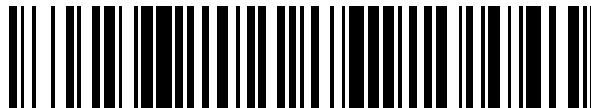


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 078**

51 Int. Cl.:

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/US2013/044192**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13729210 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2859014**

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

30 Prioridad:

11.06.2012 US 201261658110 P

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

08.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 632 078 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

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

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 al alza de la expresión de GLUT1, un mecanismo distinto al 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 del FGF21 condujo a una pérdida del peso corporal acumulativa de una manera dependiente de la dosis. De este modo, FGF21 tiene una utilidad potencial para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la dislipidemia y el síndrome metabólico.

Se han descrito variantes del FGF21 humano en los documentos WO2010/084169, WO2010/065439, WO2006/028595 y W02005/061712.

Los problemas asociados con el FGF21 humano de tipo natural y variantes conocidas del FGF21 son la baja potencia y/o la estabilidad farmacéutica de las moléculas. De este modo, aún existe una necesidad de variantes alternativas de FGF21 que sean potentes y/o estables.

La presente invención proporciona variantes alternativas del FGF21. Las variantes del FGF21 de la presente invención tienen ventajas sobre el FGF21 humano de tipo natural y las variantes conocidas del FGF21 desveladas en la técnica. Estas ventajas incluyen una potencia mejorada y/o una estabilidad farmacéutica mejorada. Además de la potencia mejorada, las variantes del FGF21 de la presente invención tienen una o más características de estabilidad 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 y proteólisis durante la producción en sistemas celulares de mamíferos y/o estabilidad química mejorada. Adicionalmente, las variantes del FGF21 de la presente invención son potencialmente útiles para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico.

La presente invención proporciona una variante del FGF21, en donde la secuencia de aminoácidos es

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
 KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSE
 AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPPPDVGSSDPLR
 LVEPSQLRSPSFE (SEC. ID. N.º 1).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante del FGF21 de la presente invención y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria se desvela un método para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico en un paciente que comprende administrar al paciente una variante del FGF21 de la presente invención.

En la presente memoria se desvela además un método para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico en un paciente que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la presente invención.

Además, la presente invención proporciona una variante del FGF21 de la presente invención para su uso en terapia. Preferiblemente, la presente invención proporciona una variante del FGF21 de la presente invención para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico.

En la presente memoria se desvela además el uso de una variante del FGF21 de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico.

El FGF21 humano de longitud completa de tipo natural es un polipéptido de 208 aminoácidos que contiene un péptido señal de 27 aminoácidos. El FGF21 humano maduro de tipo natural comprende el polipéptido de longitud completa sin el péptido señal de 27 aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de 181 aminoácidos (SEC.

5 ID. N.º 2). Los cambios en las posiciones de aminoácidos de las variantes del FGF21 de la presente Invención se determinan a partir de las posiciones de aminoácidos del polipéptido del FGF21 humano maduro de tipo natural (SEC. ID. N.º 2). De este modo, una sustitución descrita en la presente memoria como "A31C" se refiere a una sustitución del aminoácido Cys con el aminoácido de tipo natural Ala en la posición 31 de la variante del FGF21 humano maduro de tipo natural.

10 Es importante destacar que una sustitución de un residuo de aminoácidos en una variante particular puede afectar a las características de las variantes en su totalidad, y que el efecto total 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 del FGF21, no obstante, también se cree que P115W contribuye a la auto-asociación que causa agregación. Por lo tanto, el efecto total es perjudicial para las variantes, y de este modo, la sustitución P115W no se incluye en las variantes del FGF21 de la presente invención. Otro ejemplo relaciona la sustitución de aminoácidos R175L, que aumenta la potencia de la variante del FGF21. No obstante, se descubrió que las variantes del FGF21 que tienen la sustitución R175L eran susceptibles a la proteólisis, de este modo, el efecto total fue perjudicial. Para abordar la proteólisis C-terminal observada con las variantes del FGF21 de la presente invención, los aminoácidos en las posiciones 180 y 181 (L en la posición 180 y G en la posición 181) se sustituyen con el aminoácido E en la posición 180 y se deleciona el aminoácido en 181. Estas modificaciones disminuyen esencialmente la proteólisis C-terminal, pero también reducen la potencia farmacológica de la variante del FGF21 por una medición con un factor de medición de 25 en el ensayo en células 293-βKlotho-SRE luc humanas. Sorprendentemente, la potencia se restaura invirtiendo el residuo de aminoácidos en la posición 175 (R175L) de nuevo a R de tipo natural. Por lo tanto, el efecto total de esta sustitución es perjudicial para las variantes, y de este modo la sustitución R175L no está incluida en las variantes preferidas del FGF21 de la presente invención.

