

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 634**

51 Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2011 E 11701494 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2526117**

54 Título: **Proceso para preparación de FGF-21 con grado de O-glicosilación bajo**

30 Prioridad:

18.06.2010 US 356086 P

15.06.2010 EP 10165927

22.01.2010 US 692227

22.01.2010 WO PCT/EP2010/050720

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

20.08.2015

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

SLAABY, RITA y

LAUTRUP-LARSEN, INGER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 634 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para preparación de FGF-21 con grado de O-glicosilación bajo

5 **Campo de esta invención**

Esta invención se refiere a un proceso especial para preparación del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos 21 (FGF21) y análogos del mismo, y aspectos estrechamente relacionados con el mismo.

10 **Antecedentes de esta invención**

Los factores de crecimiento de los fibroblastos son polipéptidos expresados en tejidos en desarrollo y adultos. Los mismos están implicados en varios mecanismos fisiológicos que incluyen, por ejemplo, la regulación del metabolismo y la diferenciación celular. Existe una familia completa de más de 20 factores de crecimiento de los fibroblastos (la familia FGF). Tres miembros de la familia FGF, que incluyen FGF19, FGF21, y FGF23 forman una sub-familia que funcionan como factores endocrinos implicados en la regulación metabólica.

El Factor de Crecimiento de los Fibroblastos 21 o FGF-21, en esta memoria para abreviación FGF21, se expresa preferentemente en el hígado y se ha demostrado que ejerce efectos metabólicos de tipo hormona.

Durante décadas, ha sido posible preparar una extensa gama de péptidos y proteínas recombinantemente, por ejemplo en una bacteria tal como *Escherichia coli* o en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Las proteínas expresadas en levadura están a menudo O-glicosiladas. En las proteínas farmacéuticas, debe evitarse usualmente la O-glicosilación. Por ejemplo, el FGF21 humano está fuertemente O-glicosilado cuando se prepara recombinantemente en levadura.

Mutaciones de FGF21 que están mutadas en varias posiciones en su secuencia y que tienen capacidad reducida para O-glicosilación cuando se expresan en levadura se dan a conocer en WO 2006/028595A2. WO 2009/105357A1 se refiere a células hospedadoras modificadas para producción de glicoproteínas recombinantes que tienen O-glicosilación reducida por delección de varios genes, con inclusión de genes PMT. La reivindicación 1 en US 2002/0068325 se refiere a un método de producción de una proteína heteróloga en hongos que comprende: proporcionar una célula fúngica receptora en la que el mecanismo de control de calidad en dicha célula está modificado de tal modo que las proteínas heterólogas plegadas incompletamente no son degradadas en el retículo endoplásmico; e introducir en dicha célula fúngica receptora un constructo de expresión polinucleotídico. Conforme a la reivindicación 8 de dicho documento, la célula receptora está modificada en el gen de manosil-transferasa que comprende un gen seleccionado del grupo constituido por *PMT1*, *PMT2*, *PMT3*, *PMT4*, *PMT5* and *PMT6*. En dicha solicitud de patente US no se hace referencia a FGF.

40 **Objetos de esta invención**

El objeto esta invención es resolver o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la facilitación de un proceso para preparación eficaz de FGF21 y análogos del mismo.

Otro aspecto de la invención se refiere a la facilitación de un proceso recombinante para preparación de FGF21 y análogos del mismo que tienen un grado de O-glicosilación bajo o que carecen totalmente de O-glicosilación.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la facilitación de un proceso recombinante en el cual la degradación de FGF21 y sus análogos se reduce.

Definiciones

55 La secuencia de la proteína FGF21 humana nativa está disponible de la base de datos UNIPROT con el número de acceso Q9NSA1, y es como sigue:

MDSDETFEHSGLWVSVLAG-
 LLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL-
 KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK-
 60 QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK-
 SPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS. La proteína precursora de 209 aminoácidos incluye un péptido señal (aminoácidos 1-28) y una proteína madura (aminoácidos 29-209). La proteína humana madura se incluye en esta memoria como SEQ ID NO:1 (aminoácidos 1-181), y el péptido señal como SEQ ID NO:2 (aminoácidos 1-28).

