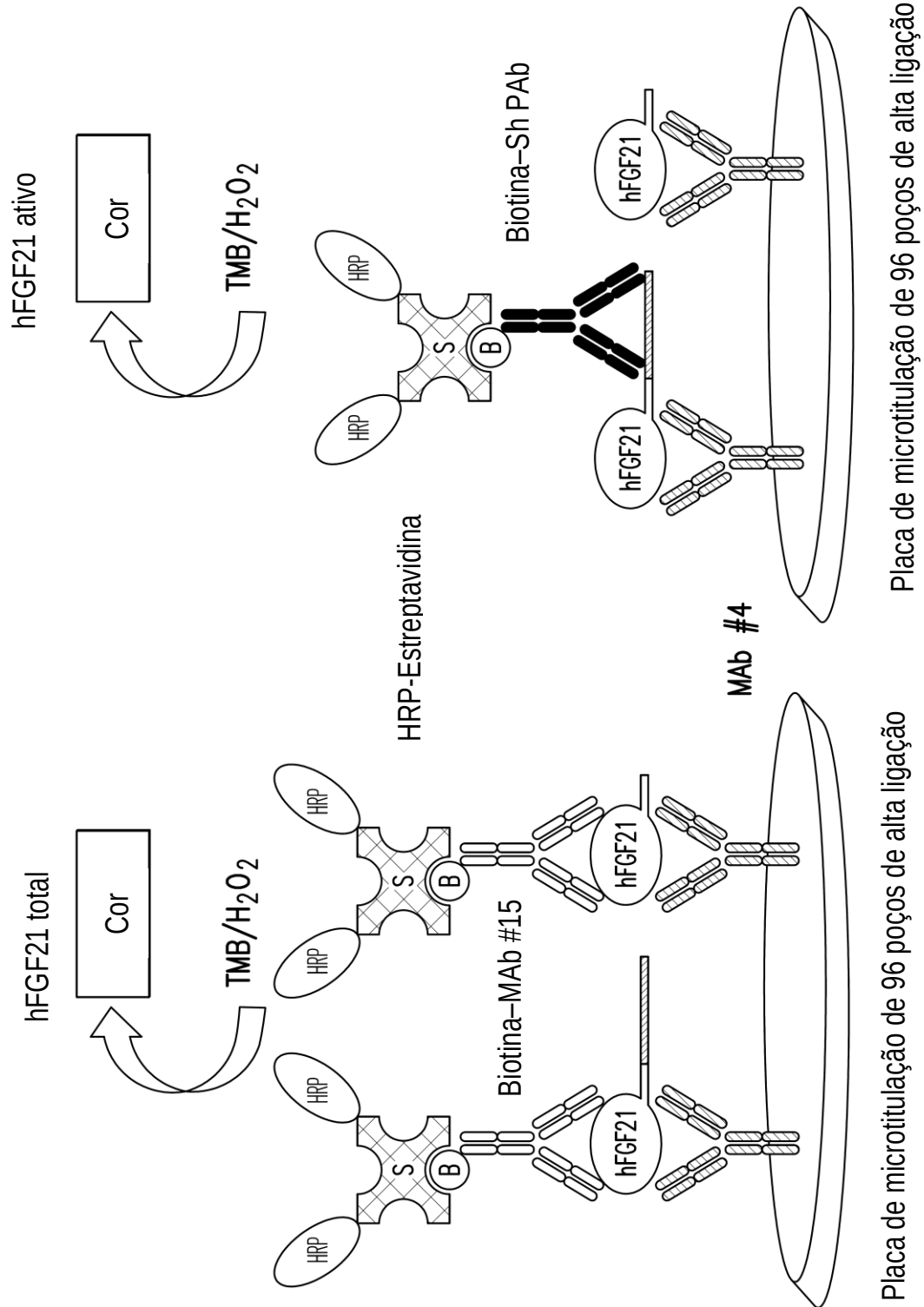
FIGURA 3

#4	#9	#11	#15	R5	R9
-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	+	+
+	+	+	-	+	+
+	+	+	-	+	+
+	+	+	-	+	+
+	+	+	-	+	+
+	+	+	-	+	+
-	-	-	-	+	+



+:sinal de ligação, -:sem sinal de ligação

FIGURA 4

**FIGURA 5**

Placa de microtitulação de 96 poços de alta ligação

Placa de microtitulação de 96 poços de alta ligação

- 1 Revista placas de microtitulação durante a noite a 2-8 °C com 100 µL por poço de 0,5 µg/ml de Anticorpo de Revestimento em Tampão de Revestimento.
- 2 Lave a placa três vezes com 400 µL por poço por ciclo de Tampão de Lavagem.
- 3 Adicione 200 µL por poço de Tampão de Bloqueio à placa e incube a placa à temperatura ambiente com agitação por 1-3 horas.
(Nota: Se as placas de microtitulação revestidas foram congeladas, incube as placas à temperatura ambiente por 1-3 horas na capela com o soprador de ar ligado)
- 4 Prepare a curva padrão (Std) como exemplo a seguir:
Fonte de Std de WT hFGF21 na concentração de 1590 µg/mL
Prepare a solução intermediária 2, conforme descrito na tabela abaixo, como exemplo:

Estoque	Conc. (pg/ml)	Conc. da Fonte (pg/ml)	Diluição dobrada	Volume da Fonte (µl)	Volume do Diluente Padrão (µl)	Volume Total (µl)
Intermediário 1	10000000	1590000000	159	3,1	496,9	500
Intermediário 2	100000	10000000	100	5,0	495,0	500

	Conc. Padrão (pg/ml)	Procedimento
Std1	4000	40µL do intermediário 2 a 100000 pg/mL + 960µL de Diluente Padrão
Std2	1000	250µL de std1 + 750µL de Diluente Padrão
Std3	250	250µL de std2 + 750µL de Diluente Padrão
Std4	625	250µL de std3 + 750µL de Diluente Padrão
Std5	15,625	250µL de std4 + 750µL de Diluente Padrão
Std6	3,906	250µL de std5 + 750µL de Diluente Padrão
Std7	0,977	250µL de std6 + 750µL de Diluente Padrão
Std8	NA	NA
Controle Negativo (NC)	0,000	50µL de Diluente Padrão

- 5 Dilua os controles (QC) e as amostras na diluição X (TBD) em Diluente de Ensaio
- 6 Lave a placa três vezes com 400µL por poço por ciclo de Tampão de Lavagem.
- 7 Adicione padrões/controles/amostras diluídos à placa, 100 µL por poço em duplicado.
- 8 Incube a placa à temperatura ambiente com agitação por 2 horas.
- 9 Dilua o anticorpo de detecção biotilado para 0,5 µL/mL em Diluente de Ensaio
- 10 Lave a placa três vezes com 400µL por poço por ciclo de Tampão de Lavagem.
- 11 Adicione 100 µL por poço de Anticorpo de Detecção Biotilado diluído à placa.
- 12 Incube a placa à temperatura ambiente com agitação por 1 hora.
- 13 Dilua a fonte de estoque do conjugado HRP para uma diluição 1:500 (TBD) em Diluente de Conjugado HRP.
- 14 Lave a placa três vezes com 400µL por poço por ciclo em Tampão de Lavagem.
- 15 Adicione 100 µL por poço de conjugado HRP diluído à placa.
- 16 Incube a placa à temperatura ambiente com agitação por 1 hora.
- 17 Lave a placa quatro vezes com 400µL por poço por ciclo de Tampão de Lavagem.
- 18 Adicione 100 µL por poço de substrato TWB à placa.
- 19 Incube a placa à temperatura ambiente com agitação por aproximadamente 15-20 minutos.
- 20 Adicione 100 µL por poço em 1 M de ácido fosfórico à placa.
- 21 Leia a placa usando comprimento de onda de leitura de 450 nm e comprimento de onda de referência de 630 nm ou 650 nm

FIGURA 6

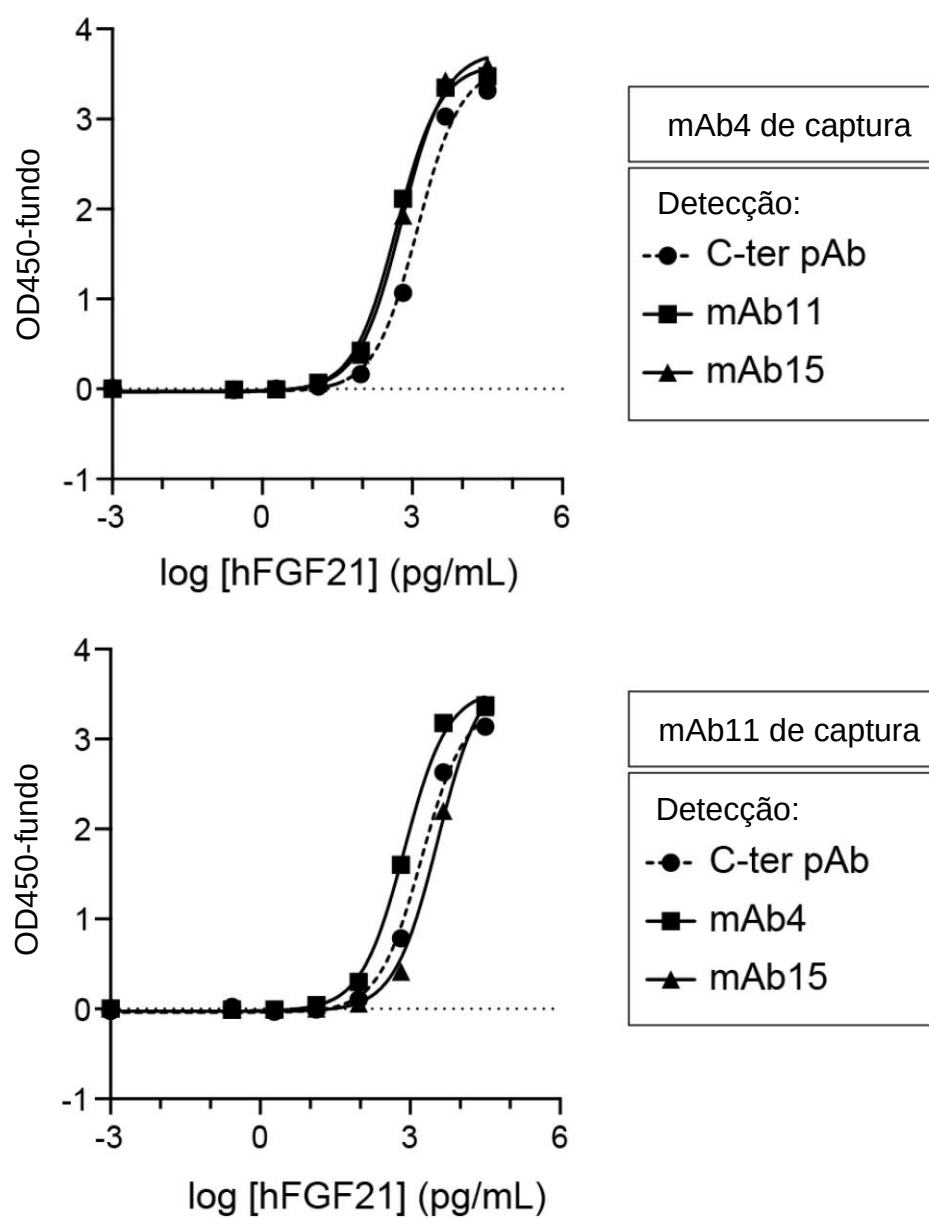
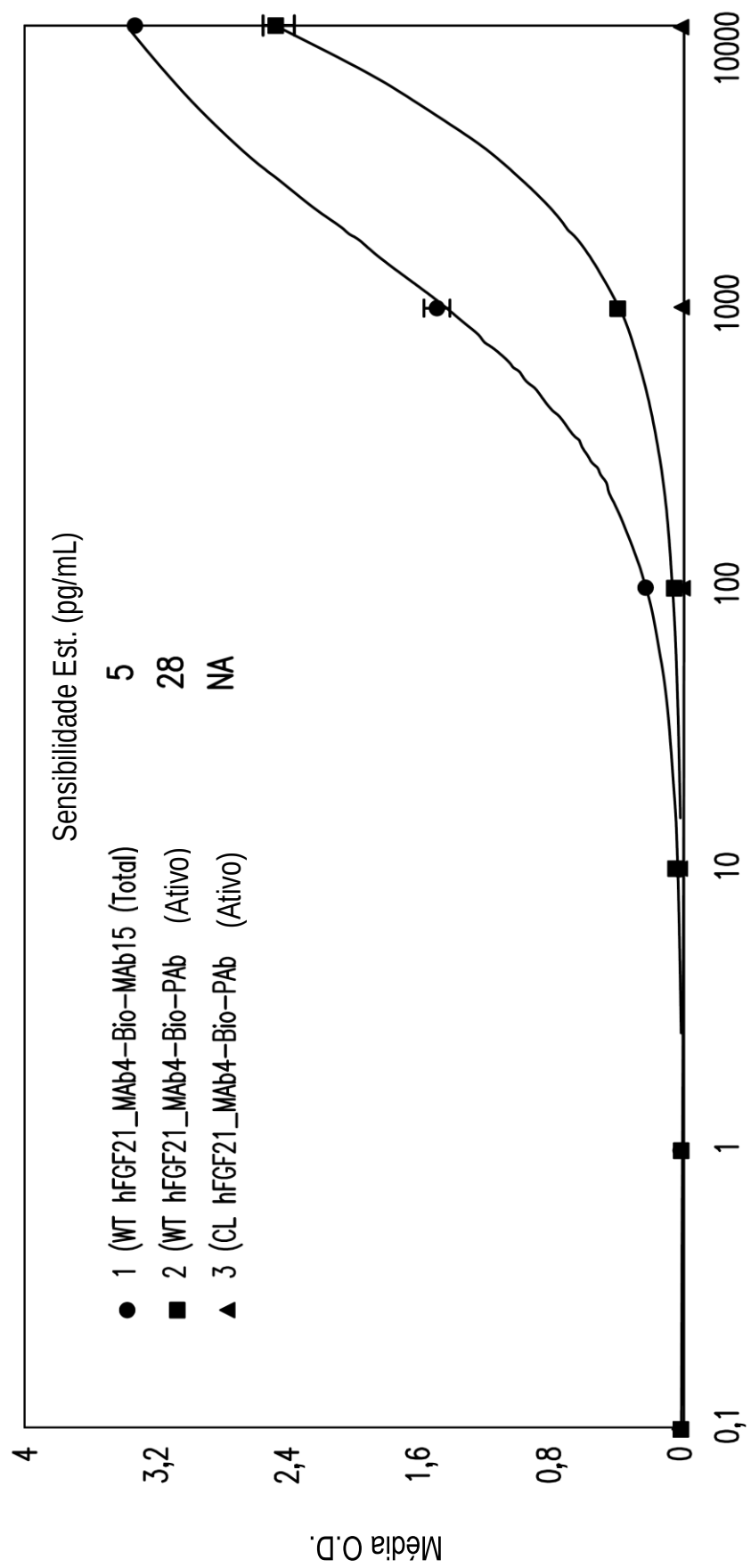


