

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 214**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2012 E 12766847 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2763689**

54 Título: **Variantes del factor de crecimiento de fibroblastos 21**

30 Prioridad:

04.10.2011 US 201161542906 P

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

14.10.2015

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**DICKINSON, CRAIG DUANE;
DRIVER, DAVID ALBERT;
DARLING, RYAN JAMES;
GONCIARZ, MALGORZATA DONATA y
MICANOVIC, RADMILA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 548 214 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

Variantes del factor de crecimiento de fibroblastos 21

5 Esta presente invención se refiere a variantes del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), a composiciones farmacéuticas que comprenden las variantes de FGF21 y a procedimientos para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos.

10 FGF21 es una hormona que funciona como un importante regulador metabólico de la homeostasis de la glucosa y de los lípidos. FGF21 promueve la captación de glucosa en adipocitos mediante la regulación positiva de la expresión de GLUT1, un mecanismo distinto del de la insulina. En roedores y monos diabéticos, el FGF21 humano disminuyó las concentraciones de glucosa en suero en ayunas y redujo las concentraciones de triglicéridos, insulina y glucagón en suero en ayunas. Además, en modelos de obesidad inducida por la dieta en roedores, la administración de FGF 21 condujo a una pérdida del peso corporal acumulada de un modo dependiente de la dosis. Por lo tanto, FGF21 tiene una utilidad potencial para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico.

15 Se han descrito variantes del FGF21 humano en los documentos WO2010/065439, WO2006/028595 y WO2005/061712.

Los problemas asociados con el FGF21 humano de tipo silvestre y variantes conocidas del FGF21 humano son la baja potencia farmacológica y/o la estabilidad farmacéutica de las moléculas. Por lo tanto, aún existe una necesidad de variantes alternativas de FGF21 que sean potentes y/o estables.

20 La presente invención proporciona variantes alternativas de FGF21 humano que tienen ventajas sobre el FGF humano de tipo silvestre y las variantes de FGF21 humano conocidas desveladas en la técnica. Estas ventajas incluyen una potencia farmacológica mejorada y/o una estabilidad farmacéutica mejorada. Determinadas variantes de FGF21 de la presente invención tienen una o más características fisicoquímicas ventajosas que son útiles para la fabricación y/o formulación eficaz como una proteína terapéutica, incluyendo reducción de la degradación proteolítica *in vivo*, reducción de la susceptibilidad a la oxidación, propensión disminuida a formar agregados a altas concentraciones, niveles disminuidos de modificaciones post-traduccionales durante la producción en sistemas celulares de mamíferos, compatibilidad aumentada con determinados conservantes y/o estabilidad química mejorada. Adicionalmente, las variantes de FGF21 de la presente invención son potencialmente útiles para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos.

30 La presente divulgación proporciona una variante del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) humano, en el que la secuencia de aminoácidos es

**HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREX₁LLEDGYNVYQSE
AHGLX₂LHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDP
X₃X₄LVX₅PSQLLSPSFLG (SEC ID N°: 13)**

en la que X₁ es L o D, X₂ es P o W, X₃ es L o Y, X₄ es S o R y X₅ es G o E.

35 La presente invención proporciona una variante del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) humano, en la que la secuencia de aminoácidos es

**HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVEPSQLLSPSFLG (SEC ID N°:1).**

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante del FGF21 humano de la presente invención, como se describe en el presente documento y al menos un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

40 La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos, en un paciente que comprende

administrar al paciente una variante del FGF21 humano de la presente invención, tal como se describe en el presente documento.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos, en un paciente que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la presente invención, tal como se describe en el presente documento.

Además, la presente invención proporciona una variante del FGF21 humano de la presente invención, como se describe en el presente documento, para su uso en terapia. Preferentemente, la presente invención proporciona una variante del FGF21 humano de la presente invención, como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos.

Además, la presente invención proporciona una variante del FGF21 humano de la presente invención, como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos.

El FGF21 humano de longitud completa es un polipéptido de 208 aminoácidos que contiene un péptido señal de 27 aminoácidos. El FGF21 humano maduro de tipo silvestre comprende el polipéptido de longitud completa sin el péptido señal de 27 aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de 181 aminoácidos (SEC ID N°: 2). Los cambios en las posiciones de aminoácidos de las variantes de FGF21 de la presente invención se determinan a partir de las posiciones de aminoácidos del polipéptido de FGF21 humano maduro de tipo silvestre (SEC ID N°: 2). Por lo tanto, una sustitución descrita en el presente documento como "A1C" se refiere a una sustitución del aminoácido de tipo silvestre Ala por el aminoácido Cys en la posición 31 de la proteína del FGF21 humano maduro de tipo silvestre.

Es importante tener en cuenta que una sustitución de un resto de aminoácido en una variante particular puede afectar a las características de las variantes como un todo, y que el efecto general puede ser beneficioso o perjudicial para la potencia farmacológica y/o la estabilidad farmacéutica. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos P115W aumenta la potencia de la variante de FGF21, sin embargo, también se cree que P115W contribuye a las auto-interacciones que causan agregación (véase el Ejemplo 5). Por lo tanto, el efecto total es perjudicial para las variantes, y por lo tanto, la sustitución P115W no está incluida en las variantes de FGF21 preferentes de la presente invención.

Determinadas variantes del FGF21 humano de la presente divulgación son proteínas biológicamente activas potentes tal como se demuestra para la SEC ID:N° 1 en los Ejemplos 2 y 3. Las variantes de FGF21 de la presente divulgación contienen sustituciones de aminoácidos que, en conjunto, no solamente mejoran la potencia farmacológica, sino que son compatibles con otros cambios de aminoácidos que, a su vez, proporcionan propiedades fisicoquímicas mejoradas y estabilidad *in vivo* aumentada. El grupo de sustituciones de aminoácidos de las variantes de FGF21 de la presente divulgación que mejoran la potencia incluyen D127K, S167R, G174L, R175L y A180L (véanse los Ejemplos 2 y 3).