65

El término “análogo” como se hace referencia al mismo en esta memoria en el contexto de FGF21, es decir, un análogo de FGF21, se refiere a un polipéptido que se deduce o puede deducirse o derivarse de FGF21 humano nativo, en particular de SEQ ID NO:1, por modificación de la secuencia de aminoácidos de la misma. Dicha modificación, enmienda o cambio puede incluir sustitución, delección, y/o adición de uno o más aminoácidos. En total, preferiblemente se sustituyen, delecionan y/o añaden no más de 8, más preferiblemente no más de 6 aminoácidos. Por ejemplo, pueden añadirse y/o deleccionarse aminoácidos en el término C, en el término N, o internamente en la secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, se añaden y/o se delecionan aminoácidos en el término C y/o N, más preferiblemente en el término N. A las secuencias aminoácidos con aminoácidos deleccionados terminalmente en C o N puede hacerse referencia también como secuencias truncadas, como es conocido en la técnica. Análogamente, puede hacerse referencia a los aminoácidos añadidos internamente en la secuencia como inserciones. El término análogo de FGF21 se refiere a compuestos que tienen efecto de disminución de la glucosa. El efecto de disminución de la glucosa puede determinarse como se describe en WO 2010/0841169, refiriéndose especialmente el ejemplo 8 a un ensayo de potencia para absorción de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Dichos análogos de FGF21 tienen una identidad con FGF21 humana que es al menos 95%. La identidad puede determinarse como se describe en WO 2010/084169, especialmente en las páginas 10 y 11.

En esta memoria, el término “PMT” (Proteína Manosil-Transferasa) abarca enzimas que fijan la primera manosa en residuos serina o treonina en las proteínas, conduciendo a un árbol de O-glicosilación de manosa. Sin embargo, no son todos los residuos serina y treonina los que están O-glicosilados en una proteína. Existen al menos 6 enzimas en la familia PMT (Pmt1-6). Las mismas están agrupadas en 3 sub-familias, representándose cada grupo por Pmt1p, Pmt2p o Pmt4p.

En esta memoria, el término “desactivación” abarca la delección del marco de lectura abierto. La delección puede ser una delección del marco de lectura abierto o sustitución del marco de lectura abierto con un marcador. Con un ‘marcador’ se entienden genes utilizados en genética clásica de levaduras para delección de genes y sustitución con otro gen cuya actividad puede seleccionarse, tal como *TRP1* o *KanMX4*.

En una realización, todos los aminoácidos y residuos de aminoácido considerados en esta memoria son aminoácidos y residuos de aminoácido que pueden estar codificados por el triplón (“codón”) de nucleótidos y, por tanto, los análogos de FCS 21 correspondientes se pueden preparar recombinantemente.

En esta memoria, el término “PMT1” abarca la Proteína-Manosil-Transferasa 1.

En esta memoria, el término “PMT2” abarca la Proteína-Manosil-Transferasa 2.

En esta memoria, el término “PMT4” abarca la Proteína-Manosil-Transferasa 4.

En esta memoria, el término “PEP4” abarca la proteína peptidasa A.

En esta memoria, el término “YPS1” abarca la proteasa aspártica yapsina 1 codificada por YPS1 (denominada también YAP3).

En esta memoria, el término “MKC7” abarca la aspartil-proteasa 7 enlazada a glicosil-fosfatidilinositol. En esta memoria, el término “TRP1” abarca la fosforribosilantranilato-isomerasa 1.

En esta memoria, el término “*kanMX*” se utiliza para el gen de Tn903 que confiere resistencia al antibiótico aminoglicosídico G418 de las levaduras transformadas.

En esta memoria, el término “marcador” se utiliza para genes cuya actividad de producto génico puede seleccionarse.

Breve descripción de esta invención

Resumidamente, la presente invención es como se describe en las reivindicaciones y cláusulas que siguen.