FIGURA 7



Concentração em poço WT ou de hFGF21 clivado em BA010 (pg/mL)

FIGURA 8

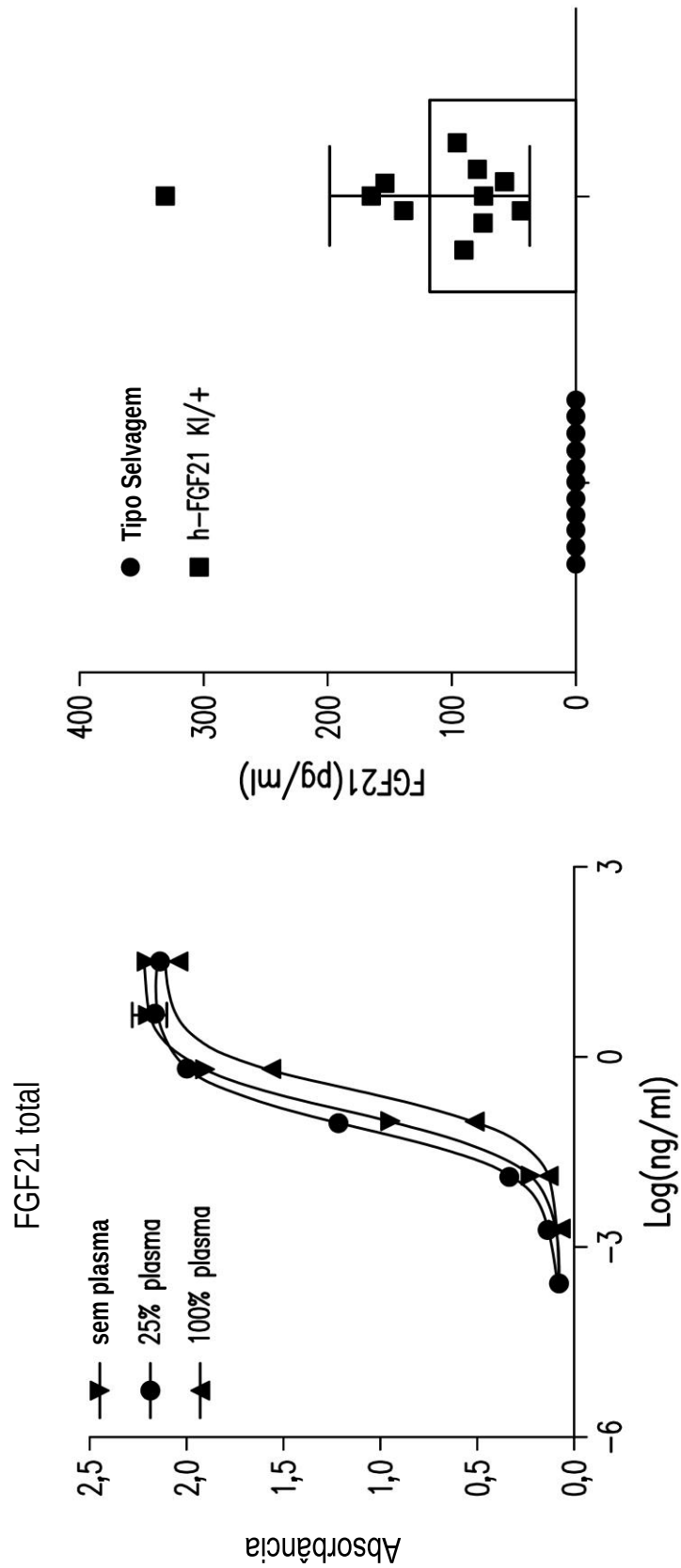


FIGURA 9

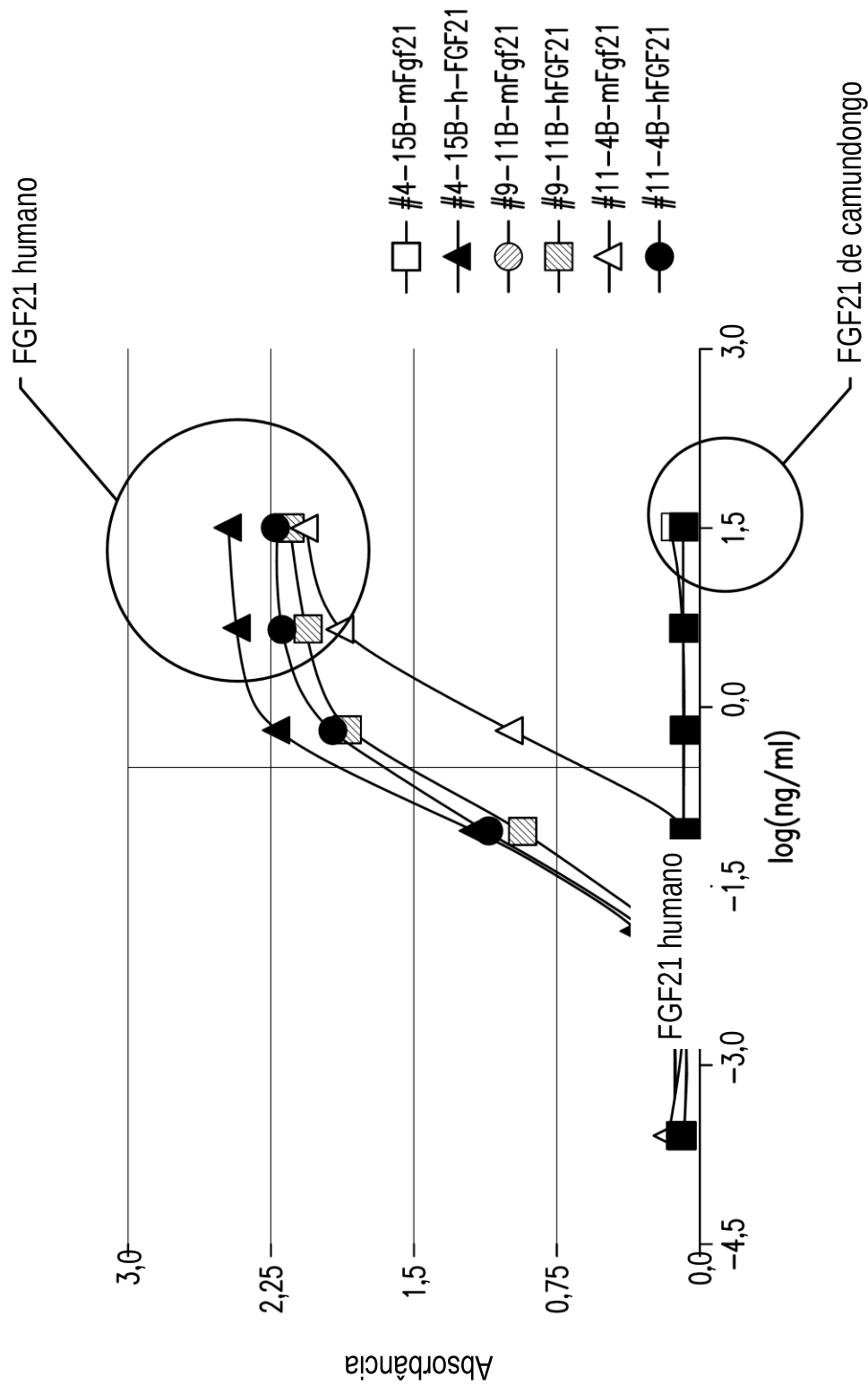


FIGURA 10

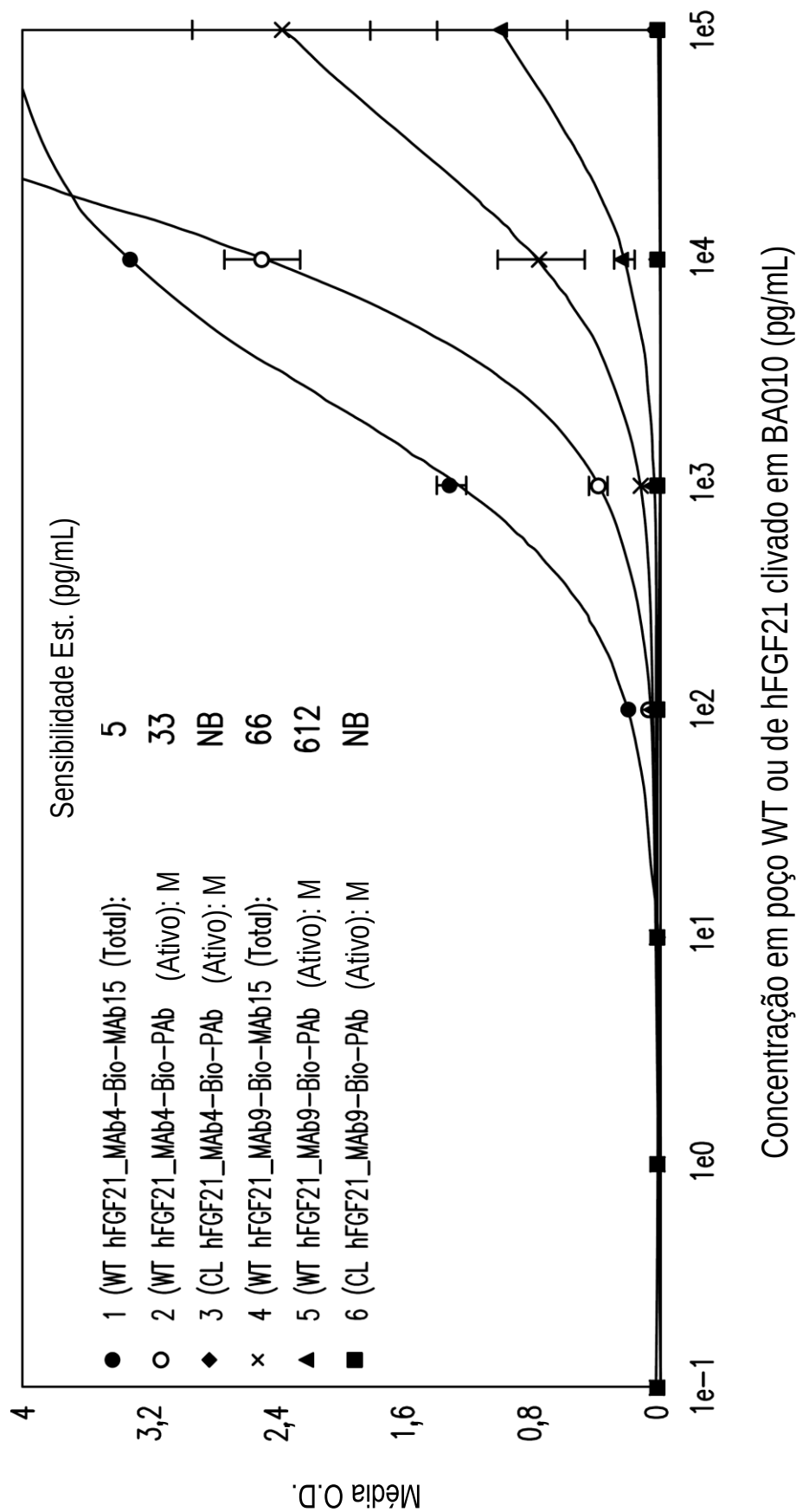


FIGURA 11

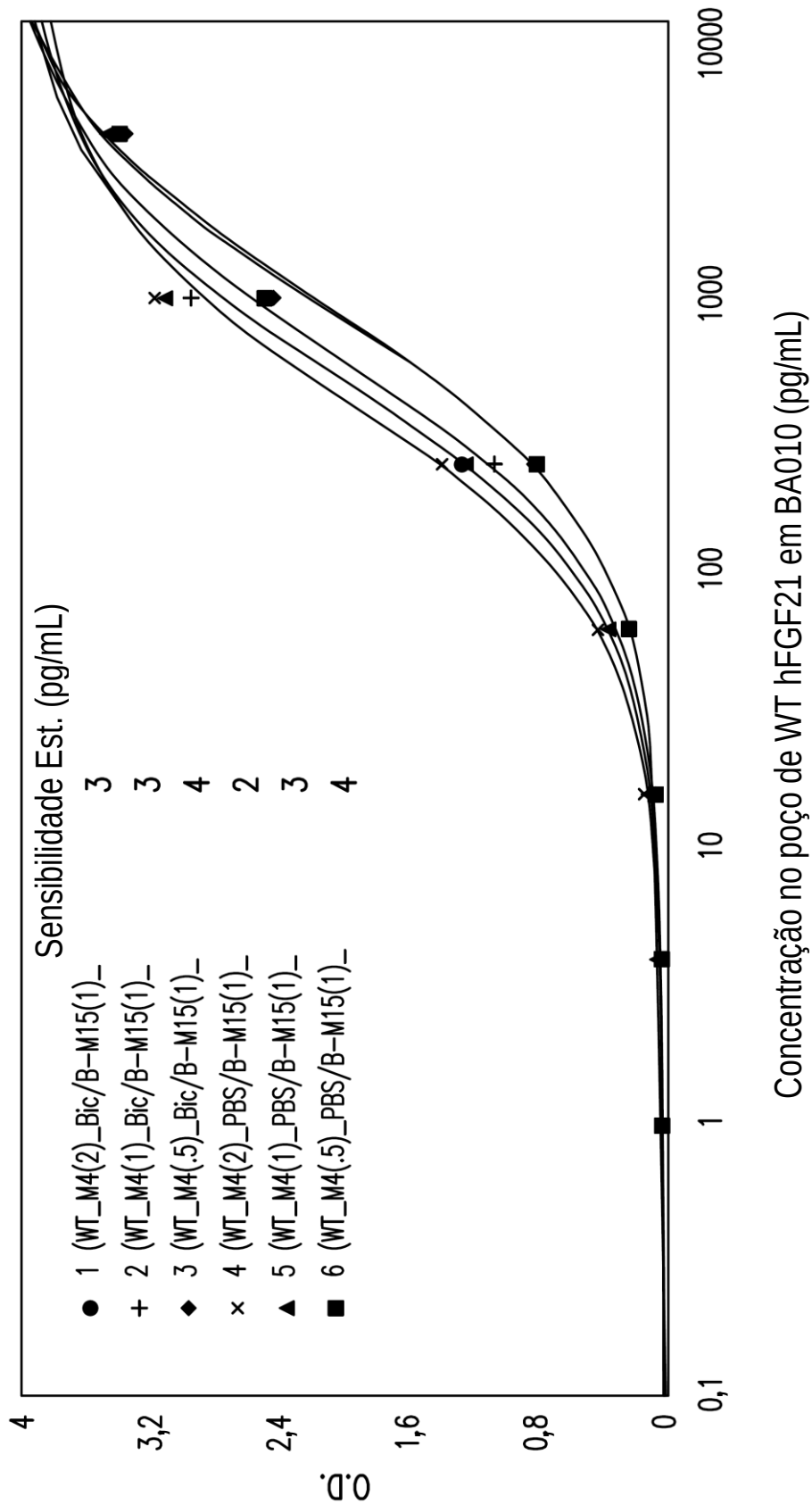