15 Las variantes de la presente invención son variantes biológicamente activas potentes como se demuestra para la SEC. ID. N.º 1 en el Ejemplo 2. Las variantes del FGF21 de la presente invención contienen sustituciones de aminoácidos que, en conjunto, no sólo mejoran la potencia, sino que también son compatibles con otros cambios de aminoácidos que, a su vez, proporcionan características de estabilidad mejoradas y estabilidad *in vivo* aumentada. Las sustituciones de aminoácidos de las variantes del FGF21 de la presente invención que mejoran la potencia incluyen D127K, S167R y G174L (véase el Ejemplo 2).

20 La exposición de una solución concentrada de variante del FGF21 humano de tipo natural a un conservante farmacéutico, tal como *m*-cresol, aumenta la propensión de la variante 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 natural. Las variantes del FGF21 de la presente invención incorporan las sustituciones de aminoácidos A31C y G43C que mejoran en gran medida la estabilidad térmica y la compatibilidad con los conservantes sin comprometer la actividad biológica. Se han descrito previamente variantes del FGF21 de alta potencia que también incluyen las sustituciones A31C/G43C. Estas variantes notificadas muestran una compatibilidad con los conservantes significativamente mejorada con respecto al FGF21 de tipo natural, pero aún son propensas a la agregación en presencia de conservantes. Esta agregación a la variante aumenta el riesgo de inmunogenicidad, reduciendo así la aceptabilidad de las variantes como una proteína terapéutica.

25 Sorprendentemente, las variantes preferidas del FGF21 de la presente invención incluyen las sustituciones de aminoácidos L98D y L100K, que dan lugar a una formación de agregados de alto peso molecular significativamente más baja a altas concentraciones. Ventajosamente, las sustituciones de aminoácidos L98D y L100K no disminuyen la potencia de las variantes y minimizan el problema de agregación perjudicial.

30 Un sistema preferible de expresión comercial para la fabricación de las variantes del FGF21 de la presente invención es la estirpe celular CHO-K1 de mamífero. No obstante, las estirpes celulares de mamífero CHO-K1 y HEK293 pueden causar modificaciones post-traduccionales al FGF21 humano maduro de tipo natural a través de la sulfatación de la cadena lateral de la tirosina en la posición 179. La sulfatación de los residuos de tirosina en las posiciones 179 y 180 (si están presentes) disminuye la potencia y es una fuente no deseada de heterogeneidad del producto. De este modo, cuando se expresa una variante del FGF21 que tiene Tyr en la posición 179 y/o 180 a partir de las estirpes celulares CHO-K1 o HEK293, una determinada proporción de las variantes expresadas puede estar sulfatada en la posición 179, otras pueden estar sulfatadas en la posición 180, mientras que otras pueden estar sulfatadas en ambas posiciones y algunas en ninguna posición. Esto conduce a una población de variantes heterogénea e impredecible con una potencia disminuida.

35 Las variantes del FGF21 de la presente invención incluyen una sustitución de aminoácidos que ha resuelto esta sulfatación perjudicial. De este modo, la sustitución de aminoácidos Y179F se ha incorporado en las variantes. Y179F elimina la sulfatación resultante de la producción en células CHO-K1 y HEK293. Además, la sustitución de aminoácidos Y179F es compatible con las otras sustituciones de aminoácidos favoritas de la presente invención y se determina para ser un cambio neutro con respecto a la potencia.