La exposición de una solución concentrada de proteínas de FGF21 humano de tipo silvestre a un conservante farmacéutico, tal como m-cresol, aumenta la propensión de la proteína a formar agregados. La estabilización estructural a través de la introducción de un enlace disulfuro adicional mejora la compatibilidad con los conservantes así como la estabilidad térmica del FGF21 humano de tipo silvestre. Las variantes de FGF21 de la presente divulgación incorporan las sustituciones de aminoácidos A31C y G43C que mejoran en gran medida la estabilidad térmica y la compatibilidad con conservantes sin comprometer la actividad biológica. Se han descrito anteriormente variantes de FGF21 de alta potencia que también incluyen las sustituciones A31C/G43C. Estas variantes notificadas muestran una compatibilidad con conservantes significativamente mejorada con respecto al FGF21 de tipo silvestre, pero aún son propensas a la agregación. Se sabe que la agregación aumenta el riesgo de inmunogenicidad, reduciendo de este modo la aceptabilidad de las variantes como una proteína terapéutica.

Para minimizar esta agregación perjudicial, las variantes de la presente divulgación incluyen la sustitución de aminoácidos L98D, que da como resultado una formación de agregados de peso molecular alto significativamente más baja a altas concentraciones (véase el Ejemplo 5). Ventajosamente, la sustitución de aminoácidos L98D no disminuye la potencia de las variantes.

Un sistema de expresión comercial preferente para la fabricación de las variantes de FGF21 de la presente invención es la línea celular de mamífero CHO-K1. Sin embargo, las líneas celulares de mamífero CHO-K1 y HEK293 pueden causar modificaciones post-traduccionales al FGF21 humano maduro de tipo silvestre a través de la sulfatación de la cadena lateral de la tirosina en la posición 179. La sulfatación de los restos de tirosina en las posiciones 179 y 180 (si están presentes) disminuye la potencia y es una fuente no deseada de heterogeneidad de producto. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína de FGF21 que tiene Tyr en la posición 179 y/o 180 a partir de las líneas celulares CHO-K1 o HEK293, cierta proporción de las proteínas expresadas puede estar sulfatada en la posición 179, otras pueden estar sulfatadas en la posición 1890, mientras que otras pueden estar sulfatadas en

ambas posiciones y algunas en ninguna posición. Esto conduce a una población de proteínas heterogénea e impredecible con una potencia disminuida.

5 Las variantes de FGF21 de la presente invención resolvieron esta sulfatación perjudicial incluyendo la sustitución de aminoácidos Y179F en las variantes. Y179F elimina la sulfatación resultante de la producción en células CHO-K1 y HEK293 (véase el Ejemplo 4). Además, la sustitución de aminoácidos Y179F es compatible con las otras sustituciones de aminoácidos favorables de la presente invención y está determinada por ser un cambio natural con respecto a la potencia.

10 El FGF21 humano de tipo silvestre es susceptible a la degradación proteolítica *in vivo*. Un fragmento proteolítico principal recuperado a partir del suero después de la inyección intravenosa o subcutánea a ratones o monos tíftis es el fragmento que termina en la posición 171. Anteriormente, se ha determinado que los restos que abarcan de 1 a 171 del fragmento de FGF21 son ~100 veces menos potentes en ensayos de potencia *in vitro*. Eliminando este sitio de escisión proteolítica se mejora la eficacia del fármaco aumentando la exposición al fármaco activo. Se ha mostrado que la sustitución de aminoácidos G170E ralentiza significativamente la escisión en ratón (datos no mostrados) y elimina prácticamente la proteólisis en la posición 171 después de 24 horas en monos tíftis (véase el Ejemplo 6). La sustitución G170E no tiene ningún impacto sobre la potencia y es compatible con el perfil de estabilidad fisicoquímica deseado. Por lo tanto, la sustitución G170E está incorporada en las variantes de FGF21 preferentes de la presente invención.

20 El FGF21 humano de tipo silvestre es susceptible a una carboxipeptidasa producida en la producción en células CHO-K1, y la sustitución de aminoácidos S181G ralentiza este procesamiento, reduciendo de este modo la heterogeneidad de la longitud de la proteína expresada (es decir, heterogeneidad en el número de restos de aminoácidos en la proteína madura expresada por la línea celular). Aunque la sustitución de aminoácidos S181G no elimina la proteólisis del extremo C-terminal en la expresión en células de mamífero, es bastante eficaz ralentizando la proteólisis mientras que se mantiene la potencia deseada en el contexto de otras sustituciones de aminoácidos deseadas encontradas en las variantes de FGF21 de la presente divulgación. En vista de esta característica ventajosa, la sustitución de aminoácidos S181G está incorporada en las variantes de FGF21 preferentes de la presente divulgación.

30 La presente invención también abarca polinucleótidos que codifican las variantes anteriormente descritas que pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, en las que el ADN incluye ADNc y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario. Las secuencias codificantes que codifican las variantes de la presente invención pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético.

35 Los polinucleótidos que codifican las variantes de la presente invención pueden incluir los siguientes: solamente la secuencia codificante de las variantes, la secuencia codificante de las variantes y una secuencia codificante adicional tal como un polipéptido funcional o una secuencia líder o secretora o una secuencia de pro-proteína; la secuencia codificante y la secuencia no codificante de las variantes, tal como los intrones o la secuencia 5' no codificante y/o el extremo 3' de la secuencia codificante de las variantes. Por lo tanto, la expresión "polinucleótido que codifica una variante" abarca un polinucleótido que puede incluir no solamente la secuencia codificante de las variantes sino también un polinucleótido que incluye una secuencia codificante y/o no codificante adicional.

