

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 787**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013** **PCT/US2013/044190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO13188181**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013** **E 13730733 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2858662**

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

30 Prioridad:

11.06.2012 US 201261658104 P
12.03.2013 US 201361777386 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2017

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 2 644 787 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

Proteínas del factor de crecimiento de fibroblastos 21

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

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

Las proteínas FGF21 se han descrito en los documentos WO2010/042747, WO2010/285131, y WO2009/149171.

Los problemas asociados con FGF21 de tipo salvaje humano y con las proteínas FGF21 conocidas son una semivida corta *in vivo*, una baja potencia y/o inestabilidad farmacéutica de las moléculas. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de proteínas FGF21 alternativas que sean de acción prolongada, potentes y/o estables.

La presente invención proporciona proteínas FGF21 alternativas. Ciertas proteínas FGF21 de la presente invención tienen ventajas sobre FGF21 de tipo silvestre humano y proteínas FGF21 conocidas divulgadas en la técnica. Estas ventajas incluyen tener una semivida prolongada, una potencia mejorada y/o una estabilidad farmacéutica mejorada. Además de una potencia mejorada, ciertas proteínas FGF21 de la presente invención tienen una o más características de estabilidad ventajosas que son útiles para una fabricación y/o formulación eficientes como una proteína terapéutica, incluyendo degradación proteolítica *in vivo* reducida, susceptibilidad reducida a la oxidación, propensión reducida a agregarse a altas concentraciones, niveles bajos de modificaciones postraduccionales y proteólisis durante la producción en sistemas de células de mamífero, y/o estabilidad química mejorada. Además, las proteínas FGF21 de la presente invención son potencialmente útiles para el tratamiento de diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico.

En el presente documento se divulga una proteína FGF21, en la que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en la que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4, en la que la porción Fc consiste en una región bisagra, dominios de región constante CH2 y CH3 de un anticuerpo, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en la que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.

Además, se divulga en el presente documento una proteína FGF21, en la que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en la que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en la que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.

En el presente documento se divulga una proteína FGF21, en la que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en la que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en la que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En el presente documento se divulga una proteína FGF21, en la que la secuencia de aminoácidos es

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGGSGGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDD
AQQTECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDG
ALYGSLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPDGDSPHRKPAPRGPA
RFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE (SEQ ID NO: 5).

La proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 descrita anteriormente incluye la secuencia de porción Fc de IgG4 de SEQ ID NO: 14, la secuencia enlazadora de SEQ ID NO: 11 que se identifica en negrita, y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 1 que está subrayada.

- 5 Además, en el presente documento se divulga una proteína FGF21, en la que la secuencia de aminoácidos es

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGGSGGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY
SLHFDPEACSFREX₁LX₂EDGYNVYQSEAHGLPLHLPDGDSPHRKPAPRGPARFLP
LPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLX₃SPSFX₄X₅ (SEQ ID NO: 15)

en la que X₁ es L o D, X₂ es L o K, X₃ es R o L, X₄ es L o E, y X₅ es G o está ausente. La presente invención también proporciona una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que X₁ es D, X₂ es L o K, X₃ es L, X₄ es L, y X₅ es G. Además, la presente invención proporciona una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que X₁ es L o D, X₂ es L o K, X₃ es R, X₄ es E, y X₅ está ausente.

- 10 En el presente documento se divulga una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que la proteína FGF21 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9. En el presente documento se divulga una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que la proteína FGF21 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9. Además, en el presente documento se divulga
- 15 una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que la proteína FGF21 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7. La proteína FGF21 mucho más preferida es SEQ ID NO: 5.

En el presente documento se divulga una composición farmacéutica que comprende una proteína FGF21 descrita en el presente documento, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 En el presente documento se describe un procedimiento para tratar diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico en un paciente, que comprende administrar al paciente una proteína FGF21 descrita en el presente documento.

En el presente documento se divulga un procedimiento para tratar diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico en un paciente, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

- 25 Además se divulga en el presente documento una proteína FGF21 descrita en el presente documento para su uso en terapia. En el presente documento se divulga una proteína FGF21 descrita en el presente documento para su uso en el tratamiento de diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico.

Además, se divulga en el presente documento el uso de una proteína FGF21 descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico.

5 Se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican la proteína FGF21 descrita anteriormente de la presente invención.

Además, en el presente documento se describe un polinucleótido que codifica una proteína FGF21 descrita en el presente documento, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína FGF21 consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4, en el que la porción Fc consiste en una región bisagra, dominios de región constante CH2 y CH3 de un anticuerpo, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en la que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.

10 En el presente documento se describe un polinucleótido que codifica la proteína FGF21 descrita en el presente documento, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína FGF21 consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.

Además, en el presente documento se describe un polinucleótido que codifica una proteína FGF21 descrita en el presente documento, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína FGF21 consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

25 Además, la presente invención proporciona una molécula de ADN que codifica los polipéptidos de la invención, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLGLGSGGGGSGGGGSAHPIDSSPLLQFGGQVRQRYL
YTDDAQQTECHLEIREDTGTVGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQ
RPDGALYGSLLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPDGKSPHRKPAP
RGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE (SEQ ID
NO: 5).

En el presente documento se divulga un polinucleótido que codifica una proteína FGF21 divulgada en el presente documento, en el que la secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 13.

30 Los polinucleótidos que codifican las proteínas descritas anteriormente 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 de codificación que codifican las proteínas de la presente invención pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético.

35 Los polinucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención pueden incluir lo siguiente: solamente la secuencia codificante de las proteínas, la secuencia codificante de las proteínas y la secuencia codificante adicional, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia pro-proteína; la secuencia codificante de las proteínas y la secuencia no codificante, tal como los intrones o la secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante de las proteínas. Por lo tanto, la expresión "polinucleótido que codifica una proteína" incluye un polinucleótido que puede incluir no sólo la secuencia codificante de las proteínas, sino también un polinucleótido que incluye una secuencia codificante adicional y/o una secuencia no codificante, tal como SEQ ID NO: 13.

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

Las proteínas FGF21 divulgadas en el presente documento 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 levadura. Las células huésped se cultivan usando técnicas bien conocidas en la técnica. La célula huésped de mamífero preferida es la línea celular CHOK1SV que contiene un sistema de expresión de glutamina sintetasa (GS) (véase el documento US 5.122.464).

Los vectores que contienen las secuencias polinucleótídicas de interés (por ejemplo, las proteínas de FGF21 y las secuencias de control de expresión) pueden transferirse a la célula huésped por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transformación de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que puede usarse tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros huéspedes celulares.

Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y tales métodos son conocidos 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).

La presente invención proporciona una célula huésped de mamífero transformada con y que comprende una molécula de ADN que codifica un polipéptido, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es SEQ ID NO: 5, célula que es capaz de expresar un homodímero en el que la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido de dicho homodímero es SEQ ID NO: 5.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir un homodímero en el que la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido de dicho homodímero es SEQ ID NO: 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

i) cultivar una célula huésped de mamífero que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en condiciones tales que dicha secuencia polipeptídica se expresa; y

ii) recuperar de dicha célula huésped un homodímero en el que la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido de dicho homodímero es SEQ ID NO: 5.