FGF21 y sus análogos, v.g., los análogos con extensiones de aminoácidos N-terminales, pueden expresarse en *Saccharomyces cerevisiae*. Estas extensiones de aminoácidos N-terminales pueden estar constituidas por hasta aproximadamente 20 aminoácidos, con preferencia hasta aproximadamente 15 aminoácidos, y siendo la totalidad de los aminoácidos aminoácidos que pueden estar codificados por el triplón, y prepararse recombinantemente. En la presente invención, esto requiere el diseño de una cepa en el cual se crea una cepa desorganizada en *PMT2*, *PEP4* e *YPS1*. Esta cepa puede diseñarse utilizando técnicas clásicas basadas en recombinación homóloga que permite integración específica en los loci respectivos. FGF21 y sus análogos, v.g., análogos con extensión o mutaciones N-terminales, están codificados en un vector de expresión de *S. cerevisiae* que puede mantenerse en *S. cerevisiae*. Para dirigir el análogo de FGF21 al camino secretor, puede proporcionarse una secuencia pre-pro que incluye un péptido señal (por ejemplo la secuencia conductora pre-pro MFα) en el vector de expresión recombinante. Esta secuencia está unida al DNA codificante del análogo de FGF21 en marco de lectura correcto. Este péptido señal asegura la secreción al medio. Aguas arriba y adyacente a la secuencia del análogo de FGF21, se encuentra una

secuencia de aminoácidos dibásicos que asegura la escisión de la secuencia pre-pro del análogo de FGF21 antes de la secreción al medio. La escisión está causada probablemente por actividad de Kex2p. El análogo de FGF21 puede recogerse del medio.

5 Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que el problema con el FGF21 O-glicosilado y sus análogos cuando se utilizaba levadura de tipo salvaje se resolvía por desorganización de *PMT2* en la cepa de expresión. Por delección de *PMT 2* de la cepa de levadura de tipo salvaje se redujo la O-glicosilación de FGF21 y sus análogos.

10 **Descripción detallada de esta invención**

Se ha comprobado que la expresión de FGF21 en una cepa de levadura de *S. cerevisiae* de tipo salvaje es problemática cuando el FGF21 y sus análogos están fuertemente O-glicosilados. Esta invención describe la solución a este problema por expresión de FGF21 y sus análogos en una cepa de levadura *pmt2* desactivada. Ésta es una
15 cepa en la que el gen hospedador *PMT2* que codifica la Proteína Manosil Transferasa 2 (Pmt2p) ha sido eliminado de una manera que es irreversible.

En la levadura de tipo salvaje, el gen codificante Pmt2p puede desorganizarse utilizando técnicas clásicas basadas en recombinación homóloga que permiten el reemplazamiento específico del gen *PMT2* de tipo salvaje por
20 integración de un alelo de delección en el locus *PMT2*, utilizando otro gen como marcador seleccionable. El marcador seleccionable es un gen cuya actividad puede seleccionarse para marcadores tales como *TRP1*, *KanMX4* u otros.

FGF21 y sus análogos pueden expresarse subsiguientemente por plásmidos de expresión en esta cepa de levadura desactivada, dando como resultado O-glicosilación reducida. Es ventajoso combinar la desactivación de *pmt 2* con
25 desactivaciones de proteasas en los genes *PEP4*, *YPS1 (YAP3)* y *MKC7 (YPS2)* para evitar la degradación de la proteína expresada.

Generalmente, el DNA se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en orientación apropiada y marco de lectura correcto para expresión. El vector se introduce luego en el hospedador por técnicas estándar y,
30 generalmente, será necesario seleccionar células hospedadoras transformadas.

Las células hospedadoras que han sido transformadas por el DNA recombinante utilizado en esta invención se cultivan luego durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la doctrina expuesta en esta memoria para permitir que se produzca la expresión y secreción de FGF21 y sus análogos conforme al método de la invención. El especialista experto en la técnica está capacitado para un medio de cultivo y condiciones de cultivo apropiadas y recuperar FGF21 del medio después del cultivo.