40 Los polinucleótidos de la presente invención se expresarán en una célula hospedadora después de que las secuencias se hayan ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión. Los vectores de expresión típicamente son replicables en los organismos hospedadores bien como episomas o como una parte integrada en el ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

45 Las variantes de FGF21 de la presente invención pueden producirse fácilmente en células de mamífero, tales como células CHO, NS0, HEK293 o COS; en células bacterianas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas fluorescense*; o en células fúngicas o de levaduras. Las células hospedadoras se cultivan usando técnicas bien conocidas en la materia. Las células hospedadoras de mamífero preferentes son las de la línea celular CHOK1SV que contienen un sistema de expresión de glutamina sintetasa (GS) (véase el documento US 5.122.464).

50 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las variantes de FGF21 y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse dentro de la célula hospedadora mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección por cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación puede usarse para otros hospedadores celulares.

55 Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª Edición, Springer, NY (1994).

Las composiciones farmacéuticas de las variantes de FGF21 de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de los medios conocidos en la técnica que generalmente alcanzan el fin que pretenden tratar la diabetes

de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia, o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos. La ruta de administración preferente es la parenteral. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, en caso de que lo haya, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los niveles de dosificación típicos pueden optimizarse usando técnicas clínicas convencionales y dependerán del modo de administración y la afección del paciente y pueden determinarse por una persona que tiene experiencia habitual en la materia.

Las variantes de FGF21 de la presente invención se formulan de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticas útiles. Una formulación deseada es un producto estable liofilizado que se reconstituye con un diluyente apropiado o una solución acuosa de alta pureza con transportadores, conservantes, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales [Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995].

Las variantes de FGF21 de la presente invención pueden combinarse con un tampón farmacéuticamente aceptable y el pH puede ajustarse para proporcionar una estabilidad aceptable y un pH aceptable para la administración. Además, las variantes de FGF21 de la presente invención pueden colocarse en un contenedor tal como un vial, un cartucho, un dispositivo de administración en bolígrafo, una jeringuilla, un tubo de administración intravenosa o una bolsa de administración intravenosa, en la que el contenedor es un contenedor de dosis unitaria.

El término "dislipidemia" significa un trastorno del metabolismo de las lipoproteínas, incluyendo la sobreproducción o deficiencia de lipoproteínas. La dislipidemia puede manifestarse mediante la elevación del colesterol total, las concentraciones del colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las concentraciones de triglicéridos, y/o una disminución de la concentración de colesterol en lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la sangre.

La expresión "síndrome metabólico" se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólico en una persona. Estos incluyen: grasa abdominal en la mayor parte de los hombres, una cintura de 101,6 cm o mayor; azúcar en sangre alto de al menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después del ayuno; triglicéridos altos de al menos 105 mg/dl en el torrente sanguíneo; HDL bajas de menos de 40 mg/dl; y/o presión sanguínea de 130/85 o más alta.

El término "obesidad" se define como una afección en la que existe un exceso de grasa subcutánea en proporción a la masa corporal magra (Stedman's Medical Dictionary 28ª edición, 2006, Lippincott Williams & Wilkins).

Un "paciente" es un mamífero, preferentemente un ser humano.

El término "tratar" (o "tratamiento") significa ralentizar, reducir o invertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de las variantes de FGF21 de esta invención que, tras la administración de una sola dosis o dosis múltiples a un paciente, proporciona el tratamiento deseado.

La expresión "diabetes de tipo 2" se caracteriza por el exceso de producción de glucosa a pesar de la disponibilidad de insulina y porque los niveles circulantes de glucosa siguen siendo excesivamente altos como resultado de un aclaramiento inadecuado de glucosa.

Los siguientes ejemplos pueden realizarse esencialmente tal como se describe a continuación.

Ejemplo 1

Expresión de las variantes de FGF21 variantes en las células CHOK1SV

Las variantes de FGF21 de la presente invención se produjeron en un sistema de expresión en células de mamíferos usando células de Ovario de Hámster Chino (CHOK1SV). Los genes que codifican las variantes de FGF21 se subclonaron en los esqueletos de plásmidos de expresión que contenían glutamina sintetasa (GS) (plásmidos basados en pEE12.4). La secuencia de ADNc que codifica las variantes de FGF21 se fusionó en marco con la secuencia codificante de las secuencias preferentes del péptido señal para potenciar la secreción del producto deseado en el medio de cultivo tisular. Las secuencias preferentes del péptido señal son los polipéptidos tal como se muestran en las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, o SEC ID N°: 6,

La expresión estaba dirigida por el promotor viral del citomegalovirus (CMV). Las células CHOK1SV se transfectaron de modo estable usando electroporación y la cantidad apropiada de plásmido de expresión recombinante y las células transfectadas se mantuvieron en cultivo en suspensión, a la densidad celular adecuada. La selección de las células transfectadas se llevó a cabo mediante el crecimiento en medio de cultivo libre de suero que contenía sulfoximina de metionina (MSX) e incubación a 35-37 °C y CO₂ al 5-7 %.

Se generaron líneas celulares derivadas clonalmente mediante el uso de un citómetro de flujo. La expresión de una variante de FGF21 en células de mamífero generalmente producía la secuencia N-terminal natural, HPIP, es decir, sin un resto de metionina en el extremo N-terminal, tal como la variante de FGF21 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1.