FIGURA 12

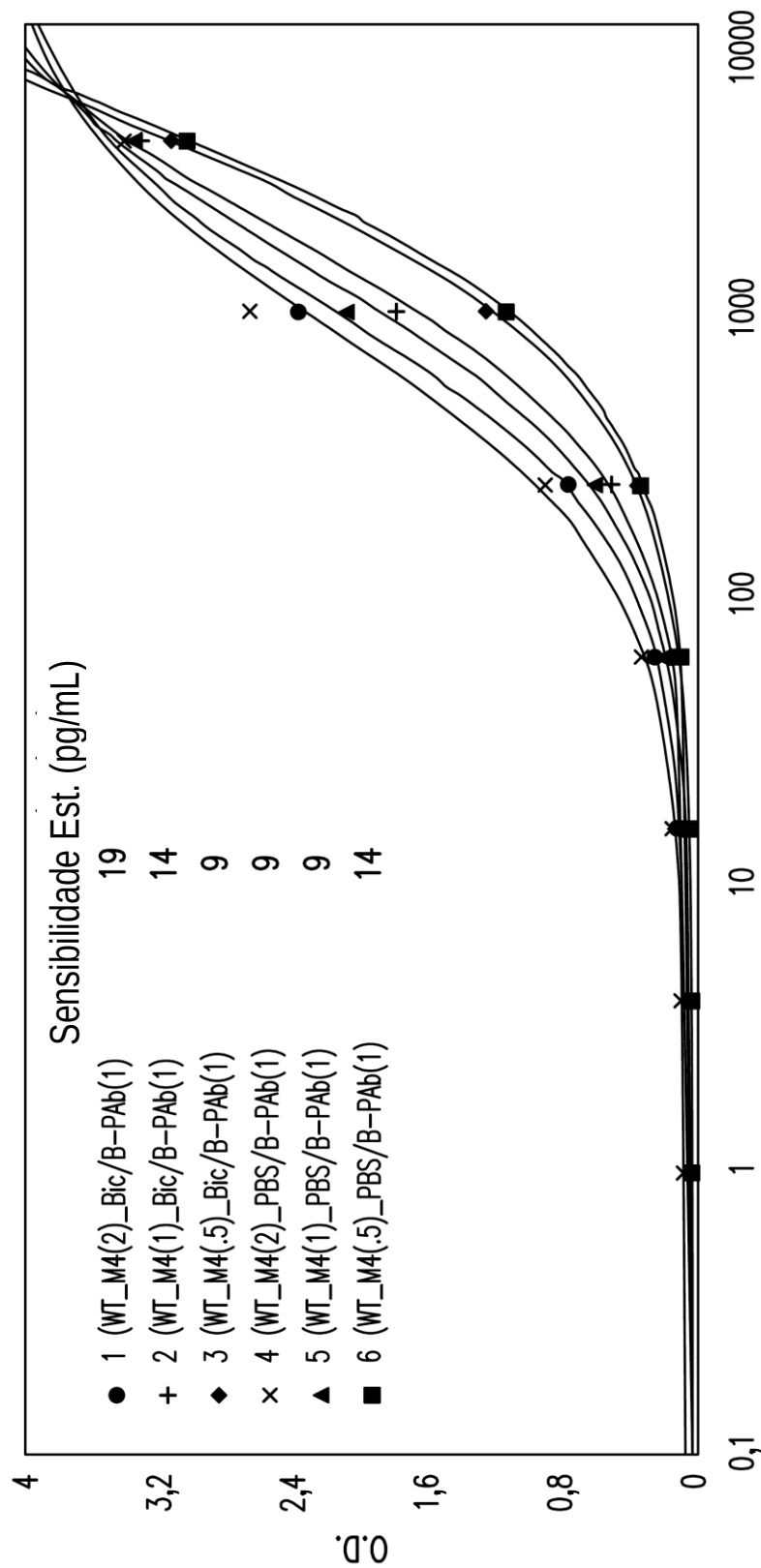
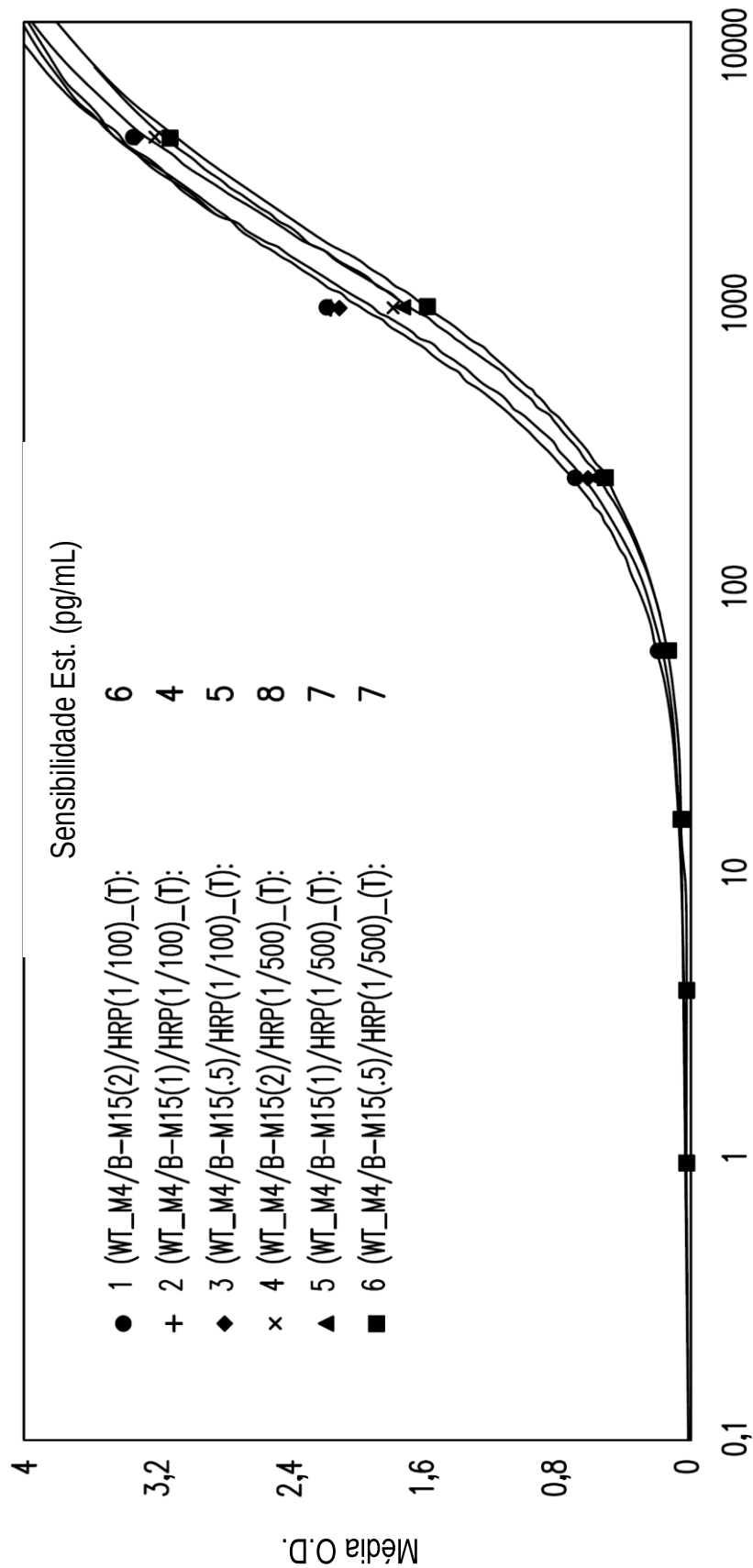


FIGURA 13



Concentração no poço de WT hFGF21 em BA010 (pg/mL)

FIGURA 14

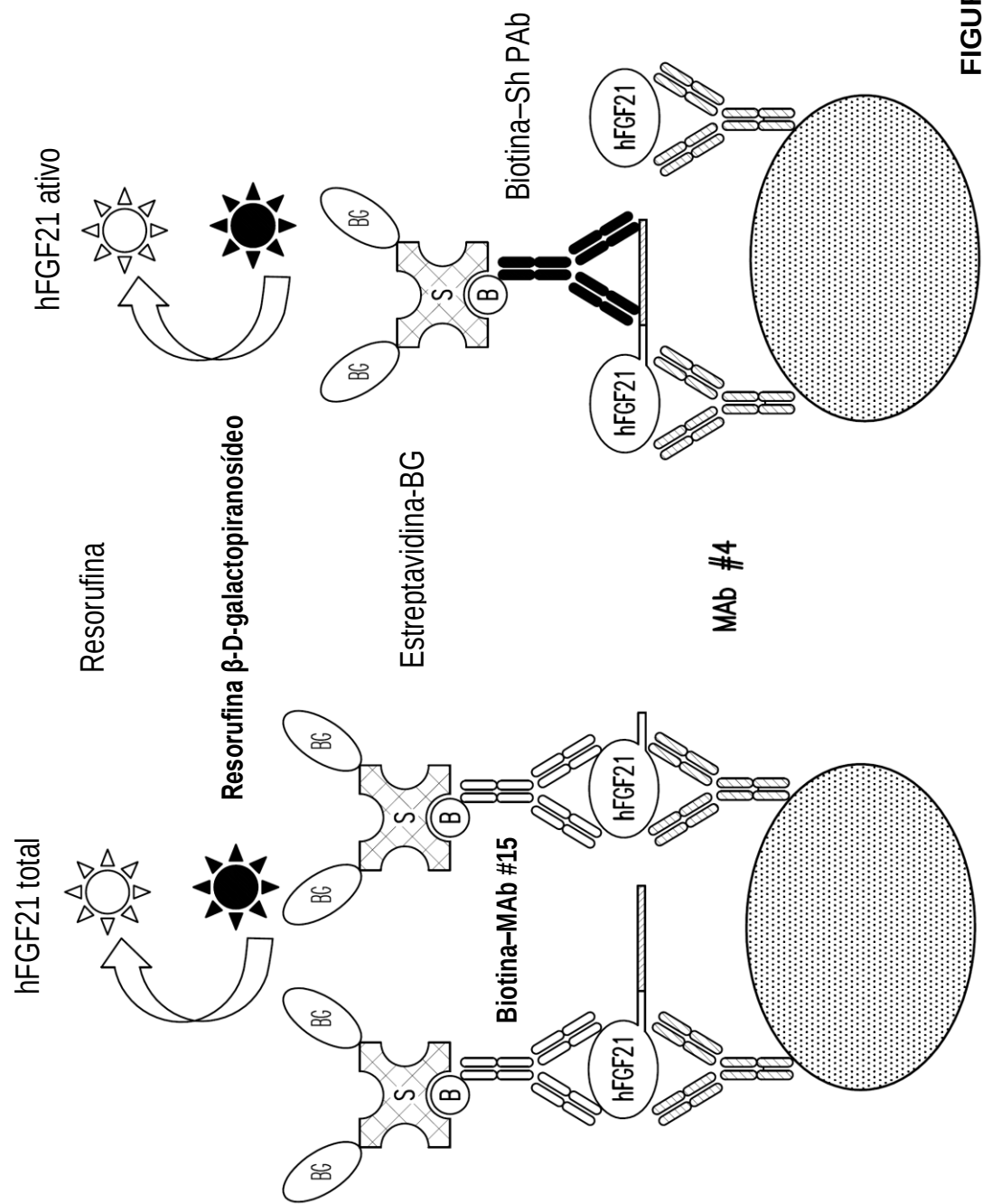
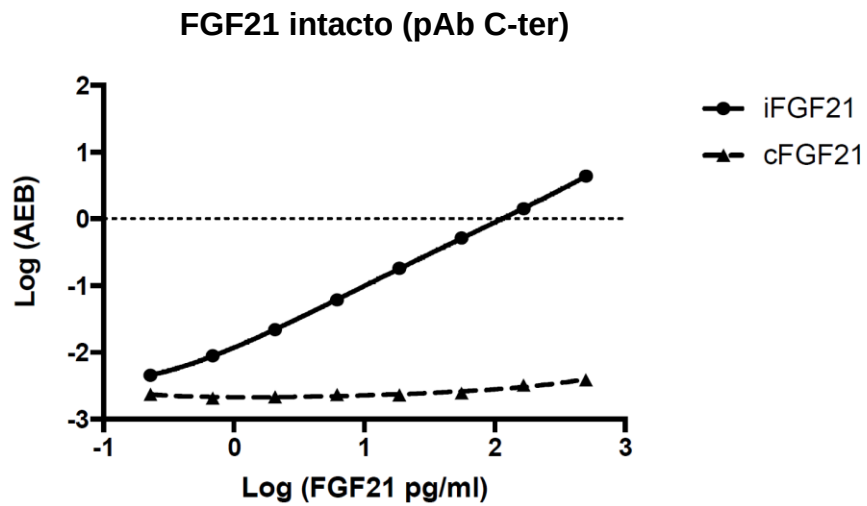
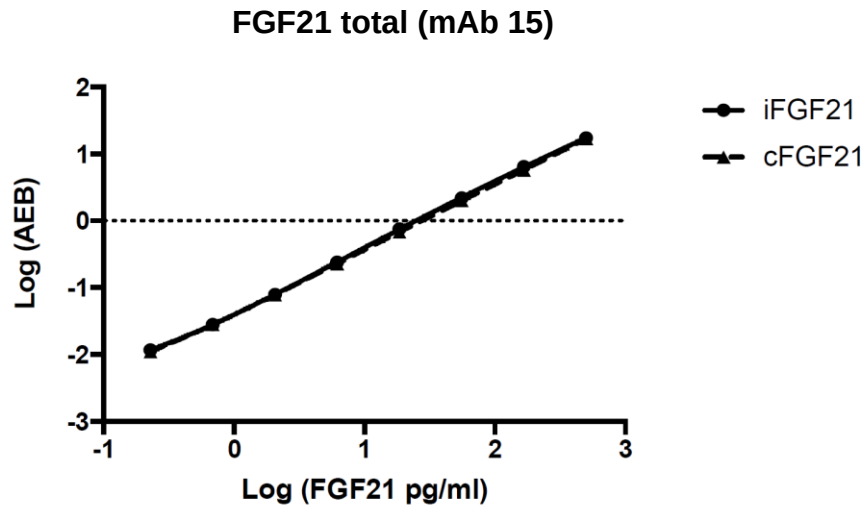