La proteína FGF21 de la presente invención es un homodímero cuando se expresa en células de mamífero. "Homodímero" como se usa en el presente documento, se refiere a dos proteínas FGF21 de la presente invención que tienen la misma secuencia de aminoácidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5) que se asocian a través de interacciones no covalentes y enlaces disulfuro intermoleculares en la porción Fc.

La presente invención proporciona un homodímero de una proteína FGF21, en el que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4, en el que la porción Fc consiste en una región bisagra, dominios de región constante CH2 y CH3 de un anticuerpo, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.

Además, la presente invención proporciona un homodímero de una proteína FGF21, en el que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.

La presente invención también proporciona un homodímero de una proteína FGF21, en el que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado con un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

La presente invención proporciona un homodímero de una proteína FGF21, en el que la secuencia de aminoácidos es

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDD
AQQTECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDG
ALYGSLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPDGDSPHRKPAPRGPA
RFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE (SEQ ID NO: 5).

La proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 descrita anteriormente incluye la secuencia de porción Fc de IgG4 de SEQ ID NO: 14, la secuencia enlazadora de SEQ ID NO: 11 que se identifica en negrita, y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 1 que está subrayada.

- 5 Además, en el presente documento se divulga un homodímero de una proteína FGF21, en la que la secuencia de aminoácidos es

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY
SLHFDPEACSFREX₁LX₂EDGYNVYQSEAHGLPLHLPDGDSPHRKPAPRGPARFLP
LPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLX₃SPSFX₄X₅ (SEQ ID NO: 15)

- 10 en la que X₁ es L o D, X₂ es L o K, X₃ es R o L, X₄ es L o E, y X₅ es G o está ausente. La presente invención también proporciona un homodímero de una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que X₁ es D, X₂ es L o K, X₃ es L, X₄ es L, y X₅ es G. Además, la presente invención proporciona un homodímero de una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que X₁ es L o D, X₂ es L o K, X₃ es R, X₄ es E, y X₅ está ausente.

- 15 En el presente documento se divulga un homodímero de una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que la proteína FGF21 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9. En el presente documento se divulga un homodímero de una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que la proteína FGF21 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9. Además, en el presente documento se divulga un homodímero de una proteína FGF21 de SEQ ID NO: 15, en la que la proteína FGF21 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7. La proteína FGF21 mucho más preferida es SEQ ID NO: 5.

- 20 La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican el homodímero descrito anteriormente de una proteína FGF21 de la presente invención.

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

- 25 En el presente documento se describe un procedimiento para tratar diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico en un paciente, que comprende administrar al paciente un homodímero de una proteína FGF21 de la presente invención.

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

- 5 Además, se divulga el uso de un homodímero de una proteína FGF21 de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico.

Las proteínas FGF21 de la presente invención pueden ser glicosiladas en la porción Fc en un sitio altamente conservado de N-glicosilación. Además, las proteínas FGF21 de la presente invención son un homodímero cuando se expresan en células de mamífero. "Homodímero" como se usa en el presente documento, se refiere a dos proteínas FGF21 de la presente invención que tienen la misma secuencia de aminoácidos, por ejemplo SEQ ID NO: 10 5, que se asocian a través de interacciones no covalentes y enlaces disulfuro intermoleculares en la porción Fc.

FGF21 de tipo silvestre humano de longitud completa es un polipéptido de 208 aminoácidos que contiene un péptido señal de 27 aminoácidos. FGF21 de tipo silvestre humano maduro comprende el polipéptido de longitud completa sin el péptido señal de 27 aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de 181 aminoácidos (SEQ ID NO: 2).

- 15 Los cambios en las posiciones de aminoácidos de las proteínas FGF21 de la presente invención se determinan a partir de las posiciones de aminoácidos en el polipéptido de FGF21 de tipo silvestre maduro humano (SEQ ID NO: 2) sin una porción Fc de IgG4 y un enlazador. Por ejemplo, la porción Fc de IgG4 de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 incluye los aminoácidos 1 a 228, el enlazador de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 incluye los aminoácidos 229 a 244, y la proteína FGF21 de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 incluye los aminoácidos 245 a 424. Por lo tanto, una sustitución descrita en el presente documento como "A31C" se refiere a la sustitución del aminoácido Cys por el aminoácido de tipo silvestre Ala en la posición 31 del FGF21 de tipo silvestre humano maduro.

Es importante observar que una sustitución de un residuo de aminoácido en una proteína particular puede afectar a las características de las proteínas en su conjunto, y que el efecto global puede ser beneficioso o perjudicial para la potencia farmacológica y/o la estabilidad farmacéutica. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos, P115W, 25 aumenta la potencia de la proteína FGF21; sin embargo, también se cree que P115W contribuye a la autoasociación que causa la agregación. Por lo tanto, el efecto global es perjudicial para las proteínas, y por lo tanto la sustitución P115W no está incluida en las proteínas FGF21 de la presente invención. Otro ejemplo se refiere a la sustitución de aminoácidos R175L, que aumenta la potencia de la proteína FGF21. Sin embargo, las proteínas FGF21 que tienen la sustitución R175L se encontraron susceptibles a la proteólisis, por lo tanto el efecto global fue perjudicial. Para 30 abordar la proteólisis C-terminal observada con las proteínas FGF21 de la presente invención, los aminoácidos en las posiciones 180 y 181 (L en la posición 180 y G en la posición 181) están sustituidos con el aminoácido E en la posición 180 y el aminoácido en 181 se suprime. Estas modificaciones reducen sustancialmente la proteólisis C-terminal, pero también reducen la potencia farmacológica de la proteína FGF21 en 25 veces medida en el ensayo de células 293-βKlotho-SRE luc humanas. Sorprendentemente, la potencia se restaura invirtiendo el residuo de aminoácido en la posición 175 (R175L) de nuevo a la de tipo silvestre R. Por lo tanto, el efecto global de esta sustitución (R175L) es perjudicial para las proteínas, y por lo tanto, la sustitución R175L no está incluida en las proteínas FGF21 preferidas de la presente invención.

Ciertas proteínas FGF21 de la presente invención son potentes, proteínas biológicamente activas como se demostró para la SEQ ID NO: 5 en los Ejemplos 2 y 3. Las proteínas FGF21 preferidas de la presente invención contienen 40 sustituciones de aminoácidos que juntas no sólo mejoran la potencia, sino que también son compatibles con otros cambios de aminoácidos que, a su vez, pueden proporcionar características de estabilidad mejoradas y una estabilidad *in vivo* aumentada. Las sustituciones de aminoácidos en las proteínas FGF21 preferidas de la presente invención que mejoran la potencia incluyen D127K, S167R y G174L (véanse los Ejemplos 2 y 3).