Vectores plasmídicos de levadura útiles incluyen el cPOT (Kjeldsen et al. en Gene 170: 107-112, 1996) y YEp13, YEp24 (Rose and Broach en Methods in Enzymol. 185: 234-279, 1990), y plásmidos pG (Schena et al. en Methods in Enzymol. 194: 289-398, 1991).

Métodos para la transformación de *S. cerevisiae* incluyen la transformación de esferoplastos, transformación con acetato de litio, y electroporación, véase Methods in Enzymol. 124 (1991). Preferiblemente, la transformación es como se describe en los ejemplos de esta memoria.

Promotores adecuados para *S. cerevisiae* incluyen el promotor *MFa1*, promotores inducibles por galactosa tales como los promotores *GAL1*, *GAL7* y *GAL10*, promotores de enzimas glicolíticas que incluyen promotores *TPI1* y *PGK1*, promotor *TRP1*, promotor *CYC1*, promotor *CUP1*, promotor *PHO5*, promotor *ADH1*, y promotor *HSP*. Un promotor adecuado en el género *Pichia* es el promotor *AOX1* (utilización de metanol).

La señal terminal de la transcripción es preferiblemente la secuencia flanqueante 3' de un gen eucariota que contiene señal apropiada para terminación de la transcripción y poliadenilación. Secuencias flanqueantes 3' adecuadas pueden, v.g. ser las del gen enlazado naturalmente a la secuencia de control de la expresión utilizada, es decir, la correspondiente al promotor.

Los constructos de DNA que se utilizan para proporcionar expresión secretora del FGF21 deseado o análogo del mismo comprenden una secuencia de DNA que incluye una secuencia conductora enlazada al polipéptido por una señal de procesamiento de levadura. La secuencia conductora contiene un péptido señal ("secuencia pre") para translocación de proteínas a través del retículo endoplásmico y contiene opcionalmente una secuencia adicional ("secuencia pro"), que puede estar escindida o no en las células de levadura antes de liberar el polipéptido al medio circundante. Conductores útiles son el péptido señal de *S. cerevisiae* (MFa1p, MFa1*, Yap3p, Bar1p, Hsp150p y los péptidos señal de *S. kluyveri* MFa y secuencias pre-pro de *S. cerevisiae* MFa1, Yap3p, Prep, Hsp150p, y *S. kluyveri* MFa y secuencias conductores sintéticas descritas en WO 92/11378, WO 90/10075 y WO 95/34666.

65

La secuencia de DNA que codifica el FGF21 deseado o análogo del mismo puede ser de origen genómico o cDNA, pudiendo obtenerse por ejemplo por preparación de una biblioteca de DNA genómico o cDNA y cribado para secuencias de DNA codificante para la totalidad o parte del polipéptido por hibridación utilizando sondas de oligonucleótido sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de DNA que codifica FGF21 o un análogo del mismo puede prepararse también sintéticamente por métodos estándar establecidos, v.g. el método del fosfoamido descrito por Beaucage y Caruthers en *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al. en *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de DNA se puede preparar también por reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o por Saiki et al. en *Science* 239 (1988), 487 - 491.

La expresión de FGF21 o análogos del mismo en esta cepa *pmt2* desactivada no cambiaba el nivel de expresión en una cantidad sustancial comparado con el nivel de expresión utilizando una cepa desactivada distinta de *pmt 2* pero, como se menciona en esta memoria, reducía significativamente la O-glicosilación.

En una realización de esta invención, la expresión de FGF21 o análogos del mismo se realiza utilizando una cepa de levadura que tiene desactivaciones de *YPS 21*, *PEP 4* y *PMT 2*.

En una realización de esta invención, la expresión de FGF21 o análogos del mismo se realiza utilizando una cepa de levadura que tiene desactivaciones de *YPS 21*, *PEP 4* y *MKC7*.

En una realización de esta invención, la expresión de FGF21 o análogos del mismo se realiza utilizando una cepa de levadura que tiene desactivaciones de *YPS 21*, *PEP 4*, *MKC7* y *PMT 2*.