FIGURA 15

Anticorpo anti-hFGF21 conjugado em esfera paramagnética

Etapas		Valor	Unidade	Min	Max	Nota
<	Etapa 1					
Esferas		Esferas Homebrew 1				
Volume Líquido		25	µL	10	185	
Amostra/Calibrador						
Volume Líquido		100	µL	10	172	
Detector		Deteccão de Homebrew 1				
Volume Líquido		20	µL	10	185	
Tempo de Incubação		80	cadências (45s)	1	1120	60:00 min
<	Etapa 2					
SBG		SBG Homebrew 1				
Volume Líquido		100	µL	10	185	
Tempo de Incubação		7	cadências (45s)	1	1120	5:15 min
<	Medição					

FIGURA 16



iFGF21: FGF21 intacto

cFGF21: FGF21 clivado

FIGURA 17

- 1 Prepare a solução de trabalho de esferas paramagnéticas revestidas com Mab Anti-hFGF21 #4, conjugado com Biotina, e SBG em tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL ou 50 mL.
- 2 Transfira cada solução de trabalho para o respectivo frasco de reagente do ensaio Quanterix.
- 3 Prepare a curva padrão (Std) como exemplo a seguir:
Estoque padrão de WT hFGF21 na concentração de 10 µg/mL.
Prepare a solução imediata 2 conforme descrito na tabela abaixo como exemplo:

Estoque	Conc. (pg/ml)	Conc. da Fonte (pg/ml)	Diluição dobrada	Volume da Fonte (µL)	Volume do Diluente Padrão (µL)	Volume Total (µL)
Intermediário 1	100000	10000000	100	20,0	1980,0	2000
Intermediário 2	1000	100000	100	20,0	1980,0	2000

	Conc. Padrão (pg/ml)	Procedimento
Std1	400	400µL do intermediário 2 a 1000 pg/mL + 600µL de Diluente Padrão
Std2	100	250µL de std1 + 750µL de Diluente Padrão
Std3	25	250µL de std2 + 750µL de Diluente Padrão
Std4	6,3	250µL de std3 + 750µL de Diluente Padrão
Std5	1,5625	250µL de std4 + 750µL de Diluente Padrão
Std6	0,391	250µL de std5 + 750µL de Diluente Padrão
Std7	0,098	250µL de std6 + 750µL de Diluente Padrão
Std8	0,024	250µL de std6 + 750µL de Diluente Padrão
Controle Negativo (NC)	0,000	750µL de Diluente Padrão

- 4 Use controles altos e baixos (QC) puros e controle endógeno (EC) diluído ou amostras na diluição mínima exigida de 1:20 (M RD) e diluições subsequentes no diluente de ensaio.
- 5 Adicione padrões/controles/amostras diluídos à placa, 300 µL por poço, o suficiente para duplicar.
- 6 Configure o instrumento Quanterix Simoa HD-1 totalmente automatizado e execute o experimento.

FIGURA 18

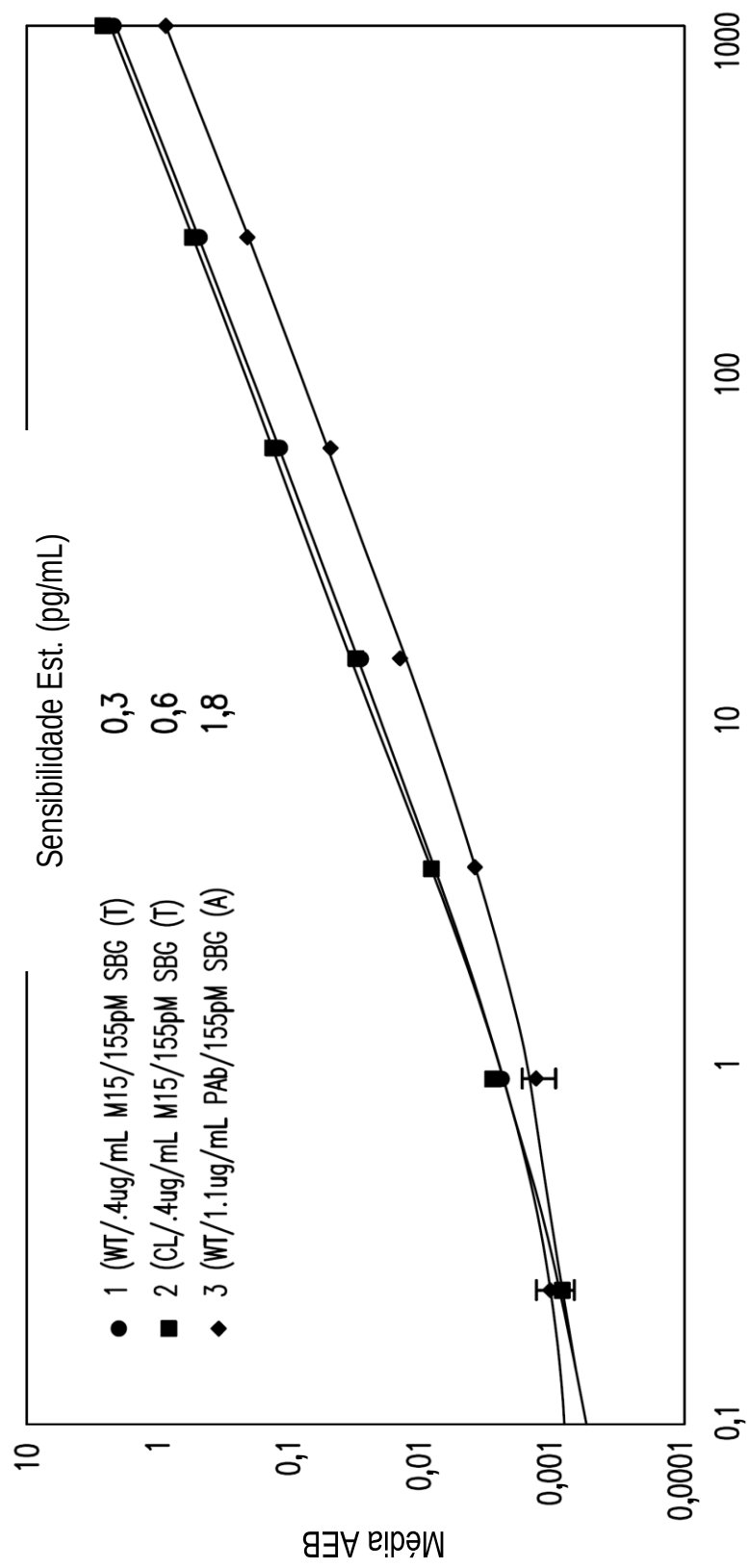


FIGURA 19

WT	hFGF21	Conc. (pg/mL)	Média AEB	Desv. Pad.	CV%	Razão S/N	Resultados da Média	% de Recuperação
		1000	2.1119	0.0924	4.4	4036	1055	105
		250	0.4766	0.0029	0.6	911	245	98
		62.50	0.1130	0.0028	2.5	216	59	95
		15.63	0.0289	0.0004	1.4	55	15	98
		3.91	0.0080	0.0008	9.7	15	4	105
		0.98	0.0024	0.0003	12	4	1.0	102
		0.24	0.0010	0.0003	26	2	0.2	97
		Em branco	0.0005	0.0001	11	1	Faixa?	

Ensaio Total

CL	hFGF21	Conc. (pg/mL)	Média AEB	Desv. Pad.	CV%	Razão S/N	Resultados da Média	% de Recuperação
		1000	2.5205	0.0523	2.1	3183	1126	113
		250	0.5253	0.0014	0.3	663	240	96
		62.50	0.1266	0.0005	0.4	160	59	95
		15.63	0.0309	0.0007	2.2	39	15	93
		3.91	0.0082	0.0003	3.1	10	4	98
		0.98	0.0029	0.0001	3.5	4	1.3	129
		0.24	0.0008	0.0002	20	1	0.2	91
		Em branco	0.0008	0.0001	15	1	0.2	

Ensaio Total

WT	hFGF21	Conc. (pg/mL)	Média AEB	Desv. Pad.	CV%	Razão S/N	Resultados da Média	% de Recuperação
		1000	0.8592	0.0113	1.3	1085	1008	101
		250	0.2030	0.0011	0.5	256	244	98
		62.50	0.0492	0.0019	3.9	62	60	96
		15.63	0.0142	0.0003	2.4	18	17	110
		3.91	0.0039	0.0004	11	5	4	106
		0.98	0.0013	0.0004	28	2	0.8	78
		0.24	0.0010	0.0003	27	1	0.3	142
		Em branco	0.0010	0.0002	16	1	0.4	