La exposición de una solución de proteína concentrada de FGF21 de tipo silvestre humano a un conservante farmacéutico, tal como m-cresol, aumenta la propensión de la proteína a formar agregados. La estabilización 45 estructural a través de la introducción de un enlace disulfuro adicional mejora la compatibilidad del conservante, así como la estabilidad térmica del FGF21 humano de tipo silvestre. Las proteínas FGF21 de la presente invención incorporan las sustituciones de aminoácidos A31C y G43C que mejoran considerablemente la estabilidad térmica y la compatibilidad del conservante sin comprometer la actividad biológica. Las proteínas FGF21 de alta potencia que también incluyen las sustituciones A31C/G43C se han descrito previamente. Las proteínas informadas muestran una compatibilidad del conservante significativamente mejorada con respecto al FGF21 de tipo silvestre, pero siguen siendo propensas a la agregación en presencia de conservante. Esta agregación de proteínas aumenta el riesgo de inmunogenicidad, reduciendo así la aceptabilidad de las proteínas como una proteína terapéutica.

La fusión de proteínas FGF21 a la porción Fc también hace que la autoasociación sea más prominente. Este 55 comportamiento puede deberse a la estructura homodimérica de las fusiones Fc que podría conducir a la avidéz, estabilizando la autointeracción y la agregación.

Las proteínas preferidas de la presente invención incluyen las sustituciones de aminoácidos L98D y L100K, que dan como resultado sorprendentemente una formación de agregado de alto peso molecular significativamente inferior a altas concentraciones. Ventajosamente, las sustituciones de aminoácidos L98D y L100K no disminuyen la potencia de las proteínas, pero minimizan el problema de agregación perjudicial.

5 Un sistema de expresión comercial preferido para la fabricación de las proteínas FGF21 de la presente invención es la línea celular CHO-K1 de mamífero. Sin embargo, las líneas de células de mamífero CHO-K1 y HEK293 pueden causar modificaciones postraduccionales a FGF21 de tipo silvestre humano maduro a través de sulfatación de la cadena lateral de tirosina en la posición 179. La sulfatación de residuos de tirosina en las posiciones 179 y 180 (si está presente) disminuye la potencia y es una fuente indeseable de heterogeneidad del producto. Por lo tanto,
10 cuando una proteína FGF21 que tiene Tyr en la posición 179 y/o 180 se expresa a partir de líneas celulares CHO-K1 o HEK293, cierta proporción de las proteínas expresadas pueden sulfatarse en la posición 179, otras pueden sulfatarse en la posición 180, mientras que otras pueden sulfatarse en ambas posiciones y algunas en ninguna de las posiciones. Esto conduce a una población proteica heterogénea e impredecible con potencia disminuida.

15 Las proteínas FGF21 preferidas de la presente invención incluyen una sustitución de aminoácidos que ha resuelto esta sulfatación perjudicial. Por lo tanto, la sustitución de aminoácidos Y179F se ha incorporado en las proteínas. 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 que es un cambio neutro con respecto a la potencia.

20 El FGF21 de tipo silvestre humano es susceptible a la degradación proteolítica *in vivo*. Un fragmento proteolítico importante recuperado de sueros después de inyección intravenosa o subcutánea de ratones o monos cynomolgus con FGF21 de tipo silvestre es el fragmento que termina en la posición 171. El fragmento FGF21 que abarca los residuos 1 a 171 se ha determinado que es ~100 veces menos potente en ensayos de potencia *in vitro*. Por lo tanto, la eliminación de este sitio de escisión proteolítica puede mejorar la eficacia del fármaco aumentando la exposición al fármaco activo. Se ha demostrado que la sustitución de aminoácidos G170E ralentiza significativamente
25 la escisión en un ratón y prácticamente elimina la proteólisis en la posición 171 cuando se mide después de 24 horas en monos cynomolgus. La sustitución G170E no afecta a la potencia y es compatible con el perfil de estabilidad físicoquímica deseado. Por lo tanto, la sustitución de aminoácidos G170E se incorpora en las proteínas FGF21 de la presente invención.

30 El FGF21 de tipo silvestre humano 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 retarda este procesamiento, reduciendo de ese modo la heterogeneidad de la longitud de la proteína expresada (es decir, heterogeneidad en el número de residuos de aminoácidos en la proteína madura expresada por la línea 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 de células de mamífero, es bastante eficaz para retardar la proteólisis mientras
35 se mantiene la potencia en el contexto de otras sustituciones de aminoácidos deseadas encontradas en las proteínas 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 proteínas FGF21 preferidas de la presente invención.

40 Las proteínas FGF21 de la presente invención se fusionan a través de un enlazador a la porción Fc de una inmunoglobulina. La porción Fc usada para las proteínas FGF21 de la presente invención se deriva de una porción Fc de IgG4. Es incluso más preferible que las proteínas FGF21 de la presente invención contengan una porción Fc que se derive de IgG4 humana, pero comprenda una o más sustituciones en comparación con la secuencia humana de tipo silvestre. Como se usa en el presente documento, la porción Fc de una inmunoglobulina tiene el significado comúnmente dado al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se refiere a un
45 fragmento de anticuerpo que no contiene las dos regiones de unión a antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. La porción Fc consiste en una región bisagra, dominios de región constante CH2 y CH3 de un anticuerpo.

Se conoce bien en la técnica que la expresión de anticuerpos en mamíferos da como resultado la glicosilación. Típicamente, la glicosilación se produce en la porción Fc del anticuerpo en un sitio altamente conservado de N-glicosilación. Los N-glicanos se unen típicamente a la asparagina.

50 Por lo tanto, las proteínas FGF21 de la presente invención se obtienen a partir de la región Fc de IgG4 humana de una inmunoglobulina fusionada a una proteína FGF21 de la presente invención. Preferiblemente, la porción Fc de la proteína FGF21 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14:

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 14)

El aminoácido N-terminal de una proteína FGF21 de la presente invención se fusiona al extremo C de cada cadena pesada de la porción Fc a través de un enlazador rico en glicina (rico en G), designado por L, precediendo el número inmediatamente a L que hace referencia al número de unidades de enlazador de repetición que separan la proteína FGF21 de la porción Fc. Una unidad de enlazador se define como una secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 10). El enlazador contiene opcionalmente un Ala unido al Ser final si se usan múltiples repeticiones de enlazador.

La porción Fc de las proteínas FGF21 de la presente invención se fusionan entre sí preferiblemente a través de 1, 2, o 3 repeticiones del enlazador peptídico rico en G, -Gly-Gly-Gly-Gly-Ser- (SEQ ID NO: 10), designado como 1L. Los enlazadores ricos en G adicionales de la presente invención comprenden las secuencias -Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala (SEQ ID NO: 12), designado 2L y -Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala (SEQ ID NO: 11), designado 3L. El enlazador rico en glicina mucho más preferido de la presente invención es el enlazador 3L, -Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala (SEQ ID NO: 11).

Se entiende que el Fc de IgG4 está compuesto por la región constante de ambas cadenas pesadas de un anticuerpo IgG4. Por lo tanto, las proteínas FGF21 de la presente invención están compuestas por una porción Fc de IgG4 fusionada con dos proteínas FGF21 que tienen la misma secuencia de aminoácidos a través de los enlazadores ricos en G a cada extremo C de cada polipéptido de la porción Fc de IgG4.