40 El FGF21 humano de tipo natural 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 cangrejeros con el FGF21 de tipo natural es el fragmento que termina en la posición 171. Se ha determinado que los

residuos que cubren 1 a 171 del fragmento del FGF21 son ~100 veces menos potentes en ensayos de potencia *in vitro*. Eliminando este sitio de escisión proteolítica puede mejorarse la eficacia del fármaco aumentando la exposición al fármaco activo. Se ha mostrado que la sustitución de aminoácidos G170E retarda significativamente la escisión en ratón y elimina prácticamente la proteólisis en la posición 171 cuando se mide después de 24 horas en monos cangrejeros. 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 de aminoácidos G170E se incorpora en las variantes del FGF21 de la presente invención.

El FGF21 humano de tipo natural es también susceptible a una carboxipeptidasa producida en la fabricación de CHO-K1, y la sustitución de aminoácidos A180E y la delección de aminoácidos en la posición 181 retardan este procesamiento, reduciendo así la heterogeneidad de la longitud de la variante expresada (es decir, heterogeneidad en el número de residuos de aminoácidos en la variante madura expresada por la estirpe celular). Aunque la sustitución de aminoácidos A180E y la delección de aminoácidos en la posición 181 no eliminan la proteólisis C-terminal en la expresión en células de mamífero, es bastante eficaz retardando la proteólisis mientras que se mantiene la potencia en el contexto de otras sustituciones de aminoácidos deseadas halladas en las variantes del FGF21 de la presente invención. En vista de esta característica ventajosa, la sustitución de aminoácidos A180E y la delección de aminoácidos en la posición 181 se incorporan en las variantes preferidas del FGF21 de la presente invención.

En la presente memoria se desvelan polinucleótidos que codifican las variantes descritas anteriormente que pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, cuyo 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.

Los polinucleótidos que codifican las variantes de la presente invención pueden incluir los siguientes: sólo la secuencia codificante de las variantes, la secuencia codificante de las variantes y una secuencia codificante adicional, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia pro-variante; la secuencia codificante y la secuencia no codificante de las variantes, tal como intrones o la secuencia 5' no codificante y/o 3' de la secuencia codificante de las variantes. De este modo, la expresión "polinucleótido que codifica una variante" abarca un polinucleótido que puede incluir no sólo la secuencia codificante de las variantes sino también un polinucleótido que incluye una secuencia codificante y/o no codificante adicional.

Los polinucleótidos desvelados de la presente memoria se expresarán en una célula huésped después de que las secuencias se hayan ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión. Los vectores de expresión son normalmente replicables en los organismos huésped como episomas o como una parte integrante del ADN cromosómico huésped. 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.

Las variantes del FGF21 de la presente invención pueden producirse con facilidad 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 huésped se cultivan utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Las células huésped de mamífero preferibles son las de la estirpe celular CHOK1SV que contienen un sistema de expresión de glutamina sintetasa (GS) (véase el documento US 5.122.464).

Los vectores que contienen las secuencias polinucleóticas de interés (por ejemplo, las variantes del FGF21 y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían en función del tipo de huésped 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 utilizarse para otros huéspedes celulares.

Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y dichos métodos 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 del FGF21 de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de los medios conocidos en la técnica que generalmente alcanzan el fin previsto para tratar la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico. La vía de administración preferida es la parenteral. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, de la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los niveles de dosificación típicos pueden optimizarse utilizando técnicas clínicas convencionales y dependerán del modo de administración y la afección del paciente y pueden determinarse por una persona que tiene conocimientos básicos en la técnica.

Las variantes del FGF21 de la presente invención se formulan según métodos 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 portadores, 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 del FGF21 de la presente invención pueden formularse con un tampón farmacéuticamente aceptable y el pH puede ajustarse para proporcionar una estabilidad aceptable y un pH aceptable para la administración. Además, las composiciones del FGF21 de la presente invención pueden colocarse en un recipiente, tal como un vial, un cartucho, un dispositivo de administración tipo inyector, una jeringa, un tubo de administración intravenosa o una bolsa de administración intravenosa.

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 de colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LBD) y las concentraciones de triglicéridos, y/o una disminución de la concentración de colesterol en lipoproteínas de alta densidad (LAD) 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 (40 pulgadas) o mayor; azúcar alta en sangre de al menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después del ayuno; triglicéridos altos de al menos 105 mg/dl en el torrente sanguíneo; LAD bajo de menos de 40 mg/dl; y/o presión sanguínea de 130/85 o superior.