Ensaio Ativo

FIGURA 20

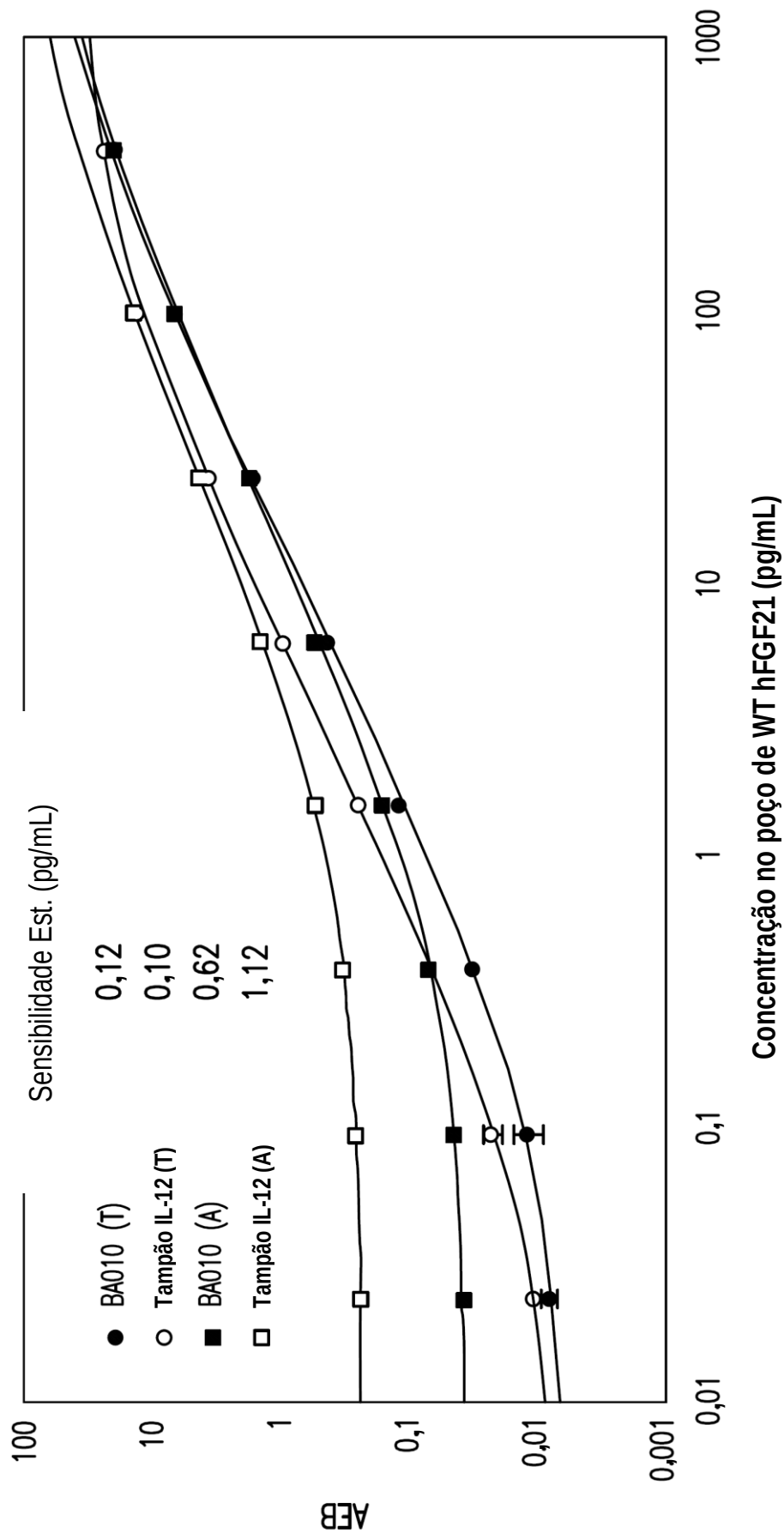


FIGURA 21

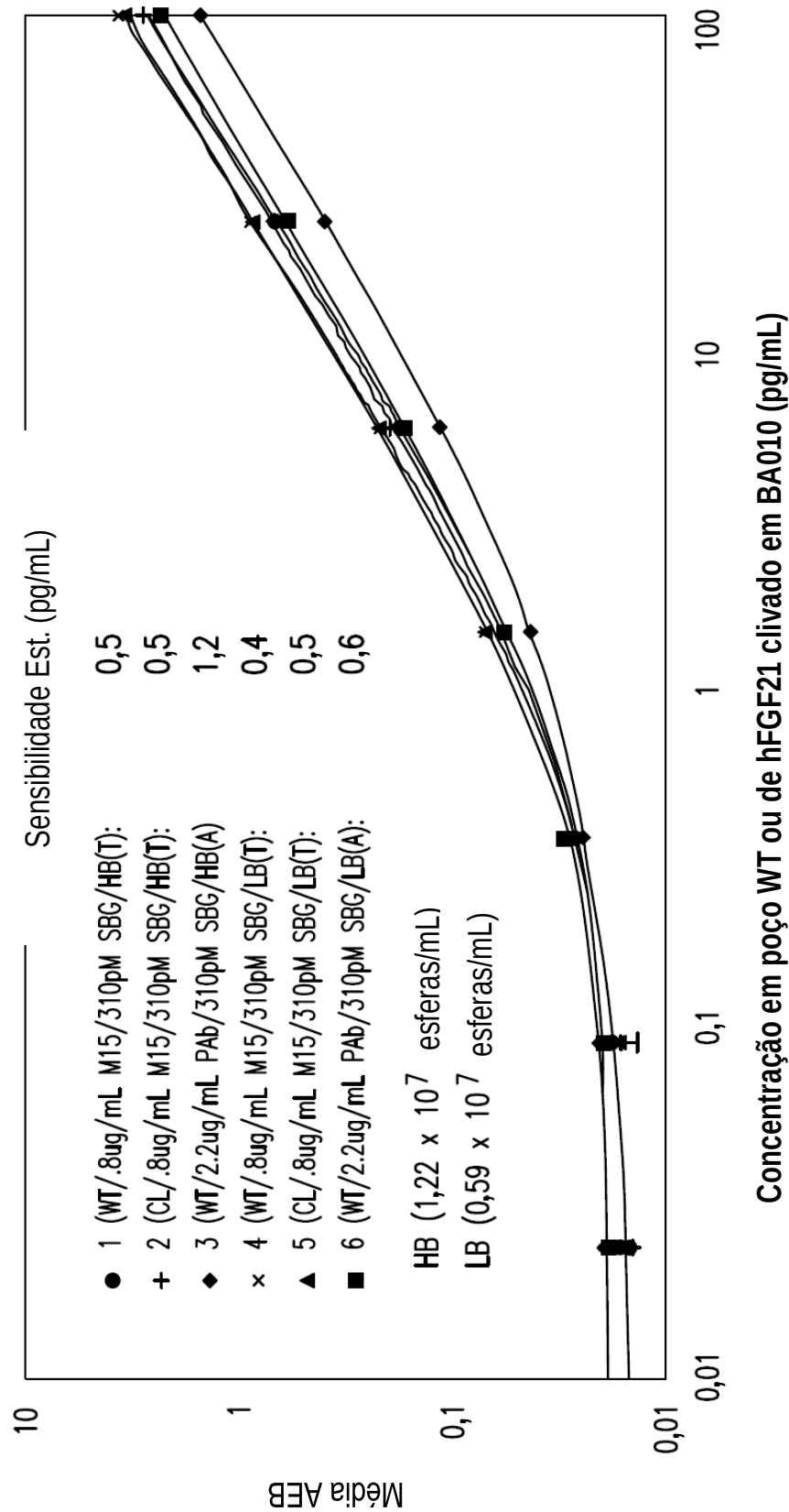


FIGURA 22

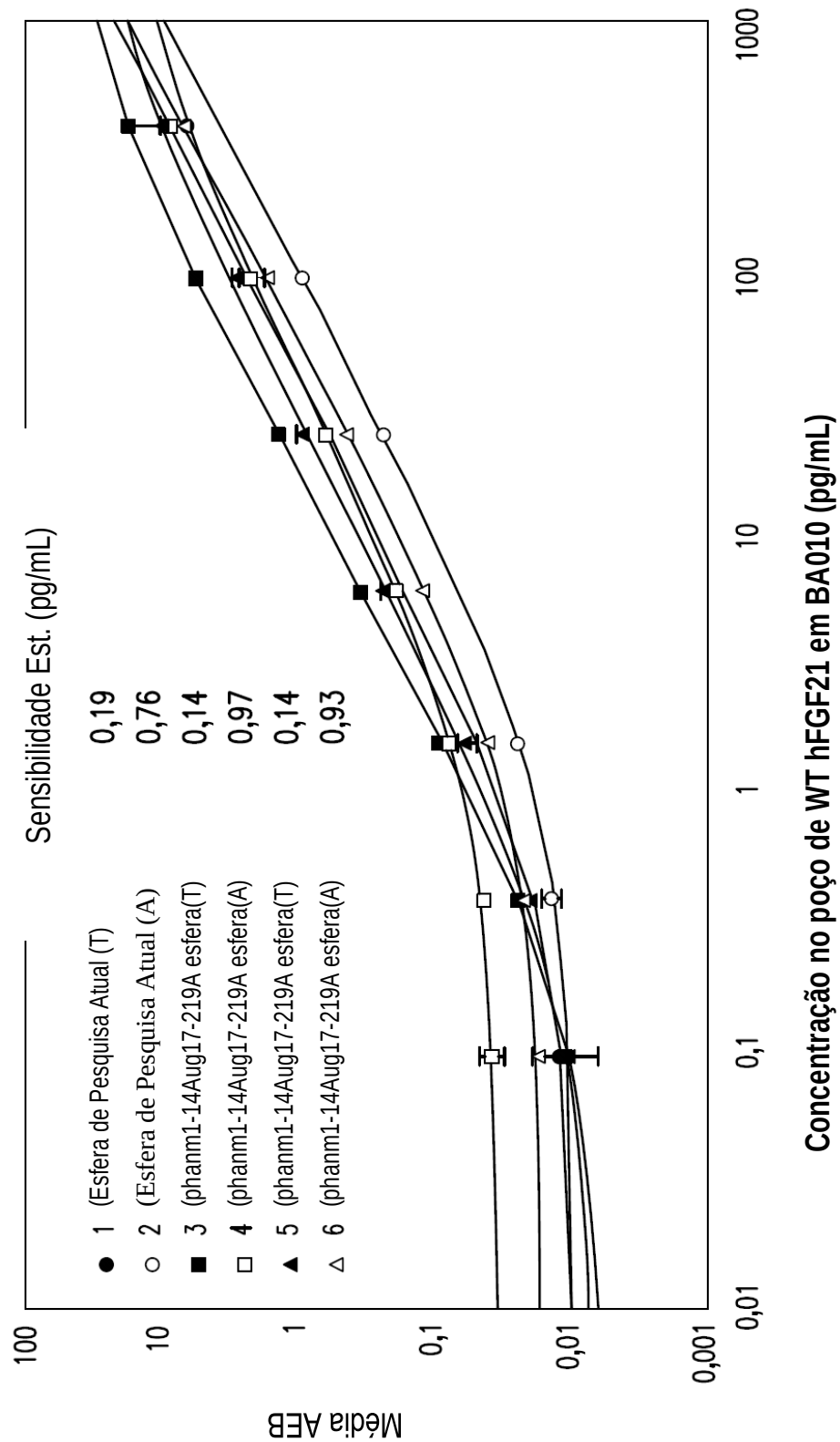


FIGURA 23

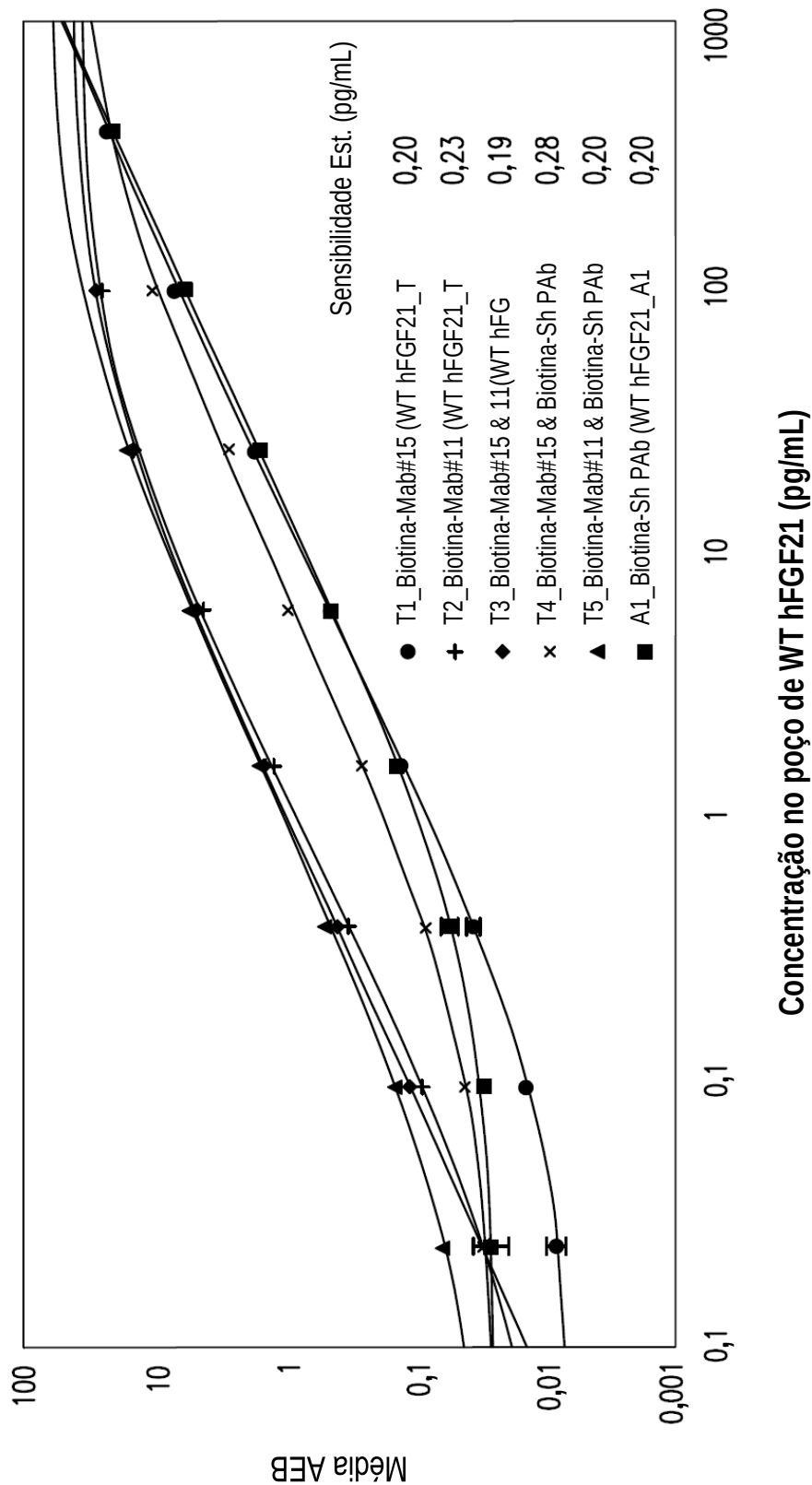
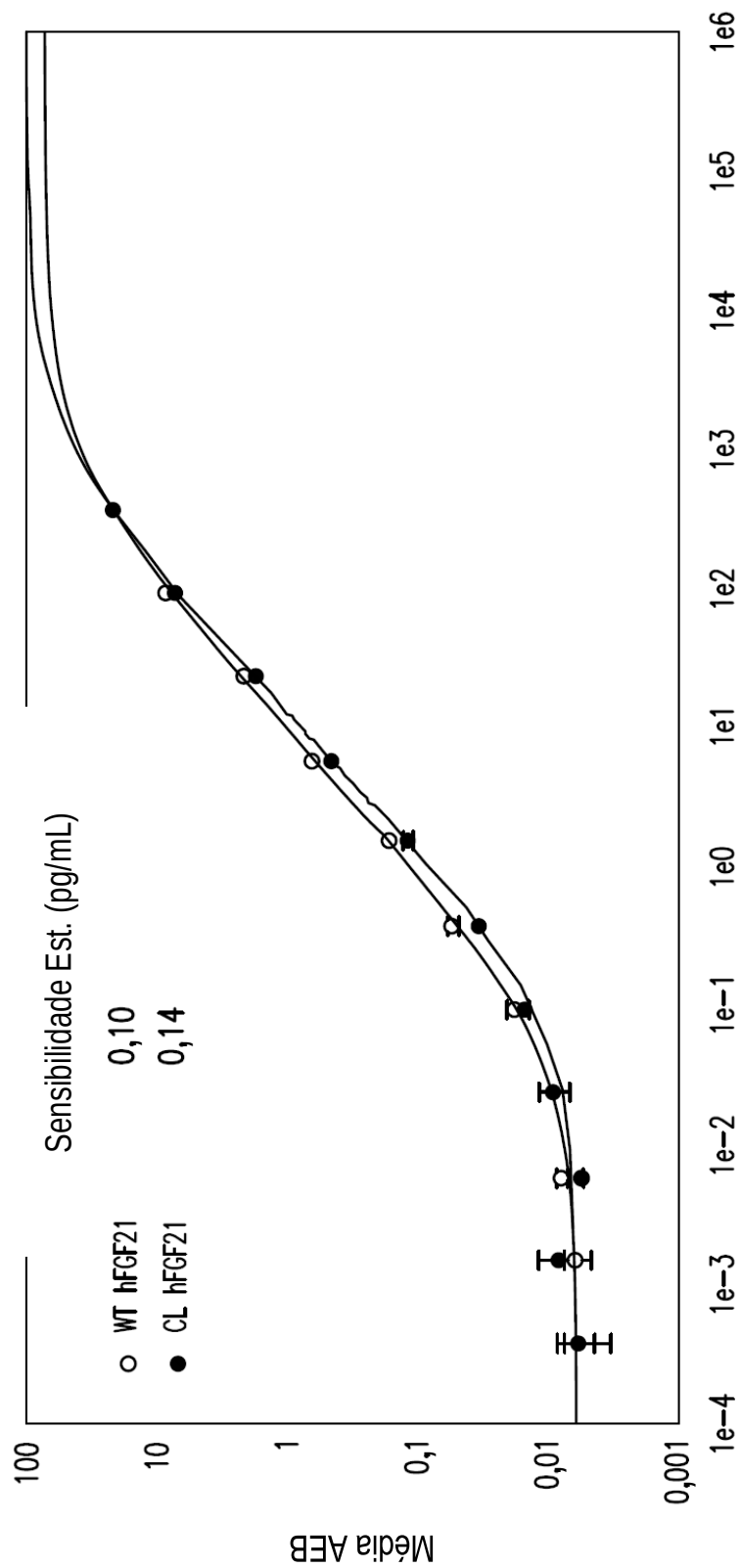
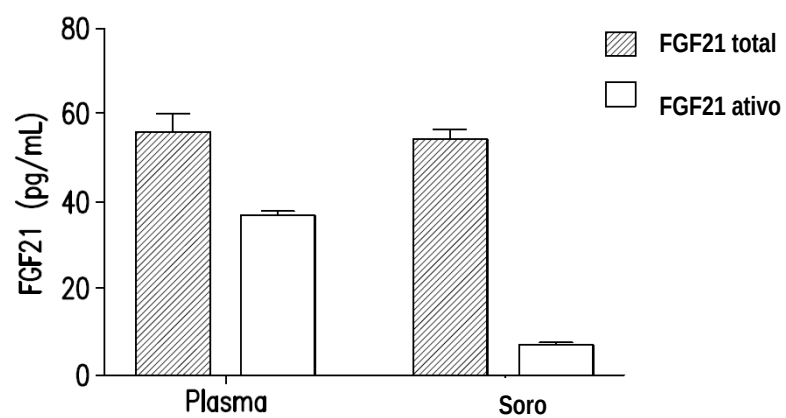