Las variantes de FGF21 secretadas en el medio a partir de las células CHO se purificaron mediante un procedimiento por el cual se calienta el medio de cultivo celular aclarado hasta 50-60 °C durante hasta dos horas, se enfriaron, se trataron con detergente (Triton X-100) para la inactivación viral y se aplicaron a una columna de cromatografía de modo mixto Capto MMC (GE Healthcare). La variante de FGF21 se eluyó a partir de la columna usando un tampón de pH 8, y el conjunto de producto posterior se ajustó con una solución de ácido cítrico 50 mM, NaCl 150 mM a un intervalo de pH de 3,2 a 3,5 durante una hora para la inactivación viral. Se ajustó la solución a un pH entre 6,7 a 7,3 mediante la adición de tampón Tris y la variante de FGF21 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio hidrófobo usando una resina de Fenilsefarsosa de Alto Rendimiento (GE Healthcare). La columna de interacción hidrófoba se eluyó con un gradiente decreciente de sulfato de sodio a pH 7. La variante de FGF21 purificada por CIH se sometió a un intercambio de tampón en un Tampón Tris a pH 8 que contenía NaCl y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico sobre una resina Source 30Q (GE Healthcare). La columna de intercambio aniónico se eluyó con una concentración creciente de cloruro de sodio a pH 8. La variante de FGF21 purificada se pasó a través de un filtro de retención de retención viral Planova 20N (Asahi Kasei Medical) seguido por la concentración/diafiltración en citrato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7 usando una ultrafiltración tangencial sobre una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 2

Ensayo de Captación de Glucosa en Fibroblastos 3T3-L1-βKlotho

Los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se generaron a partir de fibroblastos 3T3-L1 mediante la transducción retroviral con un vector de expresión dirigido por CMV de mamíferos que contenía la secuencia codificante del βKlotho de tipo silvestre de ratón y el marcador de resistencia blasticidina. Las células resistentes a blasticidina se seleccionaron después del crecimiento durante 14 días en presencia de blasticidina 15 μM, y la expresión de la proteína βKlotho se verificó mediante inmunotransferencia con un anticuerpo anti-βKlotho. Los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se mantuvieron en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero de ternera al 10 %, y blasticidina 15 μM hasta que se sembraron para su uso experimental.

Para la captación de glucosa, los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se sembraron a 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 48 horas en DMEM con suero de ternera al 10 %. Las células se incubaron durante 3 horas en DMEM con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 % con o sin una variante de FGF21 de interés, seguido de 1 hora de incubación en tampón fosfato de Krebs-Ringer (KRP) (Hepes 15 mM, pH 7,4, NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, BSA al 0,1 %) que contenía 2-desoxi-D(¹⁴C) glucosa 100 μM con o sin una variante de FGF21. La unión no específica se determinó mediante la incubación de células seleccionadas en tampón bicarbonato de Frebs-Ringer/Hepes (KRBH) que contenía 2-desoxi-D(¹⁴C) glucosa 1 mM. La reacción se detuvo mediante la adición de citocalasina B 20 μM a las células y se midió la captación de glucosa usando un contador de centelleo líquido.

La potencia *in vitro* de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 en el ensayo de captación de glucosa con fibroblastos 3T3-L1-βKlotho fue 0,026 nM. La variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 es una variante de FGF21 potente en comparación con la variante de FGF21 conocida de SEC ID N°: 11 (desvelada en el documento WO 2006/028595). La potencia *in vitro* de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 11 en el ensayo de captación de glucosa con fibroblastos 3T3-L1-βKlotho fue 0,49 nM.

Ejemplo 3

Ensayo de luciferasa en células 293-βKlotho-SRE humanas

Construcción de células indicadoras 293-βKlotho-SRE luc:

Las HEK-293 (células de riñón embrionario humano) se cultivaron a 37 °C, en CO₂ al 5 % en medio de crecimiento que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS) en medio Eagle Modificado de Dulbecco. Las células se cotransfectaron con un plásmido que contenía un promotor de CMV dirigido por el casete de expresión de βKlotho humano y un plásmido que contenía un Elemento de Respuesta al Suero (ERS) dirigido por el casete de expresión de luciferasa. El plásmido de expresión de βKlotho también contenía un casete de expresión de neomicina fosfotransferasa dirigido por un promotor de SV40 para conferir resistencia al antibiótico aminoglucósido G418. Las células HEK-293 transfectadas se seleccionaron con 600 μg/ml de G418 para seleccionar a las células en las que los plásmidos transfectados se habían integrado en el genoma. Las células seleccionadas se clonaron mediante dilución y se ensayaron con respecto a un aumento de la producción de luciferasa a las 24 horas después de la adición de FGF21. El clon que demostró el mayor aumento dependiente de FGF21 en la luciferasa se eligió como la línea celular se usó para medir la actividad relativa de las variantes de FGF21.

Ensayo de actividad en d293-βKlotho-SRE luc de FGF21:

Las células 293-βKlotho-SRE luc se enjuagaron y se colocaron en una suspensión de medio de cultivo CD 293 (Invitrogen). Las células crecieron en suspensión durante toda la noche a 37 °C, CO₂ al 6 %, 125 rpm. Se contaron las células, se precipitaron mediante centrifugación y se resuspendieron en medio CD 293 que contenía BSA al 0,1 %. Se colocaron las células en placas blancas de 96 pocillos a 25.000 células por pocillo. Se preparó una

dilución seriada de cuatro veces en CD 293/BSA al 0,1 % para cada variante de FGF21 para generar 8 diluciones con concentraciones finales desde 100 nM a 0,006 nM. Se añadieron diluciones a las células por triplicado y se incubaron durante 16-20 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. El nivel de luciferasa se determinó mediante la adición de un volumen igual de sustrato de luciferasa OneGlo™ (Promega) y la medición de la luminiscencia relativa. Los datos se analizaron usando un modelo logístico de cuatro parámetros (XLfit versión 5.1) para ajustar las curvas y determinar la CE₅₀.

La potencia *in vitro* de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 en el ensayo en células 293-βKlotho-SRE luc humanas fue 0,25 nM. La variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 es una variante potente de FGF21 en comparación con la variante de FGF21 conocida de SEC ID N°: 11 (desvelada en el documento WO 2006/028595). La potencia *in vitro* de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 11 en el ensayo en células 293-βKlotho-SRE luc humanas fue 22,39 nM.