Las composiciones farmacéuticas de las proteínas FGF21 de la presente invención pueden administrarse por cualquier medio conocido en la técnica que consiga el propósito generalmente deseado para tratar la diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico. La vía de administración preferida es parenteral. La dosificación administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. Los niveles de dosificación típicos se pueden optimizar usando técnicas clínicas estándar y dependerán del modo de administración y del estado del paciente y pueden determinarse por un experto en la técnica.

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

Las proteínas FGF21 de la presente invención pueden formularse con un tampón farmacéuticamente aceptable, y el pH ajustarse para proporcionar una estabilidad aceptable, y un pH aceptable para la administración. Además, las composiciones de FGF21 de la presente invención pueden colocarse en un recipiente tal como un vial, un cartucho, un dispositivo de administración tipo lápiz, una jeringa, un tubo de administración intravenosa o una bolsa de administración intravenosa.

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

La expresión "síndrome metabólico" se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona. Incluyen: Grasa abdominal - en la mayoría de los hombres, una cintura de 40 pulgadas o mayor; alto nivel de azúcar en la sangre - al menos 110 miligramos por decilitro (mg/dl) después del ayuno; triglicéridos altos - al menos 150 mg/dl en el torrente sanguíneo; bajo HDL - 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 hay un exceso de grasa subcutánea en proporción con respecto 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 revertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de una proteína de la presente invención que, tras la administración de dosis única o múltiple 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 de glucosa circulantes permanecen excesivamente altos como resultado de una depuración inadecuada de la glucosa.

La presente invención se puede poner en práctica haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, esto no debe interpretarse como limitante del alcance de la presente invención. Además, las proteínas FGF21 de la presente invención descritas e ilustradas en los ejemplos se expresan en células de mamífero, y por lo tanto son un homodímero.

Ejemplo 1

Expresión de las proteínas FGF21 en las células CHOK1SV

Las proteínas FGF21 de la presente invención se producen en un sistema de expresión de células de mamífero utilizando células CHOK1SV. Los genes que codifican las proteínas FGF21 de la presente invención se subclonan en las estructuras plasmídicas de expresión que contienen glutamina sintetasa (GS) (plásmidos basados en pEE12.4). La secuencia de ADNc que codifica las proteínas FGF21 de la presente invención se fusiona en marco con la secuencia codificante de secuencias de péptido señal preferidas para aumentar la secreción del producto deseado en el medio de cultivo tisular. Las secuencias de péptido señal preferidas son los polipéptidos como se muestra en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4.

La expresión es impulsada por el promotor del virus citomegalovirus (CMV). Las células CHOK1SV se transfectan de forma estable usando electroporación y la cantidad apropiada de plásmido de expresión recombinante, y las células transfectadas se mantienen en cultivo en suspensión, a la densidad celular adecuada. La selección de las células transfectadas se consigue mediante crecimiento en medio libre de suero que contiene metionina sulfoximina (MSX) y se incuba a 35-37 °C y CO₂ al 5-7 %.

Las líneas celulares derivadas de clon se miden o determinan mediante el uso de un citómetro de flujo. La expresión de una proteína FGF21 en células de mamífero produce generalmente la secuencia N-terminal natural, ESKY, es decir, sin un residuo de metionina en el extremo N, tal como la proteína FGF21 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Las proteínas FGF21 secretadas en el medio de las células CHO pueden purificarse por cromatografía de afinidad de Proteína A seguida de cromatografía de exclusión de tamaño preparativa siguiendo técnicas cromatográficas estándar. En resumen, las proteínas FGF21 de los medios cosechados se capturan en Proteína A Mab Select (GE, Piscataway, NJ) con tampón de migración de PBS a pH 7,4; se lavan brevemente con tampón de migración para eliminar material no específicamente unido; y se eluyen con citrato 10 mM a pH 3,0. Las fracciones que contienen proteínas FGF21 se agrupan y el pH se neutraliza añadiendo 1/10 en volumen de Tris 1 M a pH 8,0. El agrupamiento neutralizado se concentra y se carga en una columna de cromatografía de exclusión de tamaño Superdex 200 (GE, Piscataway, NJ) con fase móvil de PBS a pH 7,4. Las fracciones que contienen la proteína monomérica FGF21 (un homodímero unido covalentemente) se agrupan, se concentran y se almacenan.

Como alternativa, los medios libres de células que contienen proteínas FGF21 pueden calentarse a 50-60 °C durante hasta dos horas, enfriarse, tratarse con detergente (Triton X-100) para la inactivación vírica, aplicarse a una columna de Proteína A Mab Select (GE Healthcare), y lavarse sucesivamente con una solución de tampón Tris a pH 7 con y sin cloruro sódico para eliminar los materiales no específicamente unidos. La proteína FGF21 se eluye en la columna usando citrato 20 mM a pH 3 y se mantiene de pH 3,4 a 3,7 hasta dos horas para la inactivación vírica. La solución se ajusta de pH 4,8 a 5,2 mediante la adición de tampón Tris y cloruro de sodio y se mezcla durante al menos 15 minutos. Los precipitados que se forman se eliminan mediante filtración en profundidad (Millipore). La proteína FGF21 se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando resinas tales como Poros HS 50 (Life Technologies) o SP Sepharose HP (GE Healthcare). La columna de intercambio catiónico se eluye con cloruro de sodio en una solución tamponada con acetato sódico pH 5. La proteína FGF puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare) ajustando el pH de 7 a 8 usando un tampón Tris, la adición de sulfato sódico y la aplicación a la columna seguida de elución con un gradiente de concentración inversa de sulfato sódico. La proteína FGF21 purificada se puede pasar a través de un filtro de retención viral tal como Planova 20N (Asahi Kasei Medical) seguido de concentración/diafiltración en citrato 10 mM, NaCl 150 mM a pH 7 usando ultrafiltración de flujo tangencial en una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 2

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

Los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se generan a partir de fibroblastos 3T3-L1 mediante transducción retroviral de un vector de expresión de mamífero impulsado por CMV que contiene la secuencia codificante de βKlotho de ratón de

tipo silvestre y un marcador de resistencia a blasticidina. Las células resistentes a blasticidina se seleccionan después del crecimiento durante 14 días en presencia de blasticidina 15 µM, y la expresión de la proteína βKlotho se verifica mediante inmunotransferencia con un anticuerpo anti-βKlotho. Los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se mantienen en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternero al 10 % y blasticidina 15 µM hasta que se colocan en placas para uso experimental.

Para la captación de glucosa, los fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se colocan en placas a 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incuban durante 48 horas en DMEM con suero de ternero al 10 %. Las células se incuban durante 3 horas en DMEM con albúmina sérica bovina al 0,1 % (BSA) con o sin una proteína 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 contiene 2-desoxi-D-(¹⁴C) glucosa 100 µM con o sin una proteína FGF21. La unión no específica se determina mediante incubación de pocillos seleccionados en tampón bicarbonato/Hepes de Krebs-Ringer (KRBH) que contiene 2-desoxi-D-(¹⁴C) glucosa 1 mM. La reacción se termina por la adición de citocalasina B 20 µM a las células y la captación de glucosa se mide usando un contador de centelleo líquido.