FIGURA 24



Concentração no poço de Wtor CL hFGF21 (pg/mL)

FIGURA 25

**FIGURA 26**

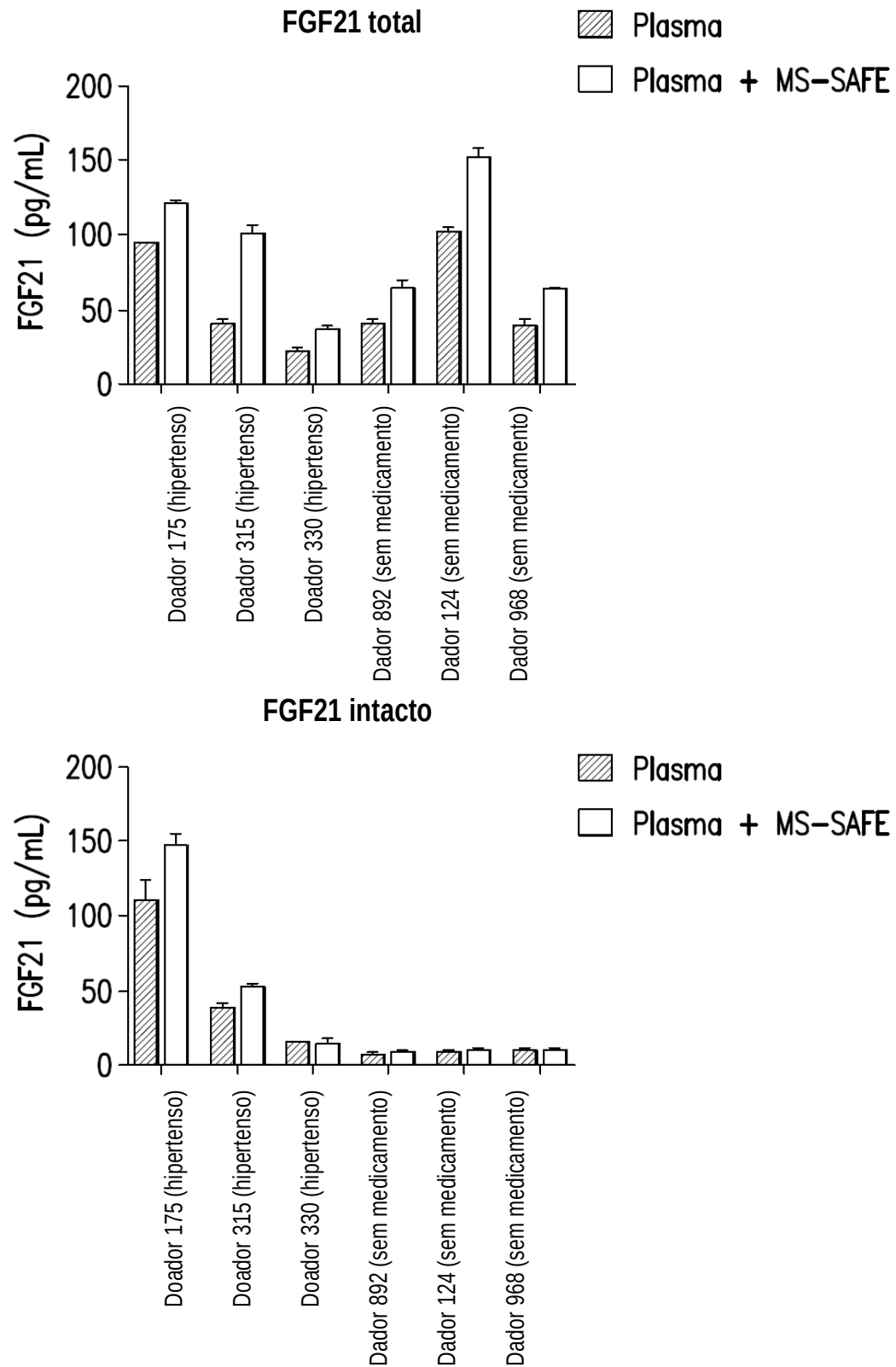
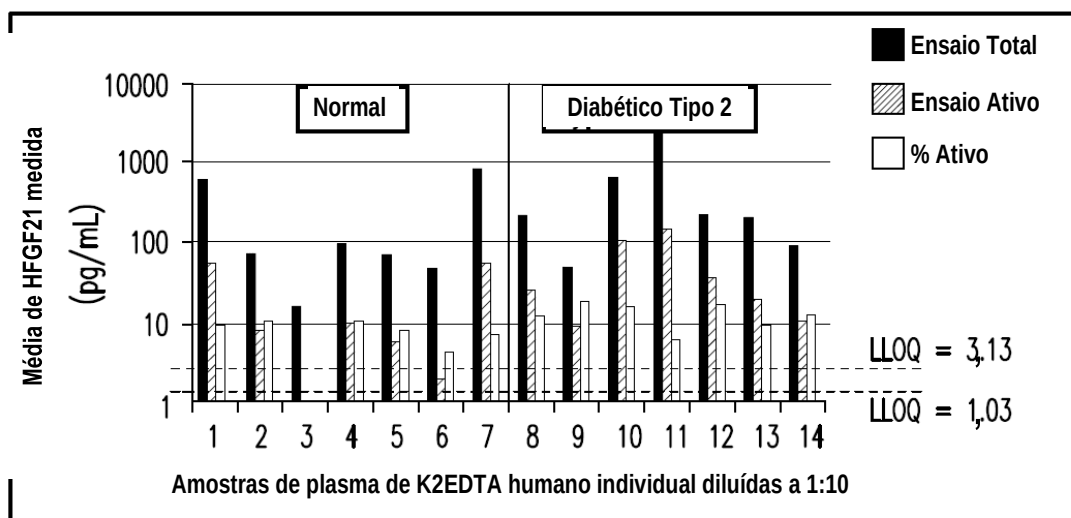


FIGURA 27

Detectabilidade no Ensaio de hFGF21 Total e Ativo (Dia 1)

	Amostra de plasma de K ₂ EDTA	Ensaio Total	Ensaio Ativo	% Ativo
Normal	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
Diabético Tipo 2	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12

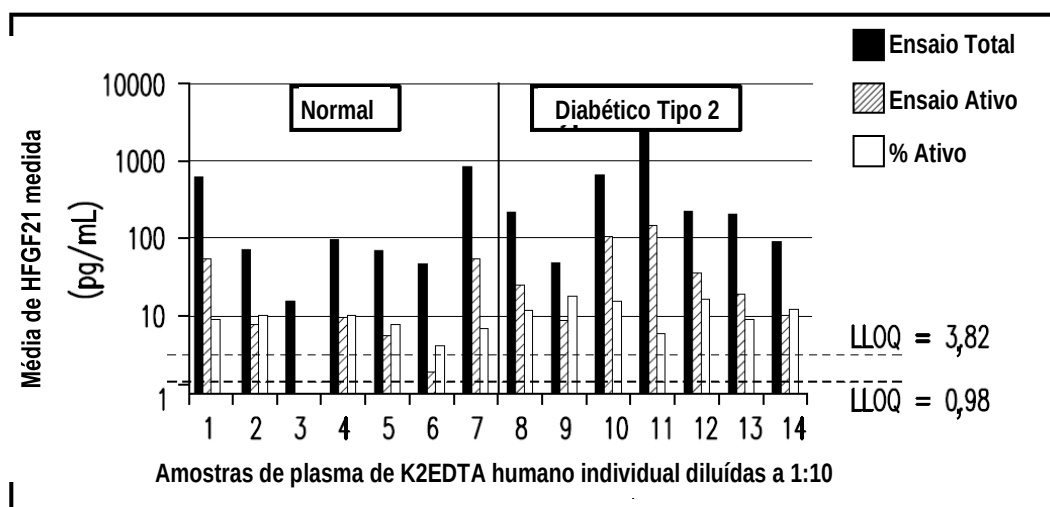


- A detectabilidade é 14/14 (100%) no ensaio total e 12/14 (86%) no ensaio ativo.

FIGURA 28A

Detectabilidade no Ensaio de hFGF21 Total e Ativo (Dia 2)

	Amostra de plasma de K ₂ EDTA	Ensaio Total	Ensaio Ativo	% Ativo
Normal	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
Diabético Tipo 2	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12



- A detectabilidade é 14/14 (100%) no ensaio total e 12/14 (86%) no ensaio ativo.

FIGURA 28B

		Ensaio Total (pg/ml)			Ensaio Ativo (pg/ml)		
	Amostra de plasma de K ₂ EDTA	Dia 1	Dia 2	% de Dif.	Dia 1	Dia 2	% de Dif.
Normal	1	596	345	-42	56	51	-9
	2	75	82	9	8	10	25
	3	17	19	12	0	0	NA
	4	96	93	-3	10	10	0
	5	73	75	3	6	6	0
	6	47	52	11	2	2	0
	7	841	787	-6	60	73	22
Diabético Tipo 2	8	210	255	21	25	30	20
	9	49	57	16	9	11	22
	10	635	620	-2	102	124	22
	11	2389	2163	-9	144	171	19
	12	216	251	16	36	45	25
	13	207	202	-2	19	24	26
	14	85	89	5	10	13	30

FIGURA 29

			Ensaio Total			Ensaio Ativo		
	Amostra de plasma de K ₂ EDTA	Diluição	hFGF21 (pg/mL)	% de Rec de MRD	% de Alteração de MRD	hFGF21 (pg/mL)	% de Rec de MRD	% de Alteração de MRD
Diabético Tipo 2	1	20	112	100	0	27	100	0
		40	110	98	-2	23	86	-14
		80	102	91	-9	16	58	-42
		160	96	86	-14	LTR	NA	NA
		320	98	88	-12	LTR	NA	NA
		640	108	97	-3	LTR	NA	NA
		1280	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	2	20	185	100	0	37	100	0
		40	171	92	-8	34	92	-8
		80	163	88	-12	24	65	-35
		160	157	85	-15	23	63	-37
		320	158	85	-15	LTR	NA	NA
		640	171	92	-8	LTR	NA	NA
		1280	152	82	-18	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	3	20	215	100	0	49	100	0
		40	194	90	-10	42	86	-14
		80	193	90	-10	35	70	-30
		160	186	86	-14	22	45	-55
		320	197	92	-8	LTR	NA	NA
		640	183	85	-15	LTR	NA	NA
		1280	217	101	1	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
	4	20	133	100	0	13	100	0
		40	143	108	8	13	96	-4
		80	132	100	0	LTR	NA	NA
		160	125	94	-6	LTR	NA	NA
		320	106	80	-20	LTR	NA	NA
		640	111	84	-16	LTR	NA	NA
		1280	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA
		2560	LTR	NA	NA	LTR	NA	NA

FIGURA 30

			Ensaio Total			Ensaio Ativo		
	Amostra de plasma de K ₂ EDTA	Diluição	hFGF21 (pg/mL)	% de Rec de MRD	LLOQ (pg/mL)	hFGF21 (pg/mL)	% de Rec de MRD	LLOQ (pg/mL)
Diabético Tipo 2	1	20	112	100		27	100	
		40	110	98		23	86	0.583
		80	102	91		16	58	
		160	96	86		LTR	NA	
		320	98	88		LTR	NA	
		640	108	97	0.169	LTR	NA	
		1280	LTR	NA		LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	2	20	185	100		37	100	
		40	171	92		34	92	0.851
		80	163	88		24	65	
		160	157	85		23	63	
		320	158	85		LTR	NA	
		640	171	92		LTR	NA	
		1280	152	89	0.119	LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	3	20	215	100		49	100	
		40	194	90		42	86	
		80	193	90		35	70	0.432
		160	186	86		22	45	
		320	197	92		LTR	NA	
		640	183	85		LTR	NA	
		1280	217	112	1.069	LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
	4	20	133	100		13	100	
		40	143	108		13	96	0.321
		80	132	100		LTR	NA	
		160	125	94		LTR	NA	
		320	106	80		LTR	NA	
		640	111	84	0.173	LTR	NA	
		1280	LTR	NA		LTR	NA	
		2560	LTR	NA		LTR	NA	
				Média	0.158		Média	0.547
				SD	0.026		SD	0.230
				%CV	16.5		%CV	42.0