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, preferiblemente un ser humano.

El término "tratar" (o "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 una variante de la presente invención descrita en la presente memoria, que tras la administración de una dosis única o múltiples dosis 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 los niveles circulantes de glucosa siguen siendo excesivamente altos como resultado de una depuración inadecuada de glucosa.

La presente invención se puede practicar haciendo referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, estos no deben ser interpretados como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Expresión de las variantes del FGF21 en las células CHOK1SV

Las variantes del FGF21 de la presente invención se producen en un sistema de expresión en células de mamíferos utilizando células CHOK1SV. Los genes que codifican las variantes del FGF21 se subclonan en los esqueletos plasmídicos de expresión que contienen glutamina sintetasa (GS) (plásmidos basados en pEE12.4). La secuencia de ADNc que codifica las variantes del FGF21 se fusiona en un marco con la secuencia codificante de las secuencias preferidas del péptido señal para potenciar la secreción del producto deseado en el medio de cultivo tisular. Las secuencias preferidas del péptido señal son los polipéptidos que se muestran en las secuencias de aminoácidos SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, o SEC. ID. N.º 6.

La expresión se estimula por el promotor viral del citomegalovirus (CMV). Las células CHOK1SV se transfectan de modo estable utilizando electroporación y la cantidad apropiada de plásmido de expresión recombinante y las células transfectadas se mantienen en un cultivo en suspensión, a la densidad celular adecuada. La selección de las células transfectadas se logra mediante el crecimiento en medio libre de suero que contiene metionina sulfoximina (MSX) e incubación a 35-37 °C y CO₂ al 5-7 %.

Se miden y determinan estirpes celulares derivadas clonalmente mediante el uso de un citómetro de flujo. La expresión de una variante del FGF21 en células de mamífero produce generalmente la secuencia N-terminal natural, HPIP, es decir, sin un residuo de metionina en el extremo N-terminal, tal como la variante del FGF21 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º 1.

Las variantes del FGF21 secretadas en el medio a partir de las células CHO se purifican mediante un procedimiento por el cual se calienta el medio de cultivo celular aclarado a 50-60 °C durante hasta dos horas, se enfrían, se tratan con detergente (Triton X-100) para la inactivación viral y se aplican a una columna de cromatografía de modo mixto Capto MMC (GE Healthcare). La variante del FGF se eluye a partir de la columna utilizando un tampón de pH 8, y el grupo del producto posterior se ajusta con una solución de 50 mM de ácido cítrico, 150 mM de NaCl a un intervalo de pH de 3,2 a 3,5 durante una hora para la inactivación viral. Se ajusta la solución a un pH 6,7 a 7,3 mediante la adición de tampón Tris y la variante del FGF se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio

hidrófobo utilizando una resina de fenilsefarosa de alto rendimiento (GE Healthcare). La columna de interacción hidrófoba se eluye con un gradiente decreciente de sulfato de sodio a pH 7. La variante del FGF purificada por CIH se somete a un intercambio de tampón en un tampón Tris a pH 8 que contiene NaCl y se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico en una resina Source 30Q (GE Healthcare). La columna de intercambio aniónico se eluye con una concentración creciente de cloruro de sodio a pH 8. La variante del FGF purificada se pasa a través de un filtro de retención viral Planova 20N (Asahi Kasei Medical) seguido por la concentración/diafiltración en 10 mM de citrato, 150 mM de NaCl, pH 7 utilizando ultrafiltración de flujo tangencial en una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 2

10 Ensayo de captación de glucosa en fibroblastos 3T3-L1-βKlotho

Los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se generan a partir de fibroblastos 3T3-L1 mediante la transducción retroviral de un vector de expresión de mamíferos dirigido por CMV que contiene la secuencia codificante de βKlotho de tipo natural de ratón y un marcador de resistencia a blasticidina. Las células resistentes a blasticidina se seleccionan después del cultivo durante 14 días en presencia de 15 μM de blasticidina, y la expresión de la variante βKlotho se verifica mediante inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo anti-βKlotho. Los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se mantienen en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternera al 10 %, y 15 μM de blasticidina hasta que se sembraron en placas para su uso experimental.