Ejemplo 4

Sulfatación de tirosina durante la fabricación en células de mamífero

El FGF21 humano de tipo silvestre es susceptible a la sulfatación de la tirosina en la posición 179 durante la expresión de proteínas de mamíferos en las células CHOK1SV (datos no mostrados). La sulfatación conduce a la heterogeneidad del producto, lo que significa que pueden darse distintas formas de la proteína (es decir, con y sin sulfatación). La homogeneidad del producto es un atributo deseable para un producto biofarmacéutico. Las modificaciones post-traduccionales que ocurren durante la producción de una proteína terapéutica son indeseables ya que las modificaciones pueden conducir a diferencias en la actividad u otras propiedades biofarmacéuticas.

Para evaluar si una variante de FGF21 está sulfatada, se mezcló una alícuota de 1 ml con 99 ml de ácido trifluoroacético al 0,1 % (ATF). La muestra se analizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), usando las siguientes condiciones: la fase móvil A es ATF al 0,1 %/acetonitrilo al 10 %, la fase móvil B fue 0,1 % de ATF en acetonitrilo, la columna fue una columna C8, de 3,5 mm 2,1 x 150 mm, con una protección C8 de 2,1 x 12,5 mm, el volumen de inyección fue de 12-20 ml dependiendo de la concentración de la muestra de modo que se inyecta aproximadamente 1 mg de proteína.

Tabla 1: Condiciones del Gradiente para la Separación por Cromatografía Líquida

Tiempo (min)	0	12	15	15,1	20	21,1	30
% de B	10	50	60	90	90	10	10
Flujo (µl/min)	200	200	200	200	200	200	200

Un espectrómetro de masas Waters Micromass LCT Premier™ se calibró hasta un intervalo de masa entre 400 a 1990 amu, polaridad ES+, capilar 2000, cono de muestra 40 V, la apertura 1 era de 30 V, la temperatura de la fuente es 105 °C, el cono de flujo de gas estaba a 50 l/hora, la temperatura de desulfatación es 300 °C, y el flujo de gas de desulfatación era de 600 l/hora.

Tabla 2: Caracterización por CL/EM de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1

Producto	Masa Esperada	Masa Observada	% de Error	% Rel
1-181	19633,3	19633,0	0,002	33,8
1-180	19576,2	19576,1	0,001	66,2

Tal como puede observarse a partir de la Tabla 2, la masa esperada (que no tiene sulfatación) fue aproximadamente la misma que la masa observada para la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1, indicando que no se detectó sulfatación en la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1. Por lo tanto, la sustitución de aminoácidos Y179F impidió que ocurriera la sulfatación en la posición 179 en las variantes de FGF21 de SEC ID N°: 1. Este resultado proporciona un producto más homogéneo, haciendo que este sea más aceptable como un producto proteico terapéutico.

Ejemplo 5

P115W Promueve la Agregación, Mientras que L98D Aumenta la Estabilidad Física y la Compatibilidad con Alcohol Bencílico en la Formulación

Para medir la cantidad de auto-asociación y agregación de la proteína, se usó un procedimiento analítico de cromatografía de exclusión molecular (CEM) para medir el porcentaje de agregados de peso molecular alto (% de PMA). Las soluciones madre iniciales de proteína se caracterizan mediante CEM para determinar los niveles iniciales de PMA (Tabla 3).

Tabla 3

variantes de FGF21	Nivel inicial de PMA (%)
variante de FGF21 de SEC ID N°: 10	3,2
variante de FGF21 de SEC ID N°: 1	0,21
variante de FGF21 de SEC ID N°: 8	3,6
variante de FGF21 de SEC ID N°: 9	0,12

Las muestras de cada proteína se prepararon dializando (usando casetes de diálisis con un corte de peso molecular de 10.000 daltons) en tampones de muestra (descritos en las Tablas 4-6) a una concentración de 2 mg/ml durante toda la noche a 4 °C. Después de la diálisis, se esterilizaron las muestras mediante filtración (membrana de 0,22 µm) y se cuantificaron mediante absorbancia a 280 nm. A continuación, se concentraron las muestras a una concentración diana de ≥60 mg/ml a 3000 rpm a 4 °C usando filtros de centrifuga con un corte de MM de 10.000. Después de concentrar las muestras, la concentración de proteínas se cuantificó mediante absorbancia a 280 nm, y el % de PMA se determinó usando un ensayo CEM.

El procedimiento CEM utilizó una columna TosoHaas modelo TSK-GEL® G2000SW_{XL} con unas dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil fue fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4 a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto. Se aplicaron muestras de baja concentración como inyecciones de 10 µl y se controlaron a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm, mientras que se aplicaban muestras concentradas como inyecciones de 1 µl y se controlaron a una longitud de onda de absorbancia de 280 nm.

La Tabla 4 notificó la concentración de proteínas y el % de PMA en las soluciones concentradas de las variantes de FGF21 de SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9. El porcentaje de cada variante restante en la forma monomérica (no agregada) no está enumerado en la tabla pero es igual al 100 % menos el % de PMA notificado. La variante de FGF21 de SEC ID N°: 8 y la variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 difieren únicamente en la posición de aminoácidos 115 con respecto a la variante de FGF21 de SEC ID N°: 8 que contiene un resto de triptófano que realiza la potencia en 115 (P 115W) y la variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 que contiene el resto de prolina de tipo silvestre (P 115P). En diversas condiciones de formulación del tampón, el % de PMA para la variante FGF21 de SEC ID N°: 8 (P115W) fue significativamente más alto en comparación con la variante de FGF21 de SEC ID N°: 9, demostrando el efecto casual de tener un triptófano en la posición 115 sobre la promoción de la agregación y la auto-asociación. Probablemente, variante de FGF21 de SEC ID N°: 10, que contiene el resto de triptófano en la posición 115, tiene un % de PMA sustancialmente elevado en comparación con la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1, que contiene al aminoácido prolina en la posición 115 (Tabla 5).