Siguiendo el protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, la potencia *in vitro* (CE₅₀) del homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 en el ensayo de captación de glucosa de fibroblastos 3T3-L1-βKlotho se determina que es de 0,070 nM.

Ejemplo 3

Ensayo de βKlotho-SRE luc de células 293 humanas

Construcción de células indicadoras 293-βKlotho-SRE luc:

Se cultivan células HEK-293 (células de riñón embrionarias humanas) a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio de crecimiento (GM) que contiene suero fetal bovino al 10 % (FBS) en medio Eagle modificado por Dulbecco. Las células se cotransfectan con un plásmido que contiene un casete de expresión de βKlotho humano impulsado por promotor de CMV y un plásmido que contiene un casete de expresión de luciferasa impulsado por elemento de respuesta al suero (SRE). El plásmido de expresión de βKlotho también contiene un casete de expresión de neomicina fosfotransferasa impulsado por el promotor SV40 para conferir resistencia al antibiótico aminoglucósido G418. Las células HEK-293 transfectadas se seleccionan con 600 µg/ml de G418 para seleccionar células en las que los plásmidos transfectados se han integrado en el genoma. Las células seleccionadas se clonan por dilución y se ensayan para un aumento en la producción de luciferasa 24 horas después de la adición de FGF21. El clon que demuestra el mayor aumento dependiente de FGF21 en luciferasa se elige como la línea celular usada para medir la actividad relativa de las proteínas FGF21.

Ensayo de actividad de 293-βKlotho-SRE luc FGF21:

Las células 293-βKlotho-SRE luc se aclaran y se colocan en placas en medio de cultivo en suspensión de CD 293 (Invitrogen). Las células se cultivan en suspensión durante una noche a 37 °C, CO₂ al 6 %, 125 rpm. Las células se cuentan, sedimentan por centrifugación y se vuelven a suspender en medio CD 293 que contiene BSA al 0,1 %. Las células se colocan en placas blancas de 96 pocillos a 25.000 células por pocillo. Se prepara una dilución seriada de cuatro veces en CD 293/BSA al 0,1 % para cada proteína FGF21 para generar ocho diluciones con concentraciones finales de 100 nM a 0,006 nM. Se añaden diluciones a las células por triplicado y se incuban durante 16-20 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. El nivel de luciferasa se determina mediante la adición de un volumen igual de sustrato de luciferasa OneGlo™ (Promega) y la medición de la luminiscencia relativa. Los datos se analizan utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros (XLfit versión 5.1) para ajustar las curvas y determinar la CE₅₀.

Siguiendo el protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, la potencia *in vitro* (CE₅₀) del homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 en el ensayo de células 293-βKlotho-SRE luc humanas se determina que es de 0,51 nM.

Ejemplo 4

Estabilidad física

Heterogeneidad de la expresión de R175 y E180

Es deseable la producción de un producto proteico homogéneo, ya que asegura mejor un producto consistente y bien caracterizado. Para evaluar la heterogeneidad del producto, se mezcla una alícuota de 10 µl de una muestra con 90 µl de DPBS. La muestra se analiza por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), utilizando las siguientes condiciones: la fase móvil A es TFA al 0,05 %, la fase móvil B es TFA al 0,04 % en acetonitrilo, la columna es una PLRPS 2,1 x 50 mm, el volumen de inyección es de 15 µl.

Tabla 1: Condiciones de gradiente para la separación cromatográfica líquida

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

Un espectrómetro de masas Waters Micromass LCT Premier™ se ajusta a un intervalo de masa entre 400 a 1990 amu, polaridad ES+, capilar 3000, cono de muestra 40 V, la apertura 1 es 25 V, temperatura de origen es de 105 °C, el flujo de gas de cono es de 50 l/hora, la temperatura de desolvatación es de 150 °C, y el flujo de gas de desolvatación es de 600 l/hora.

Tabla 2: Caracterización por LC/MS de proteínas FGF21

Proteína FGF21	Producto				
	1-425	1-424	1-422	1-411	1-379
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8		81,8 %	11,8 %	6,4 %	
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9	48,8 %	49,8 %		1,2 %	0,1 %
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5		100 %			

La Tabla 2 indica la heterogeneidad resultante en cada proteína FGF21 determinada por el método de LC/MS. El producto 1-425 representa la proteína FGF21 de longitud completa que contiene la porción Fc de IgG4, el enlazador y la proteína FGF21 para la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9. La proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 difieren solamente en la posición 100 con la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 que contiene el residuo de tipo silvestre leucina y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 que contiene el residuo aminoácido lisina (L100K) y ambas proteínas tienen extremos C idénticos. Ambas proteínas son susceptibles a truncamientos C-terminales, especialmente la eliminación del residuo aminoácido glicina en la posición 181. Como se muestra en la Tabla 2, menos del 50 % del producto purificado para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 y el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 es la longitud completa prevista de 1-425; el fragmento 1-424 constituye la mayor parte del producto purificado. Además, también se detectan cantidades menores de los productos 1-422, 1-411 y 1-379.

La proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 tiene el residuo de aminoácido en 181 suprimido en la construcción genética y el residuo aminoácido 180 se ha sustituido por ácido glutámico (E). Estos cambios protegen el extremo C de la degradación durante la expresión de CHO, dando como resultado un producto 1-424 purificado homogéneo al 100 %.

Ejemplo 5

Estabilidad física

Autoasociación a alta concentración

La agregación de proteínas y la autoasociación no son deseadas ya que podrían exacerbar potencialmente efectos no deseados tales como desencadenar una respuesta inmune. Por lo tanto, se prefiere mantener la proteína en un estado monomérico (un homodímero unido covalentemente). Para ensayar la propensión de las proteínas FGF21 a autoasociarse, se dializaron proteínas en los tampones enumerados en la Tabla 3 y se analizaron por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) para determinar el % de alto peso molecular (% de HMW) de una solución de 1,0 mg/ml. El % de HMW es un indicador de la agregación de proteínas y la autoasociación.

El método de separación SEC se realiza en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL de 5 micrómetros con dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil es fosfato sódico 0,05 M, NaCl 175 mM, pH 7 a un caudal de 0,5 ml/minuto. Se aplican muestras de 1,0 mg/ml como inyecciones de 10 µl y se controlan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm, mientras que se aplican muestras de 75 mg/ml como inyecciones de 1 µl y se controlan a 280 nm.