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

La potencia (CE₅₀) *in vitro* de la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 en el ensayo de captación de glucosa con fibroblastos 3T3-L1-βKlotho es de 0,051 μM.

Ejemplo 3

30 Estabilidad física

La estabilidad física de las variantes del FGF21 se determina según se indica. Las variantes se dializan y se preparan a 1-2 mg/ml en 10 mM de histidina, pH 7, con o sin 150 mM de NaCl y se analizan por CET para determinar el % de APM (Tabla 1: "Inicial").

El método de separación por CET se realiza en un Tosoh Bioscience 3000SWXL, una columna de 5 micrómetros con dimensiones 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil es citrato 0,01 M, 150 mM de NaCl, pH 7 a un caudal de 0,5 ml/minuto. Las muestras iniciales de baja concentración se aplican como inyecciones de 10 mcl y se controlan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm, mientras que se aplican muestras de 30 mg/ml como inyecciones de 1 mcl y se controlan a 280 nm.

A continuación, las variantes se concentran a 30 mg/ml y se analizan de nuevo (t = 0). El % de APM para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 aumentó de 0,15 % a 0,9 % hasta la concentración en tampón de histidina en presencia de sal. El % de APM para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 aumentó de 0,15 % a 0,7 % hasta la concentración en tampón de histidina con sal. En ausencia de sal, el % de APM para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 aumentó de 0,2 % a 3,2 % hasta la concentración y para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 aumentó de 0,13 % a 1,0 %. De este modo, tanto la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 como la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 tienen un % menor de APM inicial y un % menor de APM cuando se formulan variantes a 30 mg/ml en presencia de 150 mM de NaCl. Estos datos demuestran la importancia de la mutación L100K que está presente en la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1, pero no está presente en la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7.

Las formulaciones a 30 mg/ml se incuban durante 4 semanas a 4 °C, 25 °C, y 40 °C para evaluar la estabilidad a largo plazo en condiciones de estrés. Como se muestra en la Tabla 1, el % de APM se determina de nuevo a las 4 semanas de tiempo (t = 4 semanas). El % de APM para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 aumentó de 3,2 % a 6,6 % a 40 °C en ausencia de sal. El % de APM para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 aumentó de 1 % a 5,3 % a 40 °C. El % de APM para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 aumentó de 0,9 % a 2,3 % a 40 °C en presencia de sal y para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 aumentó de 0,7 % a 1,7 %. Después de 4 semanas a 25 °C, los niveles de % de APM fueron de sólo 1,1 % para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1, mientras que eran de 2,9 % para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 en ausencia de sal. Estos datos demuestran el efecto beneficioso de incluir la mutación L100K presente en la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1.

Tabla 1: Estabilidad física

Variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7			
	Inicial	% de APM a 30 mg/ml (t=0)	% de APM a 30 mg/ml (t=4 semanas)
10 mM de histidina, pH7, 150 mM de NaCl	0,15 %	0,9 %	
4 °C			1,1 %
25 °C			1,5 %
40 °C			2,3 %
10 mM de histidina, pH7,	0,2 %	3,2 %	
4 °C			2,5 %
25 °C			2,9 %
40 °C			6,6 %
Variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1			
	Inicial	% de APM a 30 mg/ml (t=0)	% de APM a 30 mg/ml (t=4 semanas)
10 mM de histidina, pH7, 150 mM de NaCl	0,15 %	0,7 %	
4 °C			0,8 %
25 °C			0,8 %
40 °C			1,7 %
10 mM de histidina, pH7,	0,13 %	1,0 %	
4 °C			0,6 %
25 °C			1,1 %
40 °C			5,3 %

Ejemplo 4**Heterogeneidad de la expresión de R175 y E180**

- 5 La producción de un producto de una variante homogénea es deseable puesto que asegura mejor un producto consistente y bien caracterizado. Para evaluar la heterogeneidad del producto, una alícuota de 10 µl de la muestra se mezcla con 90 µl de SSTFD. La muestra se analiza mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), utilizando las siguientes condiciones: la fase móvil A es ATF al 0,05 %, la fase móvil B es ATF al 0,04 % en acetonitrilo, la columna es una columna PLRPS de 2,1 X 50 mm, el volumen de inyección es de 15 µl.