Tabla 4: Propensión a la agregación medida mediante CEM

Composición de Tampón	variante de FGF21 de SEC ID N°: 8 (P115W)		variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 (P115P)	
	Conc. (mg/ml)	% de PMA	Conc. (mg/ml)	% de PMA
Fosfato tamponado salino pH 7,4	65	32,3	67	0,38
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM,	62	34,3	63	0,47
Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM,	65	26,5	64	0,34
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, L-arginina 0,2 M	72	29,2	81	0,42
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 50 mM,	70	49,6	50	3,5

Tabla 5: Propensión a la agregación medida mediante CEM

Composición de Tampón	variante de FGF21 de SEC ID N°: 10 (P115W)		variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 (P115P)	
	Conc. (mg/ml)	% de PMA	Conc. (mg/ml)	% de PMA
Fosfato tamponado salino pH 7,4	77	33,7	88	0,56
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM,	83	37,5	61	0,69
Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM,	63	25,1	71	2,4
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, L-arginina 0,2 M	64	27,8	85	2,6
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 50 mM,	58	45,9	61	8,2

La estabilidad física y la compatibilidad con alcohol bencílico a un nivel de concentración de conservante del 0,9 % se midió cómo % de PMA en el ensayo CEM, controlado en el tampón histidina 10 mM a pH 7,0 con NaCl 150 mM,

en presencia o ausencia de Tween 80 al 0,02 %. Se prepararon las muestras a 30 mg/ml y se incubaron a 4 °C, 25 °C y 40 °C durante 4 semanas. Las variantes de FGF21 formuladas recientemente (es decir, a tiempo cero) y aquellas incubadas durante 4 semanas se analizaron para el % de PMA mediante el procedimiento CEM. La tabla 6 resume los resultados del análisis, comparando las muestras de tiempo cero ("Iniciales") y aquellas incubadas 4 semanas a 40 °C.

Tabla 6: Propensión a la agregación y compatibilidad con conservantes a una concentración de la Formulación de 30 mg/ml

Composición de Tampón	variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 (L98L)		variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 (L98D)	
	(% de PMA)	4 semanas a 40 °C (% de PMA A)	Inicial (% de PMA)	4 semanas a 40 °C (% de PMA A)
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM	0,97	18,3	6,0	5,6
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, alcohol bencílico al 0,9 %	11,0	33,9	4,2	6,0
Histidina 10 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, alcohol bencílico al 0,9 % Tween-80 al 0,02 %	11,0	32,1	4,3	5,3

La variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 contenía la sustitución de aminoácidos L98D. La variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 no contenía la sustitución de aminoácidos L98D y en cambio contenía el aminoácido leucina de tipo silvestre en la posición 98. El beneficio de la sustitución de aminoácidos L98D se observó cuando se formuló cada proteína a 30 mg/ml en las condiciones de formulación (Tabla 6). En todas las condiciones ensayadas, el estrés de las variantes FGF21 durante 4 semanas a 40 °C dio como resultado un % de PMA sustancialmente más alto para la variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 en comparación con la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1. Además, la adición de alcohol bencílico al 0,9 %, un conservante común usado en una preparación farmacéutica multiusos, exacerbó el aumento del % de PMA para la variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 pero no para la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1. Esta incompatibilidad con alcohol bencílico también se observó en el análisis de la preparación de la muestra inicial, en el que el % de PMA en presencia de alcohol bencílico al 0,9 % es del 11 %, en comparación con únicamente el 0,97 % en ausencia de alcohol bencílico. Ni la variante de FGF21 de SEC ID N°: 9 ni la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 contienen el resto P115W, por lo tanto, la poca estabilidad física en estas condiciones no puede atribuirse al resto P114W. Después de que se hiciera la sustitución L98D, se observó una estabilidad física aumentada en presencia de alcohol bencílico al 0,9 %.

Estos datos indican que determinadas sustituciones pueden afectar a la estabilidad de la proteína total debido a la agregación en especies de peso molecular alto, particularmente en presencia de determinados conservantes tales como el alcohol bencílico. Se prefiere la minimización de esos agregados de PMA para proteínas terapéuticas. Esto puede llevarse a cabo a través de determinadas sustituciones en las proteínas de las variantes de FGF21, tales como L98D en las variantes mostradas en SEC ID N°: 1. Otras sustituciones, tales como PI 15W, pueden tener efectos perjudiciales, tales como aumentar el nivel de agregación de las variantes.

Ejemplo 6

Degradación Proteolítica *In Vivo*

A los monos titís machos, n=2/grupo se les dosificó por vía subcutánea 2 mg/kg de una inyección de la variante FGF21 de SEC ID N°: 1. Se obtuvo el suero a lo largo del curso de tiempo (extracción después de 0,25 a 12 horas) para una evaluación de 24 horas de la proteólisis *in vivo* por medio de una espectrometría de masas para cuantificar la cantidad de compuesto activo.

Se realizó un análisis por cromatografía líquida con espectrometría de masas (CL/EM). Se inmunoprecipitó una alícuota de 100 µl de cada muestra con anticuerpos monoclonales anti-FGF21 que se unían covalentemente a esferas magnéticas. Las muestras inmunoprecipitadas se separaron en alícuotas independientes, permitiendo la detección de proteínas intactas y proteínas digeridas con tripsina. Las proteínas intactas se inyectaron en una columna Discovery® Biowide Pore, de 100 x 0,32 mm d.i. que contenía partículas de 3 µm recubiertas con C5. Las muestras digeridas con tripsina se inyectaron en una columna Discovery Biowide Pore, de 100 x 0,32 mm d.i. que contenía partículas de 3 µm recubiertas con C5. Las condiciones cromatográficas para todas las inyecciones usaron gradientes binarios que consistían en una fase móvil A (ácido fórmico:agua al 0,1/100) y una fase móvil B (ácido fórmico:acetonitrilo al 0,1/100). El efluente de la CL se conectó directamente con un espectrómetro de masas Micromass Synapt® Q-ToF para la detección del espectro de masas en modo de iones positivos. Los datos del espectrofotómetro de masas Q-ToF se recogieron usando los programas informáticos de deconvolución Masslinx (v 4.1) y MaxEnt1.