Tabla 3: Autoasociación

Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8			
Composición de tampón	Citrato 10 mM, NaCl 150 mM	Citrato 10 mM, NaCl 50 mM	PBS
HMW (%) 1 mg/ml	4,4 %	4,4 %	4,2 %
HMW (%) 75 mg/ml	13,7 %	21,9 %	14,6 %
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9			
Composición de tampón	Citrato 10 mM, NaCl 150 mM	Citrato 10 mM, NaCl 50 mM	PBS
HMW (%) 1 mg/ml	0,7 %	0,8 %	0,8 %
HMW (%) 75 mg/ml	2,2 %	3,5 %	2,2 %
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5			
Composición de tampón	Citrato 10 mM, NaCl 150 mM	Citrato 10 mM, NaCl 50 mM	PBS
HMW (%) 1 mg/ml	0,4 %	0,4 %	0,4 %
HMW (%) 75 mg/ml	2,0 %	3,6 %	2,2 %

La Tabla 3 ilustra el HMW al 4-5 % para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 y <1 % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 y el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 a 1,0 mg/ml para todas las composiciones de tampón. Las muestras se concentraron entonces hasta 75 mg/ml para simular una formulación de alta concentración y se analizaron de nuevo por SEC para determinar el % de HMW. El homodímero de la proteína FGF21 de la variante SEQ ID NO: 8 contenía el 13,7-21,9 % de HMW a 75 mg/ml, mientras que el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 contenía sólo el 2,2-3,5 %. Dado que la única diferencia entre la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 es una sustitución en la posición 100 (L100L frente a L100K), estos datos demuestran que L100K reduce la formación de HMW.

La proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 contiene también L100K además de otros cambios, y el % de HMW inferior también se observa en esta proteína homodimérica.

Ejemplo 6

Estabilidad física

Sustitución de L100K y % de alto peso molecular

La estabilidad física de las proteínas FGF21 se determina como se indica a continuación. Las proteínas se dializan y se preparan a 1-2 mg/ml en citrato 10 mM a pH 7, NaCl 150 mM y se analizan por SEC para determinar el % de HMW (Tabla 3: "Inicial").

El método de separación SEC se realiza en una columna Tosoh Bioscience 3000SWXL de 5 micrómetros con dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil es fosfato sódico 0,05 M, NaCl 175 mM, pH 7 a un caudal de 0,5 ml/minuto. Las muestras de baja concentración inicial se aplican como inyecciones de 10 µl y se controlan a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm, mientras que las muestras de 50 mg/ml se aplican como inyecciones de 1 µl y se controlan a 280 nm.

A continuación, las proteínas se concentran a 50 mg/ml y se analizan de nuevo (t = 0). El % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 aumentó del 4,5 % al 9,3 % tras la concentración. El % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 aumentó del 0,9 % al 1,4 % tras la concentración. El % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 aumentó del 0,4 % al 1,4 % tras la concentración. Por lo tanto, tanto el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 como el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 tienen un % de HMW inicial inferior y un % de HMW inferior cuando las proteínas se formulan a 50 mg/ml inferior al del homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8. Estos datos demuestran la importancia de la mutación L100K que está presente en la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5, pero que no está presente en la proteína FGF21 de la SEQ ID NO: 8.

Las formulaciones de 50 mg/ml se incuban durante 4 semanas a 4 °C, 25 °C y 40 °C para evaluar la estabilidad a más largo plazo en condiciones de estrés. Como se muestra en la Tabla 4, el % de HMW se determina de nuevo a las 4 semanas (t = 4 semanas). El % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8 aumentó

del 9,3 % al 16,0 % a 40 °C. El % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 aumentó del 1,4 % al 5,5 % a 40 °C. El % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 aumentó del 0,4 % al 5,4 % a 40 °C. Después de 4 semanas a 25 °C, los niveles de % de HMW eran sólo del 3,3 % para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 y el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5, mientras que eran del 13,8 % para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8. Estos datos demuestran el impacto beneficioso de incluir la mutación L100K presente en la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9 y la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5.

Tabla 4: % de alto peso molecular

Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 8			
	Inicial	50 mg/ml % de HMW (t = 0)	50 mg/ml % de HMW (t = 4 semanas)
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM	4,5 %	9,3 %	
4 °C			12,1 %
25 °C			13,8 %
40 °C			16,0 %
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 9			
	Inicial	50 mg/ml % de HMW (t = 0)	50 mg/ml % de HMW (t = 4 semanas)
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM	0,9 %	1,4 %	
4 °C			3,3 %
25 °C			3,3 %
40 °C			5,5 %
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5			
	Inicial	50 mg/ml % de HMW (t = 0)	50 mg/ml % de HMW (t = 4 semanas)
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM	0,4 %	1,4 %	
4 °C			2,9 %
25 °C			3,3 %
40 °C			5,4 %

Ejemplo 7

Estabilidad física

Autoasociación

La proteína FGF21 purificada de SEQ ID NO: 7 (que es la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 que tiene D98L) y la proteína FGF21 purificada de SEQ ID NO: 6 (que es la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 que tiene K100L) se dializaron en citrato 10 mM, NaCl 50 mM, tampón a pH 6 y las concentraciones se determinan que son de 12,9 mg/ml, 1,0 mg/ml, y 0,6 mg/ml, respectivamente. Cada muestra recuperada de diálisis se analiza por SEC para determinar el % de HMW (Tabla 5). El % de HMW fue <1 % para todos los dializados recuperados. A continuación, las muestras se concentran hasta 65-87 mg/ml utilizando un concentrador de centrifugación Millipore de 4 ml con un corte de peso molecular de 10.000. Las concentraciones para cada muestra se muestran en la Tabla 5. Después de la concentración, el % de HMW se determina de nuevo por SEC usando la proteína concentrada.

Como se muestra en la Tabla 5, el % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 aumentó al 2,3 % indicando un nivel bajo de autoasociación que se produjo en concentraciones más altas. Por el contrario, el % de HMW para el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 7 (que es la proteína FGF21 de SEQ ID NO:

5 que tiene D98L) y el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 6 (que es la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 que tiene K100L) aumento a niveles del 8,0 % y el 14,2 %, respectivamente. Estos datos demuestran una mayor propensión a la autoasociación indeseable cuando se incluyen L98 o L100 de tipo silvestre en la secuencia. Por lo tanto, tanto las sustituciones L98D como L100K contribuyen a disminuir la autoasociación de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5. Además, se concluye que la presencia de L100K en ausencia de L98D (es decir, la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 7) es insuficiente para minimizar completamente la autoasociación. Por el contrario, se concluye que la presencia de L98D en ausencia de L100K (es decir, la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 6) es insuficiente para minimizar completamente la autoasociación. Por lo tanto, el efecto máximo sobre la reducción de autoasociación requiere tanto L98D como L100K juntos.

Tras la dilución de las proteínas concentradas a 1 mg/ml, el % de HMW disminuye demostrando que la autoasociación es reversible. La dilución del homodímero de la proteína FGF21 de la variante SEQ ID NO: 6 (que es la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 que tiene K100L) a 1 mg/ml da como resultado la disminución del % de HMW del 14,2 % al 2,0 %. La dilución del homodímero de la proteína FGF21 de la variante SEQ ID NO: 7 (que es la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 que tiene D98L) a 1 mg/ml da como resultado la disminución del % de HMW del 8,0 % al 1,3 %. Cuando L98D y L100K están presentes juntos en el homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5, el % de HMW disminuye al 0,88 % tras la dilución hasta 1 mg/ml, demostrando nuevamente el comportamiento más beneficioso cuando se combinan L98D y L100K.