- 10 **Tabla 2: Condiciones del gradiente para la separación por cromatografía líquida**

Tiempo (min)	0	1	15	16	20	20,1	30
% B	5	35	40	90	90	5	5
Flujo (µl/min)	200	200	200	200	200	200	200

- 15 Un espectrómetro de masas Waters Micromass LCT Premier™ se calibró hasta un intervalo de masas comprendido entre 400 a 1990 amu, polaridad ES+, capilar 3000, cono de muestra de 40 V, la abertura 1 es de 25 V, la temperatura de la fuente es de 105 °C, el cono del flujo de gas se encuentra a 50 l/hora, la temperatura de evaporación del solvente es de 150 °C, y el flujo de gas de evaporación del solvente es de 600 l/hora.

Tabla 3: Caracterización por CL/EM de las variantes del FGF21

Variante del FGF21	1-181	1-180	1-179
Variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7	33,7 %	63 %	3,3 %
Variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1	100 %		

La Tabla 3 notifica la heterogeneidad resultante en cada variante del FGF21 que se determina por el método CL/EM. El producto 1-181 representa la variante del FGF21 de longitud completa de SEC. ID. N.º 7. La variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 es susceptible a truncamientos en el extremo C-terminal, especialmente la eliminación del residuo de aminoácidos glicina en la posición 181. Como se muestra en la Tabla 3, el 33,7 % del producto purificado para la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 7 es el fragmento 1-181 de longitud completa previsto; el fragmento 1-180 constituye la porción más grande del producto purificado. Además, también se detectaron pequeñas cantidades de producto 1-179.

La variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 tiene el residuo de aminoácidos en 181 delecionado en la construcción genética y el residuo de aminoácidos 180 se ha sustituido con ácido glutámico (E). Estos cambios protegen el extremo C-terminal de la degradación durante la expresión de CHO, dando como resultado un producto 1-180 purificado homogéneo al 100 %.

Ejemplo 5

Disminución de glucosa en un modelo de ratón *Ob/ob*

Los ratones macho *ob/ob* y los controles (delgados) con la misma edad *ob/m* tienen 7 semanas de edad a su llegada y 8-9 semanas de edad al inicio del tratamiento. A su llegada, todos los ratones se alojaron solos y se les permitió aclimatarse durante 1-2 semanas antes del comienzo del tratamiento. Los ratones se alimentaron con Purina Rodent Chow 5015 y se les dio agua potable *ad libitum* de un dispensador. Los ratones se alojan en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con una temperatura ambiente establecida a 23,8 °C (75 ° F). Uno a dos días antes del inicio del tratamiento, se recogen muestras de sangre por medio de la extracción de sangre de la cola. Se miden los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro en sangre AccuCheck Avivia (Roche) y se recogen las muestras de suero para el ensayo de insulina utilizando el kit de ensayo de insulina ratón/rata Meso Scale. En el día del inicio del tratamiento (día 0), se clasifican los ratones en grupos basándose en el pre-tratamiento del peso corporal, la glucosa en sangre y la insulina en suero (software de clasificación BRAT). En el día 0 y en el día 3, los ratones se dosifican por vía SC con 0,1 a 30 nmol/kg de la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 5, en un volumen de 10 ml/kg. El vehículo dosificador es TFS estéril (HyClone SSTFD/magnesio y calcio modificados) que contiene albúmina de suero de ratón al 0,03 % (ASR, Sigma A3139). La glucosa en sangre se mide diariamente durante 7 días y se determina la ABC. Los cálculos de la DE₅₀ para la disminución de glucosa se basan en la ABC. Los homogeneizados de hígado se recogen en el momento del sacrificio y los triglicéridos del hígado se miden en el analizador clínico Hitachi Modular P.

En el día 14, los ratones tratados con un vehículo fueron hiperglucémicos con unos niveles de glucosa en sangre medios medidos a 348 ± 19,5 mg/dl (media ± EEM), mientras que los ratones de control delgados *ob/m* tenían niveles de glucosa en sangre de 165 ± 3,2 mg/dl (media ± EEM). La variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 disminuyó la glucosa en sangre hasta niveles comparables con los controles delgados *ob/m*. La DE₅₀ de la variante del FGF21 de SEC. ID. N.º 1 fue de 1,296 nmol/kg, (intervalo de confianza del 95 % = -0,07-0,30).