En una realización de esta invención, el análogo de FGF21 contiene Ala o His en posición 17 y/o 36. Por este medio, el grado de degradación es menor.

Si el objetivo consiste en preparar FGF21 humano, el proceso de esta invención debe realizarse en condiciones en las cuales la ratio entre FGF21 O-glicosilado y FGF21 no O-glicosilado obtenida es menor que aproximadamente 20%, preferiblemente menor que aproximadamente 10%, de modo más preferido menor que aproximadamente 5%, y de modo aún más preferido menor que aproximadamente 2% (peso/peso). Análogamente, esto es aplicable si el objetivo consiste en preparar un análogo de FGF21.

Características preferidas de esta invención

Para resumir y complementar las afirmaciones anteriores, las características de esta invención son como se define en las reivindicaciones.

Los ejemplos que siguen se ofrecen a modo de ilustración, no de limitación.

Ejemplo

Procedimientos generales.

Todos los plásmidos de expresión son del tipo cPOT, análogos a los descritos en EP 171.142. Éstos son vectores de expresión basados en 2μ caracterizados por contener el gen de triosa-fosfato-isomerasa (POT) de *Schizosaccharomyces pombe* para el propósito de selección y estabilización de plásmidos en *S. cerevisiae*. Los plásmidos contienen también el promotor y el terminador de triosa-fosfato-isomerasa de *S. cerevisiae*. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descrito en WO 90/10.075). A fin de facilitar la clonación de proteínas de fusión diferentes, la secuencia de DNA que codifica el conductor pre-pro *MFa1* ha sido modificada para incorporar un sitio *NcoI* y se conoce como el conductor pre-pro *MFa**. Así, el fragmento *NcoI-XbaI* se reemplaza simplemente por un fragmento *NcoI-XbaI* que codifica el constructo FGF21 o el de un análogo del mismo. Tales fragmentos *NcoI-XbaI* pueden sintetizarse utilizando oligonucleótidos sintéticos y PCR conforme a técnicas estándar. Además del conductor α pueden utilizarse otros conductores.

Se prepararon transformantes de levadura y derivados de los mismos por transformación de las cepas del hospedador *S. cerevisiae*. Las cepas de levadura se dejaron crecer en YPGGE (1% extracto de levadura Bacto, 2% peptona Bacto, 2% galactosa, 2% glicerol, 1% etanol) hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Se recogieron por centrifugación 100 mL de cultivo, se lavaron con 10 mL de agua, se recentrifugaron y resuspendieron en 10 mL de una solución que contenía 1,0 M sorbitol, 25 mM Na_2EDTA de pH 8,0 y 6,7 mg/mL ditiotreitól. La suspensión se incubó a 30°C durante 15 min, se centrifugó y las células se resuspendieron en 10 mL de una solución que contenía 1,0 M sorbitol, 10 mM Na_2EDTA , 0,1 M citrato de sodio de pH 5,8, y 2 mg Glucanex 200G (Novozym). La suspensión se incubó a 30 °C durante 30 min, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron en 10 mL de 1,2 M sorbitol y 10 mL de CAS (1,0 M sorbitol, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris HCl, pH 7,5) y se resuspendieron en 2 mL de CAS. Para la transformación, se mezcló 1 mL de células suspendidas en CAS con aproximadamente 0,1 mg de DNA plasmídico y se dejó a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 1 mL de (20% polietilenglicol

4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl, pH 7.5) y la mezcla se dejó durante 30 minutos más a la temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó y el pellet se resuspendió en 0,1 mL de SOS (1,2 M sorbitol, 33% v/v YPD, 6,7 Mm CaCl₂) y se incubó a 30 °C durante 2 horas. La suspensión se centrifugó luego y el sedimento se resuspendió en 0,5 mL de sorbitol 1,2 M. Se añadieron después 6 mL de agar superior (el medio SC de Sherman et al. (1982) en Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) que contenía sorbitol 1,2 M más 2,5% de agar a 52°C y la suspensión se vertió sobre placas que contenían el mismo medio que contenía sorbitol solidificado en agar.