LLQ final corrigido para diluição 1:20: 3.15

10.94

FIGURA 31

FIGURA 32

FIGURA 32

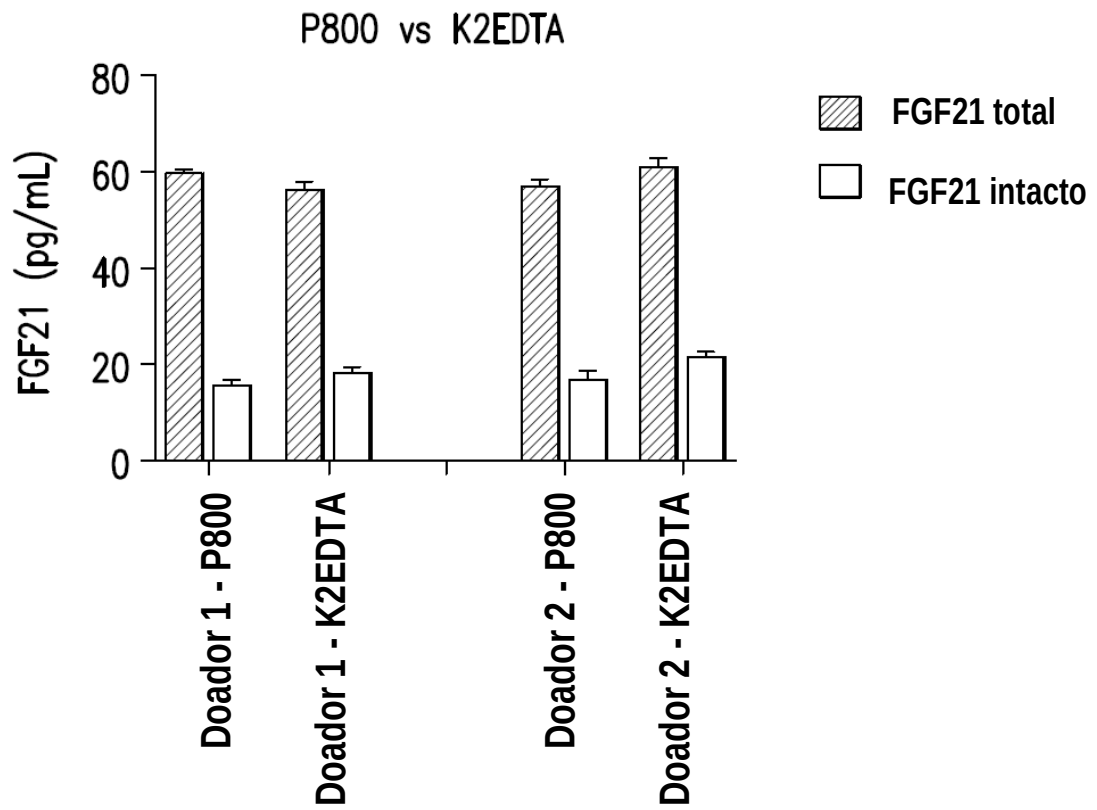


FIGURA 33

	Amostra de plasma	Ensaio Total (pg/ml)			Ensaio Ativo (pg/ml)		
		P800	K ₂ EDTA	% de Dif.	P800	K ₂ EDTA	% de Dif.
Amostras de rastreio do paciente do estudo GC29819	1	91	117	29	11	12	4
	2	607	735	21	145	138	-5
	3	169	184	9	35	34	-4
	4	49	57	16	LTR	LTR	NA
	5	LTR	99	NA	LTR	13	NA
	6	185	212	15	39	43	11
	7	699	840	20	158	166	5
	8	179	167	-7	39	49	27
	9	1137	959	-16	209	255	22
	10	628	557	-11	162	170	5
	11	334	298	-11	164	183	11
	12	122	108	-12	20	23	16
	13	147	128	-13	22	25	15
	14	181	179	-1.2	30	35	16
	15	279	248	-11	61	64	5
	16	132	109	-17	391	418	7
	17	259	249	-4	622	502	-19
	18	442	444	0.3	82	93	13
	19	579	536	-7	127	138	9
	20	148	125	-15	20	24	17
	21	49	47	-5	5	7	51
	22	247	209	-15	53	62	17
	23	211	177	-16	35	41	16
	24	524	557	6	93	110	18
	25	95	94	-2	15	16	8
Média		312	297		110	109	
SD		263	257		143	127	
%CV		84	86		129	117	

FIGURA 34

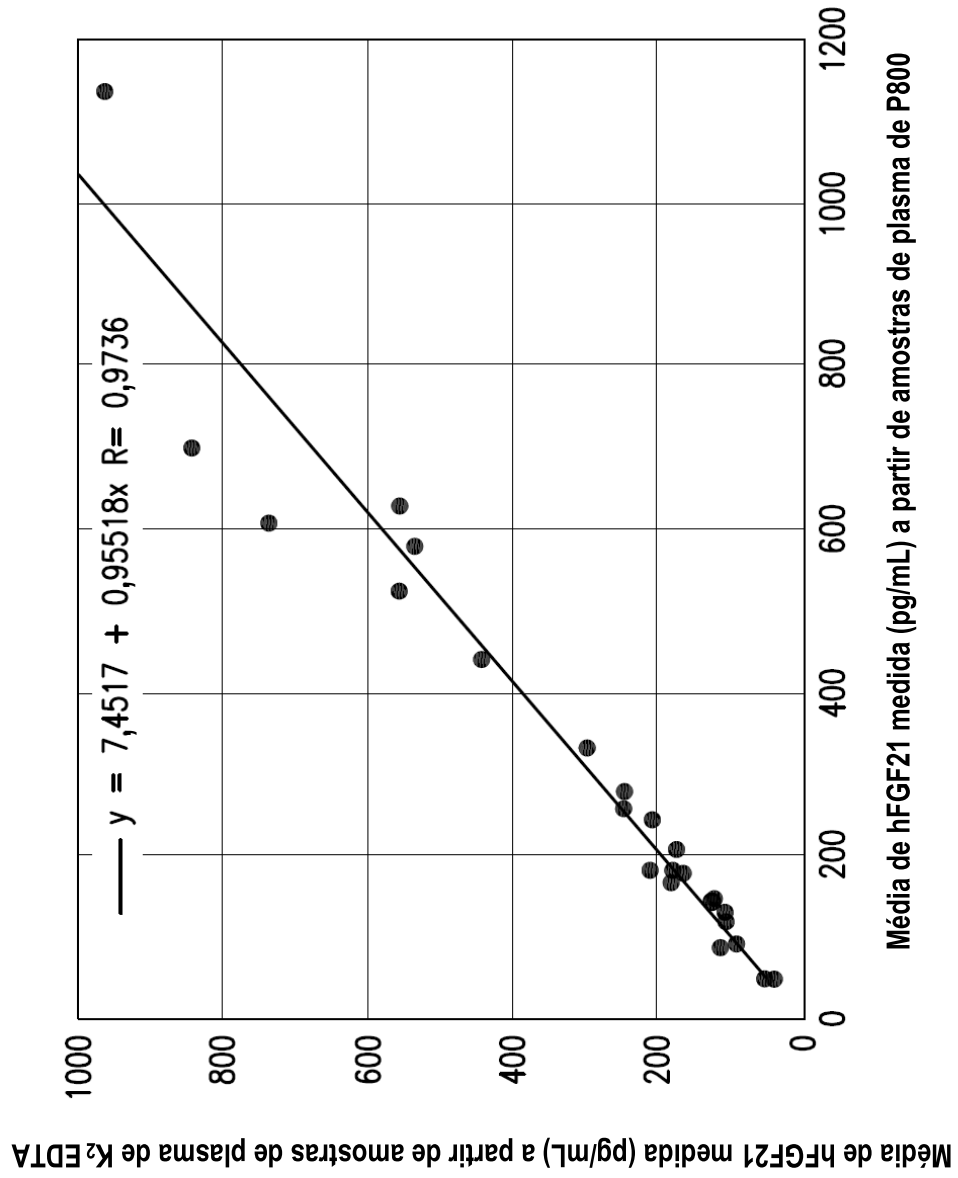


FIGURA 35

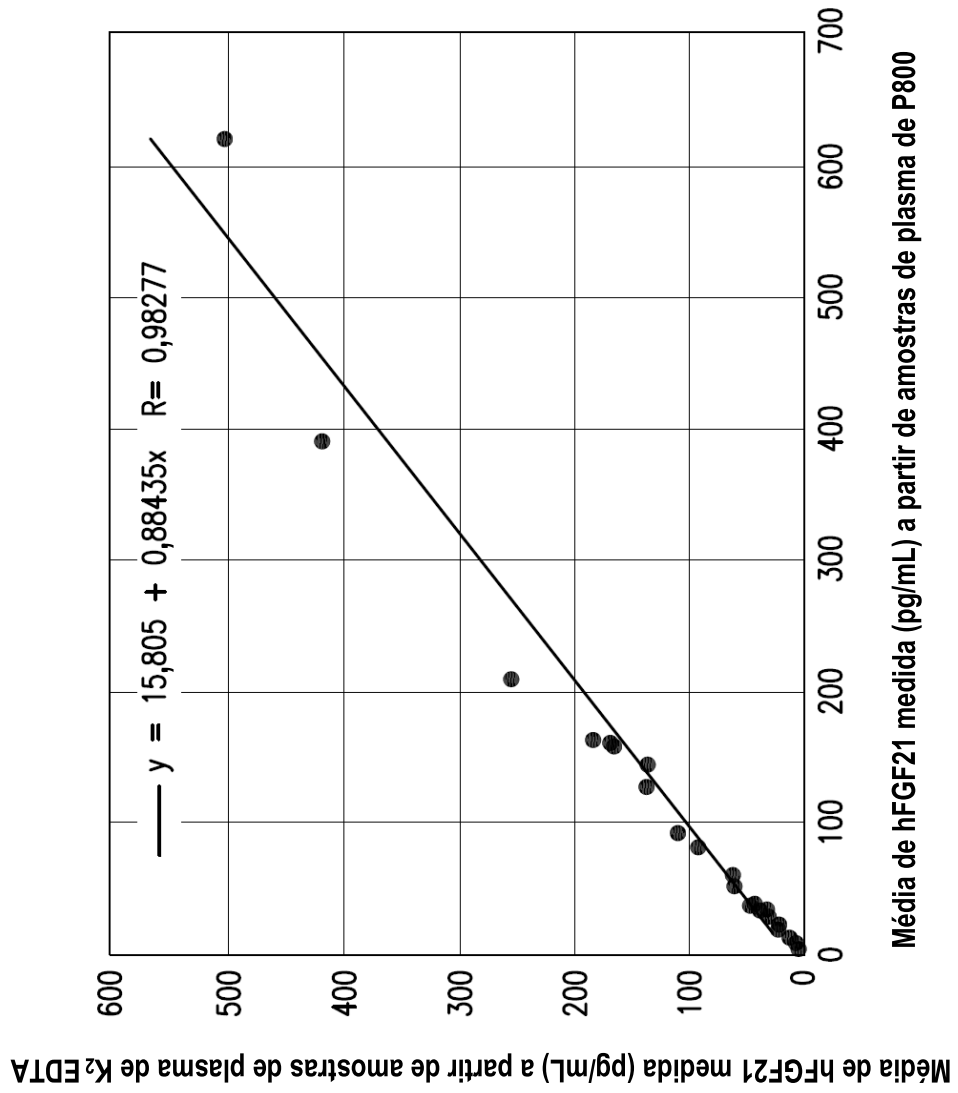


FIGURA 36

Amostras de rastreamento do paciente do estudo GC29819						
Paciente #	Amostra de estabilidade de plasma de P800	Ensaio Total	% de recuperação de 2-8 °C	Ensaio Ativo	% de recuperação de 2-8 °C	% Ativo
1 ng/mL WT hFGF21 em Diluente de Ensaio (AD)	2-8°C	1064	100	885	100	83
	1X F/T	1000	94	853	96	85
	2X F/T	1016	95	837	95	82
	3X F/T	1009	95	843	95	84
20008	2-8°C	425	100	80	100	19
	1X F/T	418	98	96	120	23
	2X F/T	422	99	94	118	22
	3X F/T	427	101	97	122	23
20027	2-8°C	135	100	29	100	22
	1X F/T	121	90	24	82	20
	2X F/T	118	87	24	82	20
	3X F/T	120	89	23	79	19
20024	2-8°C	480	100	107	100	22
	1X F/T	452	94	103	96	23
	2X F/T	425	89	96	90	23
	3X F/T	451	94	102	95	23
20029	2-8°C	122	100	28	100	23
	1X F/T	106	87	24	86	22
	2X F/T	113	92	23	83	20
	3X F/T	104	85	22	81	21
20036	2-8°C	218	100	86	100	39
	1X F/T	199	91	66	77	33
	2X F/T	191	88	63	73	33
	3X F/T	193	88	66	77	34

FIGURA 37

Diluyente de Amostra	Amostras de K ₂ EDTA GC29819	Ensaio total (pg/ml)	Ensaio ativo (pg/ml)	% Ativo
Diluyente de Ensaio	S09	764	268	35
	S10	446	182	41
	S16	130	145	112
	S17	238	290	122
Diluyente de ensaio/10 µg/mL MslgG	S09	629	254	40
	S10	378	162	43
	S16	88	121	138
	S17	151	75	49
Diluyente de ensaio/10 µg/mL ShlgG	S09	755	277	37
	S10	420	167	40
	S16	170	15	9
	S17	254	54	21