Secuencias

SEC. ID. N.º 1 - Variante del FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDTGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVEPSQLRSPSFE

SEC. ID. N.º 2 - FGF21 de tipo natural (*Homo Sapiens*)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDTGTVGGAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVGPSQGRSPSYAS

SEC. ID. N.º 3 - Péptido señal de la transferrina humana (hTrf)

MRLAVGALLVCAVLGLCLA

SEC. ID. N.º 4 - Péptido señal de la proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 1 (hFGFP-1)

MKICSLTLLSFLLLAAQVLLVEG

SEC. ID. N.º 5 - Péptido señal de la lisozima bovina

MKALVILGFLFLSVAVQG

SEC. ID. N.º 6 - Péptido señal de la cadena ligera murina (mkappa)

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

5 **SEC. ID. N.º 7- Variante del FGF21**

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVEPSQLLSPSFLG

SEC. ID. N.º 8 - Variante del FGF21 (ADN)

CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCA
GCGGTACCTGTACACCGACGACGCCAGCAGACCGAGTGCCACCTGGAAATC
CGGGAGGACGGCACCGTGGGCTGTGCCGCCGACCAGTCCCCTGAGTCCCTGC
TGCAGCTGAAGGCCCTGAAGCCTGGCGTGATCCAGATCCTGGGCGTGAAAAC
CTCCCGGTTCCCTGTGCCAGAGGCCTGATGGCGCCCTGTACGGCTCCCTGCACT
TCGACCCTGAGGCCTGCTCCTTCCGGGAGGACCTGAAGGAAGATGGCTACAA
CGTGTACCAGTCCGAGGCTCACGGCCTGCCTCTGCATCTGCCTGGCGACAAGT
CCCCCACCAGGAAAGCCTGCTCCTAGGGGCCCTGCCAGATTCCTGCCACTGCCT
GGCCTGCCTCCAGCTCTGCCTGAGCCTCCTGGCATCCTGGCCCCTCAGCCTCC
AGACGTGGGCTCCTCCGACCCTCTGCGGCTGGTCGAGCCTTCCAGCTGCGGA
GCCCTAGCTTCGAG

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> VARIANTES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21

<130> X19697

<150> 61/658110

15 <151> 11-06-2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 180

20 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

ES 2 632 078 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 Asp Leu Lys 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 Arg Ser
 165 170 175

Pro Ser Phe Glu
 180

<210> 2
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> HOMO SAPIENS
 <400> 2

5

ES 2 632 078 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> ARTIFICIAL

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

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> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Construcción sintética

<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

10 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

15 <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

20 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Construcción sintética

<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

25 <210> 7
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 7

ES 2 632 078 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 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

<210> 8
<211> 540
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

5

ES 2 632 078 T3

cacccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag	60
ctgtacaccg acgacgcca gcagaccgag tgccacctgg aaatccggga ggacggcacc	120
gtgggctgtg ccgccgacca gtcccctgag tcctgctgc agctgaaggc cctgaagcct	180
ggcgtgatcc agatcctggg cgtgaaaacc tcccggttcc tgtgccagag gcctgatggc	240
gccctgtacg gctccctgca cttcgaccct gaggcctgct ccttccggga ggacctgaag	300
gaagatggct acaacgtgta ccagtccgag gctcacggcc tgcctctgca tctgcctggc	360
gacaagtccc cccaccgga gcctgctcct aggggccctg ccagattcct gccactgcct	420
ggcctgcctc cagctctgcc tgagcctcct ggcacacctg ccctcagcc tccagacgtg	480
ggctcctccg accctctgcg gctggctgag ccttcccagc tgcggagccc tagcttcgag	540

REIVINDICACIONES

1.- Una variante del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), en donde la secuencia de aminoácidos es
HPIPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVEPSQLRSPSFE (SEC. ID. N.º 1).

- 5
- 2.- Una composición farmacéutica que comprende la variante de la reivindicación 1 y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 - 3.- La variante de la reivindicación 1 para su uso en terapia.
 - 4.- La variante de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, la obesidad, la dislipidemia y/o el síndrome metabólico.