Tabla 5: Autoasociación

Proteína FGF21	Dializado		Concentrado		Concentrado diluido a 1 mg/ml	
	mg/ml	% de HMW	mg/ml	% de HMW	mg/ml	% de HMW
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5	12,9	0,75	76	2,3	1,0	0,88
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 6	0,6	0,78	87	14,2	1,0	2,0
Homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 7	1,0	0	65	8,0	1,0	1,3

Ejemplo 8

Reducción de glucosa en modelo de ratón *Ob/ob*

Los ratones macho ob/ob y los controles de ob/m (magros) de la misma edad tienen 7 semanas de edad a la llegada y 8-9 semanas de edad al inicio del tratamiento. A la llegada, todos los ratones están alojados individualmente y se les permite aclimatarse durante 1-2 semanas antes del inicio del tratamiento. Los ratones se alimentan con Purina Rodent Chow 5015 y se les da agua corriente a partir de un aparato de autosuministro de agua *ad libitum*. Los ratones se alojan en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con temperatura ambiente ajustada a 75 °F. Uno o dos días antes del inicio del tratamiento, las muestras de sangre se recogen a través de sangrado de la cola. Los niveles de glucosa en sangre se miden usando un medidor de glucosa en sangre Accu-Check Avivia (Roche) y se recogen muestras de suero para el ensayo de insulina usando el kit de ensayo de insulina de ratón/rata Meso Scale. El día del inicio del tratamiento (día 0), los ratones se clasifican en grupos basándose en el peso corporal de pretratamiento, la glucosa en sangre y la insulina en suero (software de clasificación BRAT). El día 0 y el día 3, los ratones se dosifican SQ con 0,1 a 30 nmol/kg del homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5, en un volumen de 10 ml/kg. El vehículo dosificador es PBS estéril (HyClone DPBS/Calcio-Magnesio modificado) que contiene albúmina de suero de ratón al 0,03 % (MSA, Sigma A3139). La glucosa en sangre se mide a diario durante 7 días y se determina el AUC. Los cálculos ED₅₀ para la reducción de la glucosa se basan en el AUC. 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.

El día 7, los ratones tratados con vehículo eran hiperglucémicos con los niveles medios de glucosa en sangre medidos a 387 ± 63,0 mg/dl (media ± SEM), mientras que los ratones de control ob/m magros tenían niveles de glucosa en sangre de 162 ± 9,0 mg/dl (media ± SEM). El homodímero de la proteína FGF21 de la variante SEQ ID NO: 5 redujo la glucosa en sangre a niveles comparables con los controles de ob/m magros. La ED₅₀ del homodímero de la proteína FGF21 de SEQ ID NO: 5 era de 2,796 nmol/kg (intervalo de confianza del 95 % = 1,1 - 7,0).

Secuencias

SEQ ID NO: 1 - Proteína FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLR
LVEPSQLRSPSFE

SEQ ID NO: 2 - FGF21 de tipo silvestre (Homo Sapiens)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVGPSQGRSPSYAS

SEQ ID NO: 3 - Péptido señal de transferrina humana (hTrf)

5 MRLAVGALLVCAVLGLCLA

SEQ ID NO: 4 - Péptido señal de proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos humanos 1 (hFGFP-1)

MKICSLTLLSFLLLAAQVLLVEG

SEQ ID NO: 5 - Proteína FGF21

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
SLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPARFLPL
10 PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE

SEQ ID NO: 6 - Proteína FGF21

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDGTVGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
SLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPARFLPL
PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE

SEQ ID NO: 7 - Proteina FGF21

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
SLHFDPEACSFRELLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPL
PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE

SEQ ID NO: 8 - Proteina FGF21

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
SLHFDPEACSFREDLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPL
PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLLSPSFLG

5 **SEQ ID NO: 9 - Proteina FGF21**

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ
TECHLEIREDDGTGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
SLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPL
PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLLSPSFLG

SEQ ID NO: 10 - Enlazador (L)

GGGS

SEQ ID NO: 11 - Enlazador (3L)

10 GGGSGGGSGGGGSA

SEQ ID NO: 12 - Enlazador (2L)

GGGSGGGGSA

SEQ ID NO: 13 - (ADN) de la proteína FGF21

GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCG
GGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACC
CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA

GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGG
CTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CTGGGTGGTGGTGGTGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGCG
CTACCCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGGCCAAGTCCGG
CAGCGGTACCTGTACACCGACGACGCCAGCAGACCGAGTGCCACCTGGAAA
TCCGGGAGGACGGCACCGTGGGCTGTGCCGCCGACCAGTCCCCTGAGTCCCT
GCTGCAGCTGAAGGCCCTGAAGCCTGGCGTGATCCAGATCCTGGGCGTGAAA
ACCTCCCGGTTCTGTGCCAGAGGCCTGATGGCGCCCTGTACGGCTCCCTGCA
CTTCGACCCTGAGGCCTGCTCCTTCCGGGAGGACCTGAAGGAAGATGGCTAC
AACGTGTACCAGTCCGAGGCTCACGGCCTGCCTCTGCATCTGCCTGGCGACAA
GTCCCCCACCAGGAAGCCTGCTCCTAGGGGGCCCTGCCAGATTCCTGCCACTGC
CTGGCCTGCCTCCAGCTCTGCCTGAGCCTCCTGGCATCCTGGCCCCCTCAGCCT
CCAGACGTGGGCTCCTCCGACCCTCTGCGGCTGGTCGAGCCTTCCCAGCTGCG
GAGCCCTAGCTTCGAG

SEQ ID NO: 14 - Porción Fc

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 15 - Proteína FGF21 consenso

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQ

 TECHLEIREDTVGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
 SLHFDPEACSFREX₁LX₂EDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPARFLP
 LPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLX₃SPSFX₄X₅

X₁ es L o D

X₂ es L o K

5 X₃ es R o L

X₄ es L o E

X₅ es G o está ausente

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

10 <120> PROTEÍNAS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21

<130> X19535

<150> 61/658104

<151> 11-06-2012

<150> 61/777386

15 <151> 12-03-2013

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 180

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 1

ES 2 644 787 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

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 644 787 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

5 <213> Secuencia artificial

<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

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Secuencia 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> 424

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> construcción sintética

<400> 5

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

ES 2 644 787 T3

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe
 245 250 255

Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln
 260 265 270

Thr Glu Cys His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala
 275 280 285

Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro
 290 295 300

Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln
305 310 315 320

Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala
325 330 335

Cys Ser Phe Arg Glu Asp Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln
340 345 350

Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro
355 360 365

His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
370 375 380

Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
385 390 395 400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser
405 410 415

Gln Leu Arg Ser Pro Ser Phe Glu
420

<210> 6

<211> 424

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 6

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

ES 2 644 787 T3

Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	85	90	95	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	100	105	110	
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	115	120	125	
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	130	135	140	
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	145	150	155	160
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	165	170	175	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	180	185	190	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	195	200	205	
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	210	215	220	
Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	225	230	235	240
Gly	Gly	Ser	Ala	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	245	250	255	
Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	260	265	270	
Thr	Glu	Cys	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Cys	Ala	275	280	285	
Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	290	295	300	
Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	305	310	315	320
Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	325	330	335	