Ejemplo 1

10 **Desorganizaciones de genes *pmt1::KanMX4*, *pmt2::KanMX4* and *pmt4::KanMX4* en ME1487**

Se adquirió una cepa de levadura BY4741-*pmt2* con el gen *PMT2* deleciónado y el genotipo *Mat a his3D1 leu2D0 lys2D0 ura3D0 yal023c::kanMX4*, de la colección de levaduras de deleción Euroscarf. En esta cepa de levadura, el fragmento de DNA que codifica el marco de lectura abierto *PMT2* se ha reemplazado con el marcador seleccionable dominante *KanMX4*, que confiere resistencia al antibiótico G418/geneticina (Wach et al. Yeast 10 (1994)1793-1808.

Se aisló DNA genómico de BY4741 y se utilizó como molde en una reacción PCR estándar con los oligonucleótidos sintéticos oLLa-0056: CCGTTTCGTGTACTGTTTA y oLLa-0079: GGCTAAAGGGTTCAGAAAT a fin de amplificar un fragmento de DNA sintético que contenía la casete del alelo de deleción Δ *pmt2::KanMX4*. Este fragmento de DNA se utilizó directamente para transformación de ME1487: *MATa, tpi::LEU2 pep4-3 leu2 ura3 yps1::URA3* (Egel-Mitani et al. Enzyme and Microbial Technology 26 (2000), 671-677) que contenía el plásmido cPOT que expresa FGF21. La transformación de la levadura se realizó por el método acetato de litio/DNA portador monocatenario/polietilenglicol (Methods in Enzymology: 350, 87 - 96). Después de la transformación, las células de levadura se extendieron en placas sobre agar YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) y se incubaron durante una noche a 30°C seguido por replicación en placas sobre agar selectivo YEPD + 200 mg/L G418. Se aislaron las colonias de levadura que aparecían después de 3 días de incubación ulterior a 30°C y se caracterizaron por PCR, lo que demostró la integración correcta del alelo *pmt2::KanMX4* en el locus *PMT2* y confirmó así el reemplazamiento del alelo de tipo salvaje con el alelo de deleción. El genotipo de la cepa resultante, yDNP-255, era *MATa, tpi1::LEU2 pep4-3 leu2 ura3 yps1::URA3 pmt2::kanMX4*. yDPN-255 contenía el plásmido cPOT que expresaba FGF21.

Análogamente, el locus *PMT1* y *PMT4* se desorganizaron, creando las cepas:

yDNP-257: *MATa, tpi1::LEU2 pep4-3 leu2 ura3 yps1::URA3 pmt1::kanMX4* y
yDNP-260: *MATa, tpi1::LEU2 pep4-3 leu2 ura3 yps1::URA3 pmt4::kanMX4*. Ambas contenían el plásmido cPOT que expresaba FGF21.

Ejemplo 2

40 **Desorganización del gen *pmt2::TRP1-FA* en NNY574**

El marcador auxótrofo, la deleción *trp1-FA*, se introdujo en una cepa sustrato de *S.cerevisiae* para facilitar la desactivación clásica en un solo paso de genes relevantes, como ha sido descrito por Horecka and Jigami Yeast 15 (1999) 1769-1774; The *trp1-FA* designer deletion for PCR-based gene functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 15, 1769-1774). El fragmento deleciónado del locus *TRP1* correspondía exactamente a una casete denominada *TRP1-FA*, transportada en muchos vectores de levadura, y estaba compuesto por 141 pb de la región 5' no traducida seguidos por el marco de lectura abierto *TRP1*, seguido a su vez por 50 pb de la región 3' no traducida. Para introducir la deleción *trp1-FA*, la cepa de interés se transformó con un fragmento PCR que contenía las regiones 5' y 3' fusionadas no traducidas aún más aguas arriba y aguas abajo de la región *TRP1-FA* para una deleción clásica en un solo paso de *TRP1-FA*. La deleción de la región *TRP1-FA* se verificó por PCR. Esta cepa tenía entonces el gen *PMT2* deleciónado por transformación con un fragmento de DNA constituido por la casete *TRP1-FA* flanqueada por la región 5' no traducida de *pmt2* y la región 3' no traducida de *pmt2*, seguido por selección para el fenotipo marcador *TRP1-FA*. La recombinación del alelo *pmt2::TRP1-FA* en el locus *PMT2* dio como resultado el reemplazamiento del gen *PMT2* de tipo salvaje con el alelo *pmt2::TRP1-FA*. Las células de levadura aisladas se caracterizaron por métodos genéticos clásicos de levadura. La integración correcta se confirmó por PCR.