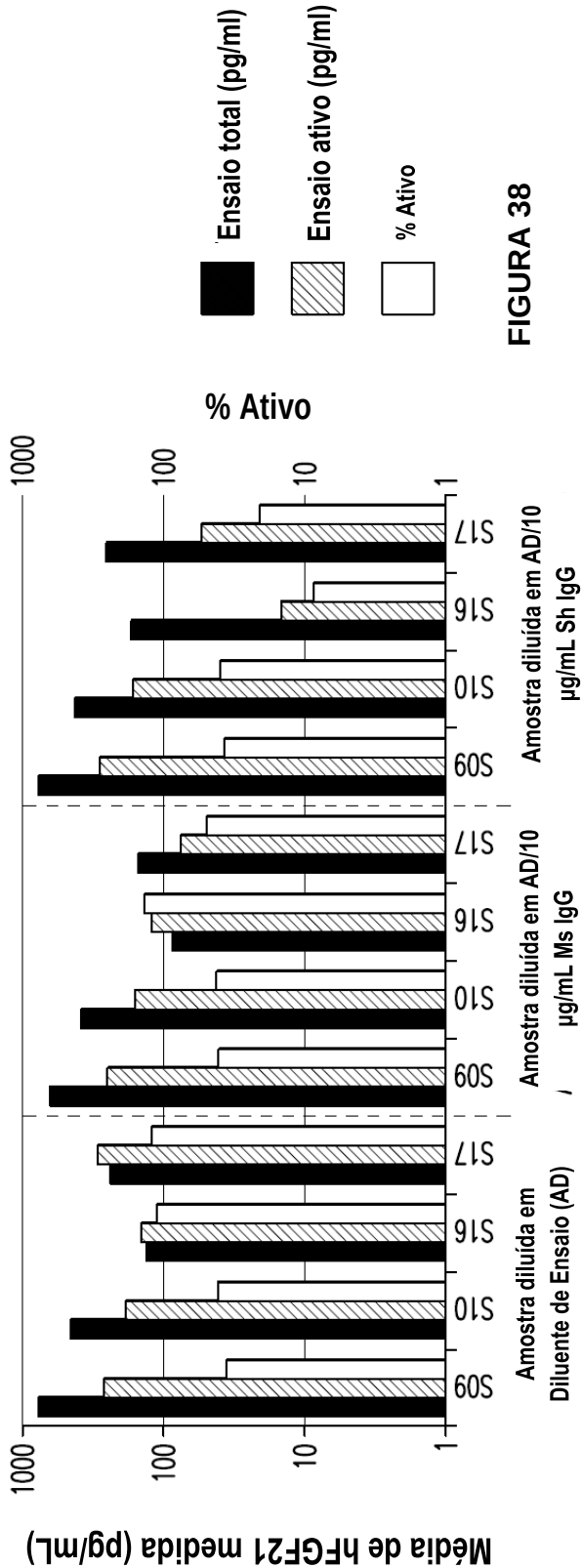


FIGURA 38

Diluyente de Amostra	Amostras de K ₂ EDTA GC29819	Ensaio total (pg/ml)	Ensaio ativo (pg/ml)	% Ativo
Diluyente de Ensaio	S09	738	190	26
	S10	461	122	27
	S16	118	173	146
	S17	191	347	182
Diluyente de ensaio/10 µg/mL Ms & Sh IgG	S09	848	209	25
	S10	501	131	26
	S16	119	18	15
	S17	190	44	23

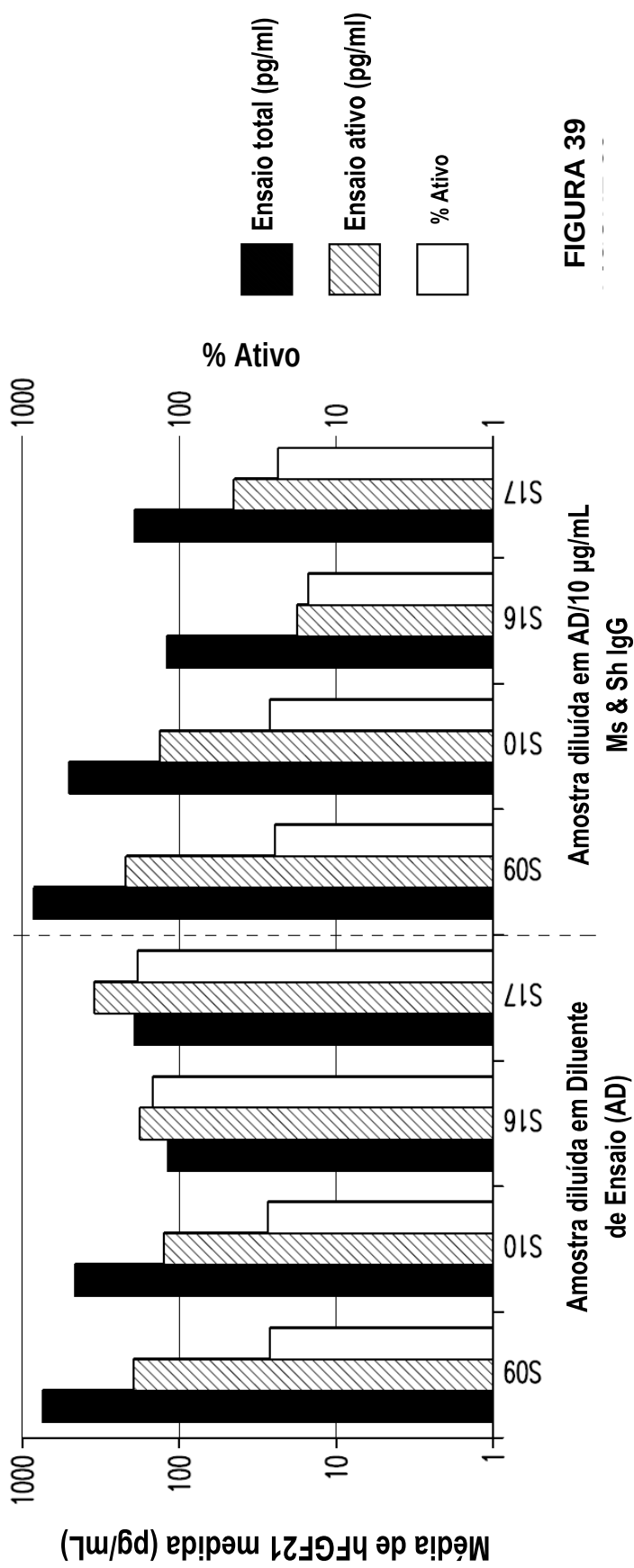


FIGURA 39

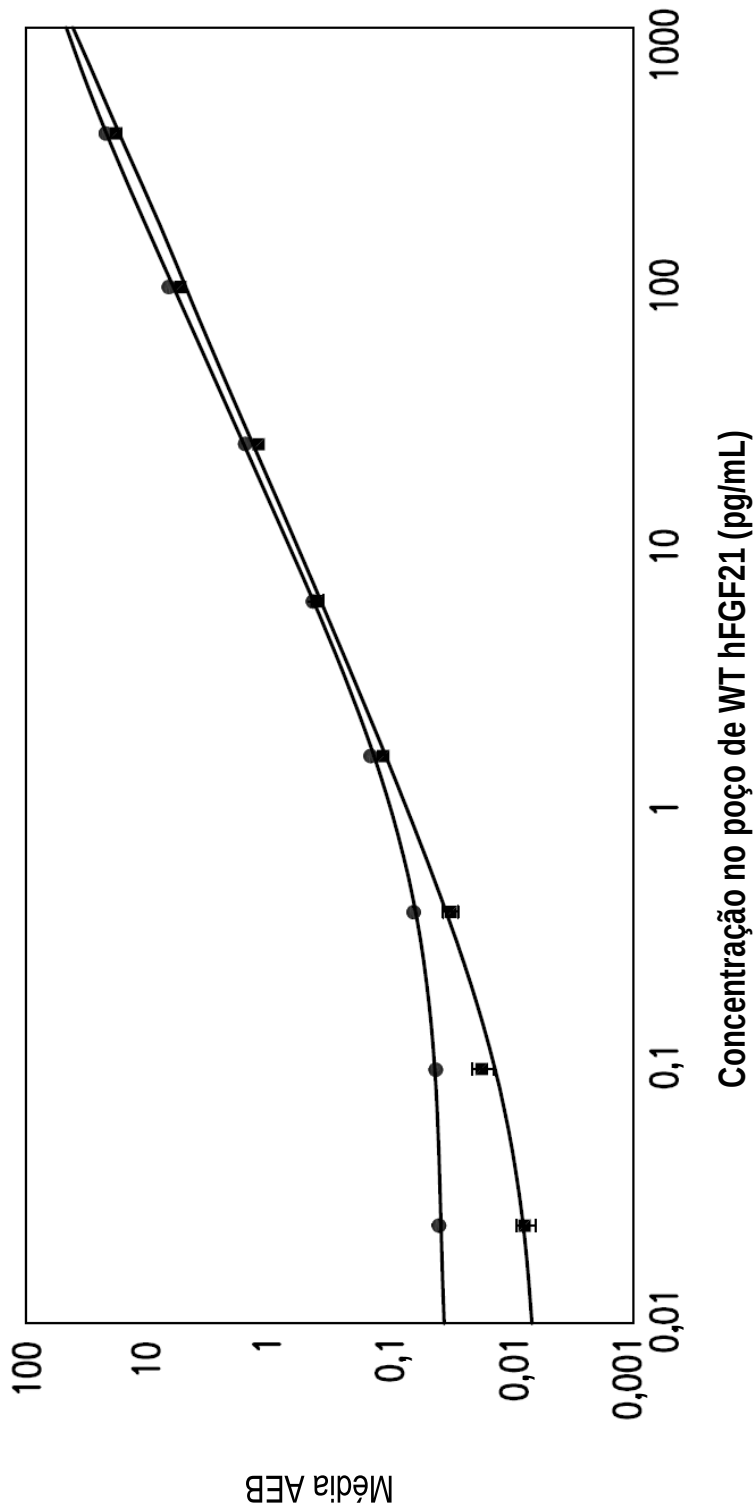


FIGURA 40

CDR L1-Contato	
CDR L1-Chothia	
CDR L1-Kabat	

CDR L1-Kabat

CDR L2-Contato	
CDR L2-Chothia	
CDR L2-Kabat	

CDR L2-Contato	
CDR L2-Chothia	
CDR L2-Kabat	

FIGURA 41A

Número kabat	CDR L3-Contato										956	955	954	953	952	951	950	949	948	947	946	945	944	943	942	941	940	939	938	937	936	935	934	933	932	931	930	929	928	927	926	925	924	923	922	921	920	919	918	917	916	915	914	913	912	911	910	909	908	907	906	905	904	903	902	901	900	899	898	897	896	895	894	893	892	891	890	889	888	887	886	885	884	883	882	881	880																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
	CDR L3-Choithia										T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Reação variável de cadeia pesada		CDR H1 – Contato		CDR H1 – Chothia		CDR H1 – Kabat	
Número kabat		CDR H2 – Contato		CDR H2 – Chothia		CDR H2 – Kabat	
1	E	1	Q	1	Q	1	Q
2	V	2	K	2	L	2	S
3	K	3	L	3	V	3	K
4	L	4	V	4	E	4	S
5	V	5	E	5	S	5	G
6	E	6	S	6	G	6	G
7	S	7	G	7	G	7	P
8	G	8	P	8	P	8	P
9	G	9	P	9	P	9	P
10	D	10	L	10	L	10	L
11	L	11	V	11	V	11	V
12	V	12	K	12	K	12	K
13	K	13	P	13	P	13	P
14	P	14	G	14	G	14	G
15	G	15	G	15	G	15	G
16	S	16	S	16	S	16	S
17	S	17	L	17	L	17	L
18	L	18	K	18	K	18	K
19	K	19	L	19	L	19	L
20	S	20	C	20	C	20	C
21	C	21	A	21	A	21	A
22	A	22	S	22	S	22	S
23	S	23	C	23	C	23	C
24	A	24	A	24	A	24	A
25	S	25	G	25	G	25	G
26	G	26	F	26	F	26	F
27	F	27	T	27	T	27	T
28	T	28	S	28	S	28	S
29	S	29	F	29	F	29	F
30	S	30	S	30	S	30	S
31	S	31	Y	31	Y	31	Y
32	Y	32	D	32	D	32	D
33	G	33	M	33	M	33	M
34	M	34	S	34	S	34	S
35	S	35	W	35	W	35	W
36	W	36	V	36	V	36	V
37	V	37	R	37	R	37	R
38	R	38	Q	38	Q	38	Q
39	Q	39	T	39	T	39	T
40	T	40	P	40	P	40	P
41	P	41	H	41	H	41	H
42	H	42	G	42	G	42	G

FIGURA 41B

Número kabat	CDR H3—Contato																				100b	100a	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
	CDR H3—Chothia																																			
	CDR H3—Kabat																																			
FGF21.GN36.4.	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	H	D	L	V	D	W	Y	F	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.9	S	L	A	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	Y	G	A	L	.	.	.	D	Y	W	G	G	T	G	T	S	V	T	V	S	S
FGF21.GN36.11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	T	R	S	D	Y	G	F	F	.	.	D	Y	W	G	G	T	T	L	T	V	S	S	S	
FGF21.GN36.15	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	G	Y	D	Y	E	F	.	V	Y	W	G	G	T	L	V	T	V	S	A	A	
FGF21.GN36.4	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	H	D	L	V	D	W	Y	F	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.9	S	L	A	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	Y	G	A	L	.	.	D	Y	W	G	G	T	G	T	S	V	T	V	S	S	
FGF21.GN36.11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	T	R	S	D	Y	G	F	F	.	D	Y	W	G	G	T	G	T	T	L	T	V	S	S	
FGF21.GN36.15	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	G	Y	D	Y	E	F	.	V	Y	W	G	G	T	L	V	T	V	S	S		

FIGURA 41B continuada

RESUMO

“MÉTODOS DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, IMUNOENSAIO, KITS PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 TOTAL, PARA DETECTAR A PROTEÍNA FGF21 ATIVA E PARA DETERMINAR A RAZÃO, ANTICORPO ANTI-FGF21 ISOLADO, ANTICORPO ISOLADO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO E COMPOSIÇÃO”

A matéria presentemente divulgada fornece anticorpos que se ligam a FGF21 e métodos de uso destes. Em particular, a presente divulgação fornece métodos de imunoensaio para detectar e quantificar os níveis de FGF21 ativo e total em uma amostra e kits para executar tais métodos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 0888-0018_Filing_Sequence listing_VGD.TXT
- Data de Geração do Código: 28/09/2020
- Hora de Geração do Código: 14:25:29
- Código de Controle:
 - Campo 1: 16001C2C70E55008
 - Campo 2: 19E8475BE8BA81FD