ES 2 644 787 T3

Cys Ser Phe Arg Glu Asp Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln
340 345 350

Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro
355 360 365

His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
370 375 380

Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
385 390 395 400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser
405 410 415

Gln Leu Arg Ser Pro Ser Phe Glu
420

<210> 7

<211> 424

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 7

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

ES 2 644 787 T3

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe
 245 250 255
 Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln
 260 265 270
 Thr Glu Cys His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala
 275 280 285
 Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro
 290 295 300
 Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln
 305 310 315 320
 Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala
 325 330 335
 Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln
 340 345 350
 Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro
 355 360 365

His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
370 375 380

Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
385 390 395 400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser
405 410 415

Gln Leu Arg Ser Pro Ser Phe Glu
420

<210> 8

<211> 425

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 8

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

ES 2 644 787 T3

Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	145	150	155	160
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	165	170	175	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	180	185	190	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	195	200	205	
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	210	215	220	
Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	225	230	235	240
Gly	Gly	Ser	Ala	His	Pro	Ile	Pro	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	245	250	255	
Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	260	265	270	
Thr	Glu	Cys	His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Cys	Ala	275	280	285	
Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	290	295	300	
Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	305	310	315	320
Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	325	330	335	
Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	340	345	350	
Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asp	Lys	Ser	Pro	355	360	365	
His	Arg	Lys	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	370	375	380	
Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	385	390	395	400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser
405 410 415

Gln Leu Leu Ser Pro Ser Phe Leu Gly
420 425

<210> 9

<211> 425

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe
 245 250 255

Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln
 260 265 270

Thr Glu Cys His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala
 275 280 285

Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro
 290 295 300

Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln
 305 310 315 320

Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala
 325 330 335

Cys Ser Phe Arg Glu Asp Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln
 340 345 350

Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro
 355 360 365

His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro
 370 375 380

Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln
 385 390 395 400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser
 405 410 415

Gln Leu Leu Ser Pro Ser Phe Leu Gly
 420 425

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 11
 10 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 15 <400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 1 5 10

25 <210> 13
 <211> 1272
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> construcción sintética
 <400> 13

gagtcctaat atgggtcccc atgcccaccc tgcccagcac ctgaggccgc cgggggacca	60
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag	120
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	180
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	300
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa	360
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg	420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc	480
gtggagtggg aaagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag	600
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	660
aagagcctct ccctgtctct ggggtggtggt ggtggctccg gaggcggcgg ctctggtggc	720
ggtggcagcg ctcaccccat ccctgactcc agtcctctcc tgcaattcgg gggccaagtc	780
cggcagcggg acctgtacac cgacgacgcc cagcagaccg agtgccacct ggaaatccgg	840
gaggacggca ccgtgggctg tgccgcgcgac cagtcccctg agtcccctgct gcagctgaag	900
gccctgaagc ctggcgtgat ccagatcctg ggcgtgaaaa cctcccgggt cctgtgccag	960
aggcctgatg gcgccctgta cggctccctg cacttcgacc ctgaggcctg ctccctccgg	1020
gaggacctga aggaagatgg ctacaacgtg taccagtccg aggctcacgg cctgcctctg	1080
catctgcctg gcgacaagtc cccccaccgg aagcctgctc ctagggggccc tgccagattc	1140
ctgccactgc ctggcctgcc tccagctctg cctgagcctc ctggcatcct ggcccctcag	1200
cctccagacg tgggctcctc cgaccctctg cggctggtcg agccttccca gctgcggagc	1260
cctagcttcg ag	1272

<210> 14

<211> 228

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 14

ES 2 644 787 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly
 225

<210> 15

<211> 425

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (342)..(342)
 <223> Xaa en la posición 342 es Leu o Asp
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (344)..(344)
 <223> Xaa en la posición 344 es Leu o Lys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (419)..(419)
 <223> Xaa en la posición 419 es Arg o Leu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (424)..(424)
 20 <223> Xaa en la posición 424 es Leu o Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (425)..(425)
 <223> Xaa en la posición 425 es Gly o está ausente
 25 <400> 15

ES 2 644 787 T3

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	1	5	10	15
Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	20	25	30	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	35	40	45	
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	50	55	60	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	65	70	75	80
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	85	90	95	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	100	105	110	
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	115	120	125	
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	130	135	140	
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	145	150	155	160
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	165	170	175	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	180	185	190	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser				

ES 2 644 787 T3

195		200		205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser				
210		215		220
Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly				
225		230		240
Gly Gly Ser Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe				
		245		255
Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln				
		260		270
Thr Glu Cys His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala				
		275		285
Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro				
		290		300
Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln				
305		310		320
Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala				
		325		335
Cys Ser Phe Arg Glu Xaa Leu Xaa Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln				
		340		350
Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro				
		355		365
His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro				
		370		380
Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln				
385		390		400
Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser				
		405		415
Gln Leu Xaa Ser Pro Ser Phe Xaa Xaa				
		420		425

REIVINDICACIONES

- 1.- Un homodímero de una proteína del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), en el que la secuencia de aminoácidos consiste en un primer polipéptido fusionado a un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una porción Fc de IgG4, el segundo polipéptido comprende una proteína FGF21 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que el extremo C del primer polipéptido se fusiona con el extremo N del segundo polipéptido a través de un enlazador.
- 2.- El homodímero de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la porción Fc de IgG4 es la SEQ ID NO: 14.
- 3.- El homodímero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos del enlazador es la SEQ ID NO: 11.
- 4.- El homodímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de aminoácidos es

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGSGGGGSGGGGSGGGGSAHPIPDSPLLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTECHLEIREDDGTVGCAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFREDLKEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGDKSPHRKPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLRLVEPSQLRSPSFE (SEQ ID NO: 5).
- 5.- El homodímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la porción Fc de IgG4Fc de la proteína está glicosilada.
- 6.- Una molécula de ADN que codifica un polipéptido, en la que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es la SEQ ID NO: 5.
- 7.- Una célula huésped de mamífero transformada con y que comprende una molécula de ADN de la reivindicación 6, célula que es capaz de expresar un homodímero en el que la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido de dicho homodímero es la SEQ ID NO: 5.
- 8.- Un procedimiento para producir un homodímero en el que la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido de dicho homodímero es la SEQ ID NO: 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - i) cultivar una célula huésped de mamífero que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en condiciones tales que dicha secuencia polipeptídica se expresa; y
 - ii) recuperar de dicha célula huésped un homodímero en el que la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido es la SEQ ID NO: 5.
- 9.- Un homodímero producido por el procedimiento de la reivindicación 8.
- 10.- Una composición farmacéutica que comprende el homodímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de la reivindicación 9, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 11.- El homodímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de la reivindicación 9, para su uso en terapia.
- 12.- El homodímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de diabetes de tipo 2, obesidad, dislipidemia y/o síndrome metabólico.