Ejemplo 3

Se utilizó análisis por transferencia Western para determinar el efecto de la desactivación de *pmt1*, *pmt2* y *Pmpmt4* sobre la expresión de FGF21 comparada con una cepa de tipo salvaje. Muestras de medios de las cepas de levadura cultivadas que secretaban FGF21 se pasaron sobre BisTris SDS-PAGE al 4-12% en tampón Mes-SDS. Las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a nitrocelulosa y se sometieron a inmunotinción con el anticuerpo policlonal de cabra FGF21 (Santa Cruz sc-16842), y el anticuerpo secundario anti-cabra de burro IgG-HRP (Santa Cruz sc-2020). Para detección se utilizó el método de detección por quimiofluorescencia. El resultado fue que en la cepa de tipo salvaje FGF21 migraba como una banda doble. Cuando se deleciónó *PMT4*, ello no tenía efecto

alguno. Cuando se delecionó *PMT1*, ello tenía cierto efecto, pero cuando se delecionó *PMT2* FGF21 migraba como una banda simple y la O-glicosilación disminuyó significativamente.

Ejemplo 4

La delección del gen *PMT2* del hospedador puede utilizarse para expresión secretora de análogos de FGF21 en *S. cerevisiae*. En los análogos de FGF21, los aminoácidos pueden estar modificados o cambiados, sustituidos, delecionados, y/o pueden añadirse uno o más aminoácidos o combinaciones de los mismos. Cuando los análogos de FGF21 se expresan en el hospedador *S. cerevisiae*, con delección del gen *PMT2*, la O-glicosilación disminuye significativamente. Esto puede observarse mediante análisis por transferencia Western del medio de crecimiento por cultivo de la cepa de *S. cerevisiae* que secreta FGF21 o análogos de FGF21, como se describe en el Ejemplo 3. FGF21 y sus análogos migran como una banda doble cuando se secretan a partir de una cepa de tipo salvaje. Esto cambia cuando la expresión es a partir de un hospedador de *S. cerevisiae* desactivado en *pmt2*. Entonces, FGF21 humano y el análogo de FGF21 migrarán como una banda simple.

Para expresión del análogo de FGF21, se insertó la secuencia deseada en el vector de expresión cPot y se transformó en la cepa desactivada *pmt2* descrita en el Ejemplo 3 anterior. Se produjeron análogos de FGF21 que comprendían las mutaciones, inserciones y/o extensiones siguientes:

- 1) -1G, K56R, K59R, K69R, K122R
- 2) -5G, -4S, -3G, -2S, -1G, K56R, K59R, K69R, D102E, N121Q, K122R, M168L
- 3) -14E, -13E, -12A, -11E, -10A, -9G, -8G, -7A, -6G, -5G, -4S, -3G, -2G, -1S, K56R, K59R, K69R, K122R
- 4) -15E, -14E, -13S, -12A, -11A, -10S, -9G, -8A, -7A, -6A, -5G, -4S, -3A, -2A, -1A, K56R, K59R, K69R, K122R)
- 5) K56R, K59R, K69R, K122R)
- 6) -5G, -4S, -3G, -2S, -1G, K56R, K59R, K69R, K122R)
- 7) -1G

Los sobrenadantes de los cultivos de levadura que secretaban los compuestos anteriores se analizaron por transferencia Western como se describe en el Ejemplo 3. Se observó que sólo aparecía una banda simple visualizada con el anticuerpo policlonal FGF21 en la transferencia Western y no una banda doble como FGF21 en una cepa de *S. cerevisiae* de tipo salvaje, confirmándose el efecto de la delección de *pmt2* en la cepa de expresión.