Se ha descubierto que la escisión en la posición 171 de las proteínas de FGF21 reduce la actividad biológica de la proteína más de 100 veces. Por lo tanto, la reducción de la proteólisis en este sitio es deseable para potenciar la exposición del fármaco completamente activo. La variante de FGF21 de SEC ID N°: 1, cuando se analizó en un procedimiento de CL/EM tal como se hizo anteriormente, no mostró productos proteolíticos detectables a lo largo de la evaluación de 24 horas. Estos datos demuestran que la sustitución de G170E en la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 disminuye la degradación proteolítica *in vivo* a lo largo de 24 horas en monos tíis macho en comparación con la variante de FGF21 de SEC ID N°: 7, que no contiene la sustitución de aminoácidos G170E.

Ejemplo 7

Disminución de Glucosa en un Modelo de Ratón *Ob/ob*

Los ratones macho *ob/ob* (B6.V-*Lep^{ob}/Lep⁺OlaHsd*) y los controles delgados de edad coincidente *ob/m* (B6.V-*Lep⁺OlaHsd*) tenían de 7-8 semanas de edad a su llegada y de 10-11 semanas de edad al inicio del tratamiento. A su llegada, se alojaron todos los ratones en 3 por cada jaula y se les permitió aclimatarse durante 3 semanas antes del comienzo del tratamiento. Se alimentó a los ratones con Purina Rodent Chow 5015 y se les dio agua a voluntad. Se alojó a los ratones en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con una temperatura ambiente ajustada a 21 °C. El día antes del inicio del tratamiento, se sometió a los ratones a ayuno durante 2 horas y se recogieron muestras de sangre por medio de la extracción de sangre de la cola en tubos capilares con heparina. Se midieron los niveles de glucosa en sangre con un medidor de glucosa en sangre Ascensia Contour y se cuantificaron los niveles de insulina en plasma usando el kit de ensayo de insulina en ratón/rata Meso Scale (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). En el día del inicio del tratamiento (día 0), se separaron los ratones basándose en el peso corporal, la glucosa en sangre y la insulina en plasma del día anterior. Las variantes de FGF21 se diluyeron con solución salina estéril (0,9 % de NaCl) y se administraron por vía subcutánea por medio de bombas mini-osmóticas Alzet. En el día 5, los niveles de glucosa en sangre y los niveles de insulina en plasma de la alimentación se midieron aproximadamente 2 horas después del comienzo del ciclo de luz. Todos los ratones se sometieron a ayuno durante toda la noche en el día 5 y se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (ETGO) en el día 6. Se extrajo sangre a los ratones por medio de un corte en la cola en tubos capilares con heparina antes de la administración oral de glucosa (2 g/kg). Se recogieron muestras de sangre adicionales 30, 60 y 120 minutos después de la administración oral de glucosa. La glucosa en plasma se midió con un kit de ensayo de glucosa de Cayman Chemicals. Se realizó un modelo de regresión logística de cuatro parámetros sobre los valores normalizados del ABC de la glucosa en el día 6.

En el día 5, los ratones tratados con vehículo fueron hiperglucémicos con unos niveles de glucosa en sangre medios medidos a $240,4 \pm 15,0$ mg/dl (media \pm ETM), mientras que los ratones control delgados *ob/m* tenían niveles de glucosa en sangre de $150,6 \pm 6,0$ mg/dl (media \pm ETM). Tanto la variante FGF21 de SEC ID N°: como la variante FGF21 de SEC ID N°: 11 disminuyeron la glucosa en sangre en un modo dependiente de la dosis hasta niveles comparables con los controles delgados *ob/m*. La DE_{50} de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 fue 0,7 μ g/kg/h, mientras que la DE_{50} de la variante de FGF21 de SEC ID N°: 11 fue 3,1 μ g/kg/h. La variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 fue aproximadamente 4,4 veces más potente en la disminución de la glucosa en sangre en los ratones *ob/ob* que la variante de FGF21 de SEC ID N°: 11. Por lo tanto, variante de FGF21 de SEC ID N°: 1 es una variante de FGF21 potente cuando se compara con la variante de FGF21 conocida de SEC ID N°: 11 (desvelada en el documento WO 2006/028595).

40 Secuencias

SEC ID N°: 1-variante de FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVEPSQLLSPSFLG

SEC ID N°: 2- FGF21 de Tipo Silvestre (*Homo Sapiens*)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVGPSQGRSPSYAS

SEC ID N°: 3 - Péptido Señal de la Transferrina humana (hTrf)

MRLAVGALLVCAVLGLCLA

SEC ID N°: 4 - Péptido Señal de la proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 1 (hFGFP-1)

MKICSLTLLSFLLAAQVLLVEG

5 **SEC ID N°: 5 - Péptido Señal de la lisozima Bovina**

MKALVILGFLFLSVAVQG

SEC ID N°: 6 - Péptido Señal de la cadena ligera murina (mkappa)

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

SEC ID N°: 7-variante de FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPDGKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVGPSQLLSPSFLG

10

SEC ID N°: 8-variante de FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSE
AHGLWLHLPDGKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPY
SLVEPSQLLSPSFLG

SEC ID N°: 9-variante de FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPDGKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPYS
LVEPSQLLSPSFLG

15

SEC ID N°: 10-variante de FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSE
AHGLWLHLPDGKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
RLVEPSQLLSPSFLG

SEC ID N°: 11-variante de FGF21

DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKAL
KPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHG
LPLHCPGNKSPHRDPAPRGPCRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLAMV
GPSQGRSPSYAS

SEC ID N°: 12-variante de FGF21 (ADN)