La nomenclatura utilizada para los compuestos anteriores es como se describe en WO 2010/084169, especialmente en las páginas 6-11.

Ejemplo 5

Se utiliza análisis LC-MS empleando un instrumento LC/MSD TOF (Agilent) para determinar la masa molecular de los péptidos secretados en sobrenadantes de levadura conforme a los ajustes recomendados por el fabricante. La simplificación del cromatograma TLC se realiza utilizando el software que se acompaña. La abundancia de las especies de longitud total y O-glicosilados se obtiene a partir del espectro simplificado y se utiliza para estimación del porcentaje de péptido de longitud total frente al conjunto de FGF21 de longitud total y O-glicosilado.

La citación e incorporación de documentos de patente en esta memoria se ha hecho únicamente por conveniencia y no refleja opinión alguna en cuanto a la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de tales documentos de patente. La mención de referencias en esta memoria no es admisión alguna de que las mismas constituyan técnica anterior.

Todos los títulos y subtítulos se utilizan en esta memoria únicamente por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención en modo alguno.

El uso de cualquiera y la totalidad de los ejemplos, o expresiones lingüísticas ilustrativas (v.g., "tal(es) como") proporcionados en esta memoria, debe entenderse meramente para aclarar mejor la invención, y no supone limitación alguna en cuanto al alcance de la invención a no ser que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión lingüística en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

En esta memoria, el término "comprender" debe interpretarse ampliamente con el significado de "incluir", "contener" o "abarcar" (véanse las directrices EPO C, III, 4.13).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para expresión recombinante de FGF21 nativo con SEQ ID NO:1 y análogos del mismo, pudiendo deducirse o derivarse dichos análogos de FGF21 humano nativo con SEQ ID NO:1 por modificación de la secuencia de aminoácidos, siendo dicha modificación sustitución, delección y/o adición de uno o más aminoácidos, teniendo dichos análogos un efecto de disminución de glucosa y teniendo una identidad con FGF21 humano que es al menos 95%, en donde la levadura utilizada es una cepa de *pmt2* desactivada.
- 10 2. Un proceso conforme a reivindicación 1, en el cual se prepara un análogo de FGF21 con una extensión N-terminal, estando constituida dicha extensión por hasta aproximadamente 20 aminoácidos.
3. El proceso conforme a reivindicación 1, en el cual la levadura utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 4. El proceso conforme a la reivindicación 1 ó 2, en el cual la levadura utilizada es una cepa *pep4* desactivada.
5. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la levadura utilizada es una cepa *yps1* desactivada.
- 20 6. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la levadura utilizada es una cepa *mkc7* desactivada.
- 25 7. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la levadura se cultiva en condiciones en las cuales se expresa la secuencia de DNA exógena y se recupera el FGF21 deseado o un análogo del mismo como se define en la reivindicación 1.
- 30 8. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual dicho FGF21 se secreta en el medio de cultivo.
9. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la cepa de levadura *pmt2* desactivada se prepara utilizando el marcador *TRP1* o el marcador *KanMX4*, preferiblemente el marcador *TRP1*.
- 35 10. El proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la ratio entre FGF21 O-glicosilado o un derivado del mismo, por una parte, y FGF21 no O-glicosilado o un análogo del mismo como se define en la reivindicación 1, por otra parte, es inferior a aproximadamente 20%, preferiblemente inferior a aproximadamente 10%, más preferiblemente inferior a aproximadamente 5% e incluso más preferiblemente inferior a aproximadamente 2% (peso/peso).
11. Un proceso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el análogo de FGF21 preparado ha sido mutado en la posición R17 y/o R36.