CACCCTATCCCTGACTCCAGCCCTCTGCTGCAGTTTGGCGGACAGGTCCGGCA
 GCGGTACCTGTACACCGACGACGCCAGCAGACCGAGTGCCACCTGGAAATC
 CGGGAGGACGGCACCGTGGGCTGTGCCGCCGACCAGTCCCCTGAGTCCCTGC
 TGCAGCTGAAGGCCCTGAAGCCTGGCGTGATCCAGATCCTGGGCGTGAAAAC
 CTCCCGGTTCTGTGCCAGAGGCCTGATGGCGCCCTGTACGGCTCCCTGCACT

TCGACCCTGAGGCCTGCTCCTTCCGGGAGGACCTGCTGGAAGATGGCTACAA
 CGTGTACCAGTCCGAGGCTCACGGCCTGCCTCTGCATCTGCCTGGCGACAAGT
 CCCCCACCGGAAGCCTGCTCCTAGGGGCCCTGCCAGATTCCTGCCACTGCCT
 GGCTGCCTCCAGCTCTGCCTGAGCCTCCTGGCATCCTGGCCCTCAGCCTCC
 AGACGTGGGCTCCTCCGACCCTCTGCGGCTGGTCGAGCCTTCCAGCTGCTGA
 GCCCTAGCTTCTGGGC

SEC ID N°: 13-variantes de FGF21-Consenso

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
 KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREX₁LLEDGYNVYQSE
 AHGLX₂LHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPPPDVGSSDP
 X₃ X₄LV X₅PSQLLSPSFLG

5

X₁ es L o D
 X₂ es P o W
 X₃ es L o Y
 X₄ es S o R
 X₅ es G o E

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

15

<120> VARIANTES DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21

<130> X-19386

20

<150> 61/542906

<151> 04-10-2011

<160> 13

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 548 214 T3

<400> 1

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Cys His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Asp Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Lys Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser Gln Leu Leu Ser
165 170 175

Pro Ser Phe Leu Gly
180

5 <210> 2
<211> 181
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 548 214 T3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

5

10

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ala

5 <210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 10 <400> 4

Met Lys Ile Cys Ser Leu Thr Leu Leu Ser Phe Leu Leu Leu Ala Ala
1 5 10 15

Gln Val Leu Leu Val Glu Gly
20

15 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 5

Met Lys Ala Leu Val Ile Leu Gly Phe Leu Phe Leu Ser Val Ala Val
1 5 10 15

Gln Gly

25 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Construcción sintética
 35 <400> 6

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

40 <210> 7
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 548 214 T3

<400> 7

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Cys His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Asp Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Lys Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Gly Pro Ser Gln Leu Leu Ser
165 170 175

Pro Ser Phe Leu Gly
180

5 <210> 8
<211> 181
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

ES 2 548 214 T3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Cys His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Trp Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Lys Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Tyr Ser Leu Val Glu Pro Ser Gln Leu Leu Ser
 165 170 175
 Pro Ser Phe Leu Gly
 180

<210> 9
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 9

5

10

ES 2 548 214 T3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Cys His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Lys Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Tyr Ser Leu Val Glu Pro Ser Gln Leu Leu Ser
 165 170 175
 Pro Ser Phe Leu Gly
 180

<210> 10
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

5

10

ES 2 548 214 T3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Cys His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Trp Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Lys Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser Gln Leu Leu Ser
 165 170 175
 Pro Ser Phe Leu Gly
 180

<210> 11
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 11

5

10

ES 2 548 214 T3

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
 20 25 30
 Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
 35 40 45
 Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 50 55 60
 Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 85 90 95
 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
 100 105 110
 His Cys Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
 115 120 125
 Pro Cys Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
 130 135 140
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 145 150 155 160
 Pro Leu Ala Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 165 170 175

Ser

<210> 12
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 12

ES 2 548 214 T3

caccctatcc ctgactccag ccctctgctg cagtttggcg gacaggtccg gcagcggtag	60
ctgtacaccg acgacgcca gcagaccgag tgccacctgg aatccggga ggacggcacc	120
gtgggctgtg ccgcccacca gtcccctgag tccctgctgc agctgaaggc cctgaagcct	180
ggcgtgatcc agatcctggg cgtgaaaacc tcccggttcc tgtgccagag gcctgatggc	240
gccctgtacg gctccctgca cttcgacct gaggcctgct ccttccggga ggacctgctg	300
gaagatggct acaacgtgta ccagtcagag gctcacggcc tgccctctgca tctgctggc	360
gacaagtccc cccaccgaa gcctgctcct agggggccctg ccagattcct gccactgcct	420
ggcctgcctc cagctctgcc tgagcctcct ggcatacctgg ccctcagcc tccagacgtg	480
ggctcctccg accctctgcg gctggtcgag ccttcccagc tgctgagccc tagcttctg	540
ggc	543

5 <210> 13
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> Xaa en la posición 98 es Leu o Asp

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (115)..(115)
 <223> Xaa en la posición 115 es Pro o Trp

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (166)..(166)
 <223> Xaa en la posición 166 es Leu o Tyr

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (167)..(167)
 <223> Xaa en la posición 167 es Ser o Arg

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (170)..(170)
 <223> Xaa en la posición 170 es Gly o Glu

<400> 13

ES 2 548 214 T3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Cys His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Xaa Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Xaa Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro His Arg Lys Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Xaa Xaa Leu Val Xaa Pro Ser Gln Leu Leu Ser
 165 170 175
 Pro Ser Phe Leu Gly
 180

REIVINDICACIONES

1. Una variante del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) humano, en la que la secuencia de aminoácidos es

**HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPLGLPPALPEPPGILAPPPDVGSSDPLR
LVEPSQLLSPSFLG (SEC ID N°:1).**

- 5
2. Una composición farmacéutica que comprende la variante de la Reivindicación 1 y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 3. Variante de la Reivindicación 1 para su uso en terapia.
 4. Variante de la Reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia o el síndrome metabólico o cualquier combinación de los mismos.